

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202491821** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2024.09.17**

(22) Дата подачи заявки  
**2023.01.10**

(51) Int. Cl. **C07K 14/705** (2006.01)  
**A61K 35/17** (2015.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**C12N 15/86** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)  
**C07K 16/46** (2006.01)  
**C12N 5/10** (2006.01)  
**C12N 5/0783** (2010.01)  
**C12N 15/62** (2006.01)

(54) **ХИМЕРНЫЕ АНТИГЕННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ ПРОТИВ MUC16**

(31) **63/298,141**

(32) **2022.01.10**

(33) **US**

(86) **PCT/US2023/010518**

(87) **WO 2023/133358 2023.07.13**

(88) **2023.10.19**

(71) Заявитель:

**РЕДЖЕНЕРОН**

**ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

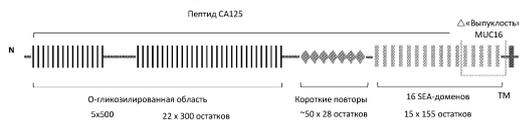
(72) Изобретатель:

**Парсонс Джоффри Блэкберн, Дилилло  
Дэвид, Альбершардт Тина (US)**

(74) Представитель:

**Кузнецова С.А. (RU)**

(57) В соответствии с настоящим изобретением предложены химерные антигенные рецепторы (CAR), нацеленные на MUC16, генетически модифицированные иммунные эффекторные клетки и применение этих композиций для лечения рака.



**A1**

**202491821**

**202491821**

**A1**

## ХИМЕРНЫЕ АНТИГЕННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ ПРОТИВ MUC16

### РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 63/298141, поданной 10 января 2022 г. Полное содержание указанной выше заявки явным образом включено в настоящий документ посредством ссылки.

### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к химерным антигенным рецепторам (CAR), содержащим антитела против MUC16 (муцин 16, ассоциированный с поверхностью клетки) или их антигенсвязывающие фрагменты, иммунным эффекторным клеткам, генетически модифицированным для экспрессии этих CAR, и применению этих композиций для эффективного лечения солидных опухолей.

### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Муцин 16 (MUC16), также известный как раковый антиген 125 (CA-125), представляет собой один трансмембранный домен, экспрессированный на повышенном уровне в солидных опухолях, таких как рак яичника. Было показано, что экспрессия MUC16 на раковых клетках защищает опухолевые клетки от иммунной системы (Felder, M. *et al.* 2014, *Molecular Cancer*, 13:129). Хотя были исследованы антитела, нацеленные на MUC16 (например, ореговомаб и абговомаб), их клинический успех был ограничен. Соответственно, необходимы дополнительные терапевтические средства, нацеленные на этот антиген.

### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение основано, по меньшей мере частично, на обнаружении химерных антигенных рецепторов (CAR), специфичных к полипептиду MUC16. В частности, CAR, описанные в этом документе, специфичны к фрагменту или части MUC16, присутствующим на поверхности клетки после протеолитического расщепления полноразмерного полипептида MUC16. В настоящем документе

продемонстрировано, что описанные CAR против MUC16 обладают удивительными и неожиданными свойствами. В разделе «Примеры» более подробно обсуждается, что CAR в соответствии с настоящим изобретением проявляют сильную антигензависимую активность, что оценивают по высвобождению IFN-гамма, высокую эффективность трансдукции и высокий уровень экспрессии (см., например, пример 2). Кроме того, CAR против MUC16, описанные в настоящем документе, проявляют антигензависимую цитотоксичность дозозависимым образом, например, по меньшей мере 60%-ную, по меньшей мере 65%-ную или по меньшей мере 70%-ную цитотоксичность (пример 3). Более того, некоторые CAR против MUC16, описанные в настоящем документе, демонстрировали повышенную экспрессию маркеров, таких как CD62L и CD45RA (пример 4), что указывает на более необученный фенотип с потенциалом большей персистенции *in vivo*. Наконец, некоторые CAR против MUC16, протестированные в соответствии с настоящей заявкой, неожиданно продемонстрировали лучшую противоопухолевую активность *in vivo* (примеры 6 и 7), включая уменьшение количества раковых клеток, экспрессирующих MUC16, *in vivo*.

Соответственно, в некоторых аспектах в соответствии с настоящим изобретением предложен химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий: внеклеточный домен, содержащий антитело против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают один или более эпитопов полипептида MUC16 человека; трансмембранный домен, один или более внутриклеточных костимулирующих сигнальных доменов и первичный сигнальный домен. В некоторых аспектах антитело против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент связывают ближайший к мембране фрагмент MUC16, оставшийся на поверхности клетки после протеолитического расщепления полноразмерного полипептида MUC16. В одном аспекте фрагмент MUC16, оставшийся на поверхности клетки после протеолитического расщепления, содержит SEQ ID NO: 151. В некоторых аспектах полноразмерный полипептид MUC16 содержит 16 доменов SEA (спермы морского ежа, энтерокиназы и агрина), пронумерованных 1 — 16 от N-конца к C-концу, и при этом фрагмент MUC16 содержит домены SEA 12 — 16.

В любом из указанных выше или связанных аспектов антитело против MUC16 или антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают полипептид MUC16 человека, выбраны из группы, состоящей из фрагмента Fab', F(ab')<sub>2</sub>-фрагмента, биспецифического Fab-димера (Fab<sub>2</sub>), триспецифического Fab-тримера (Fab<sub>3</sub>), Fv,

одноцепочечного белка Fv («scFv»), бис-scFv, (scFv)<sub>2</sub>, верблюжий Ig, VHH, Ig NAR, минителя, диатела, триатела, тетратела, стабилизированного дисульфидными связями белка Fv («dsFv») и однодоменного антитела (sdAb, нанотела) или их фрагмента. В некоторых аспектах антитело против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают полипептид MUC16 человека, представляют собой scFv.

В любом из указанных выше или связанных аспектов антитело против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат области CDRL1, CDRL2 и CDRL3 в пределах аминокислотной последовательности варибельной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 7. В некоторых аспектах антитело против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат области CDRL1, CDRL2 и CDRL3 в пределах аминокислотной последовательности варибельной области легкой цепи, представленной в любой из SEQ ID NO: 47, 59, 71, 83, 95, 107, 119, 133 или 145. В некоторых аспектах антитело против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат области CDRH1, CDRH2 и CDRH3 в пределах аминокислотной последовательности варибельной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 8. В некоторых аспектах антитело против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат области CDRH1, CDRH2 и CDRH3 в пределах аминокислотной последовательности варибельной области тяжелой цепи, представленной в любой из SEQ ID NO: 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 134 или 146. В некоторых аспектах антитело против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат одну или более CDR, представленных в любой из SEQ ID NO: 1 — 3. В некоторых аспектах антитело против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат одну или более CDR, представленных в любой из (a) SEQ ID NO: 41 — 43, (b) SEQ ID NO: 53 — 55, (c) SEQ ID NO: 65 — 67, (d) SEQ ID NO: 77 — 79, (e) SEQ ID NO: 89 — 91, (f) SEQ ID NO: 101 — 103, (g) SEQ ID NO: 113 — 115, (h) SEQ ID NO: 127 — 129 или (i) SEQ ID NO: 139 — 141. В некоторых аспектах антитело против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат одну или более CDR, представленных в любой из SEQ ID NO: 4 — 6. В некоторых аспектах антитело против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат аминокислотную последовательность варибельной области легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 7. В некоторых аспектах антитело против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат аминокислотную последовательность варибельной области тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 8. В некоторых аспектах антитело против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат

одну или более CDR, представленных в любой из (a) SEQ ID NO: 44 — 46, (b) SEQ ID NO: 56 — 58, (c) SEQ ID NO: 68 — 70, (d) SEQ ID NO: 80 — 82, (e) SEQ ID NO: 92 — 94, (f) SEQ ID NO: 104 — 106, (g) SEQ ID NO: 116 — 118, (h) SEQ ID NO: 130 — 132 или (i) SEQ ID NO: 142 — 144.

В любом из указанных выше или связанных аспектов антитело против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, идентичную по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% последовательности SEQ ID NO: 7, или содержат SEQ ID NO: 7. В некоторых аспектах антитело против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, идентичную по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% любой из последовательностей SEQ ID NO: 47, 59, 71, 83, 95, 107, 119, 133 или 145, или содержат указанные последовательности. В некоторых аспектах антитело против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, идентичную по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% последовательности SEQ ID NO: 8, или содержат SEQ ID NO: 8. В некоторых аспектах антитело против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, идентичную по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% любой из последовательностей SEQ ID NO: 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 134 или 146, или содержат указанные последовательности.

В любом из указанных выше или связанных аспектов трансмембранный домен получен из полипептида, выбранного из группы, состоящей из альфа-, бета- или дзета-цепи T-клеточного рецептора, CD3ε, CD3ζ, CD4, CD5, CD8α, CD9, CD16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD152, CD154 и PD1. В некоторых аспектах трансмембранный домен получен из полипептида, выбранного из группы, состоящей из CD8α, CD4, CD45, PD1 и CD154. В некоторых аспектах трансмембранный домен получен из CD8α. В некоторых аспектах трансмембранный домен содержит последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательности SEQ ID NO: 154, или содержит SEQ ID NO: 154. В одном варианте реализации трансмембранный домен

содержит последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% последовательности SEQ ID NO: 154. В одном варианте реализации трансмембранный домен содержит SEQ ID NO: 154.

В любом из указанных выше или связанных аспектов один или более костимулирующих сигнальных доменов получены из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM и ZAP70. В некоторых аспектах один или более костимулирующих сигнальных доменов получены из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD28, CD134 и CD137 (4-1BB). В некоторых аспектах один или более костимулирующих сигнальных доменов получены из CD137 (4-1BB). В некоторых аспектах костимулирующий сигнальный домен содержит последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательности SEQ ID NO: 155, или содержит последовательность SEQ ID NO: 155. В одном варианте реализации костимулирующий сигнальный домен содержит последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% последовательности SEQ ID NO: 155. В одном варианте реализации костимулирующий сигнальный домен содержит SEQ ID NO: 155.

В любом из указанных выше или связанных аспектов первичный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых аспектах первичный сигнальный домен содержит последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную последовательности SEQ ID NO: 156, или содержит последовательность SEQ ID NO: 156. В одном варианте реализации первичный сигнальный домен содержит последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 156. В одном варианте реализации первичный сигнальный домен содержит SEQ ID NO: 156.

В любом из указанных выше или связанных аспектов CAR содержит полипептид шарнирной области. В некоторых аспектах полипептид шарнирной области содержит шарнирную область CD8 $\alpha$ . В некоторых аспектах полипептид шарнирной области содержит последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательности SEQ ID NO: 153, или содержит

SEQ ID NO: 153. В одном варианте реализации полипептид шарнирной области содержит последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 153. В одном варианте реализации полипептид шарнирной области содержит SEQ ID NO: 153.

В любом из указанных выше или связанных аспектов CAR содержит сигнальный пептид. В некоторых аспектах сигнальный пептид содержит сигнальный полипептид тяжелой цепи IgG1, сигнальный полипептид рецептора 2 гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSFR2), сигнальный полипептид Igκ или сигнальный полипептид CD8α. В некоторых аспектах сигнальный полипептид содержит сигнальный полипептид CD8α. В некоторых аспектах сигнальный полипептид содержит последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, последовательности SEQ ID NO: 152, или содержит последовательность. SEQ ID NO: 152. В одном варианте реализации сигнальный полипептид содержит последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 152. В одном варианте реализации сигнальный полипептид содержит SEQ ID NO: 152.

В любом из указанных выше или связанных аспектов CAR дополнительно содержит первый полипептидный линкер между переменным доменом тяжелой цепи и переменным доменом легкой цепи. В некоторых аспектах полипептидный линкер между доменом переменной области тяжелой цепи и доменом переменной области легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой SEQ ID NO: 14 — 25. В конкретных вариантах реализации полипептидный линкер между переменным доменом тяжелой цепи и переменным доменом легкой цепи содержит аминокислотный линкер 3xG4S, представленный в SEQ ID NO: 24.

В любом из указанных выше или связанных аспектов CAR дополнительно содержит второй полипептидный линкер между трансмембранным доменом и одним или более внутриклеточными костимулирующими сигнальными доменами. В некоторых аспектах полипептидный линкер между трансмембранным доменом и одним или более внутриклеточными костимулирующими сигнальными доменами содержит последовательность LYC.

В любом из указанных выше или связанных аспектов антитело против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат области CDRL1, CDRL2 и CDRL3 в пределах аминокислотной последовательности варибельной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 7, и области CDRH1, CDRH2 и CDRH3 в пределах аминокислотной последовательности варибельной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 8; трансмембранный домен получен из полипептида, выбранного из группы, состоящей из: CD8 $\alpha$ , CD4, CD45, PD1 и CD154; один или более костимулирующих сигнальных доменов получены из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD28, CD134 и CD137 (4-1BB); и первичный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ .

В любом из указанных выше или связанных аспектов антитело против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат области CDRL1, CDRL2 и CDRL3 в пределах аминокислотной последовательности варибельной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 7, и области CDRH1, CDRH2 и CDRH3 в пределах аминокислотной последовательности варибельной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 8; трансмембранный домен получен из CD8 $\alpha$ ; один или более костимулирующих сигнальных доменов получены из CD137 (4-1BB); и первичный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ .

В любом из указанных выше или связанных аспектов CAR содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательности SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 11, или содержит последовательности SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 11. В некоторых аспектах CAR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В некоторых аспектах CAR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11. В некоторых аспектах CAR содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% любой из последовательностей SEQ ID NO: 49, 50, 51, 52, 61, 62, 63, 64, 73, 74, 75, 76, 85, 86, 87, 88, 97, 98, 99, 100, 109, 110, 111, 112, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 135, 136, 137, 138, 147, 148, 149 или 150, или содержит любую из указанных последовательностей.

В некоторых аспектах в соответствии с настоящим изобретением предложен CAR, который конкурирует за связывание с одним или более эпитопами полипептида MUC16 человека с CAR, описанным в настоящей заявке.

В некоторых аспектах в соответствии с настоящим изобретением предложен полинуклеотид, кодирующий CAR, описанный в настоящей заявке. В некоторых аспектах полинуклеотидная последовательность, кодирующая CAR, представлена в SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 12. В некоторых аспектах в соответствии с настоящим изобретением предложен полинуклеотид, содержащий SEQ ID NO: 10. В некоторых аспектах в соответствии с настоящим изобретением предложен полинуклеотид, содержащий SEQ ID NO: 12. В некоторых аспектах указанная полинуклеотидная последовательность кодирует полипептид, идентичный по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% любой из SEQ ID NO: 9, 11, 49, 50, 51, 52, 61, 62, 63, 64, 73, 74, 75, 76, 85, 86, 87, 88, 97, 98, 99, 100, 109, 110, 111, 112, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 135, 136, 137, 138, 147, 148, 149 или 150, или содержащий любую из указанных последовательностей.

В некоторых аспектах в соответствии с настоящим изобретением предложен вектор, содержащий полинуклеотид, описанный в настоящей заявке. В некоторых вариантах реализации вектор представляет собой вектор экспрессии. В некоторых аспектах вектор представляет собой эписомный вектор. В некоторых аспектах вектор представляет собой вирусный вектор. В некоторых аспектах вектор представляет собой ретровирусный вектор. В некоторых аспектах вектор представляет собой лентивирусный вектор. В некоторых аспектах лентивирусный вектор выбран из группы, состоящей из вируса иммунодефицита человека 1 (ВИЧ-1); вируса иммунодефицита человека 2 (ВИЧ-2), вируса Висна-Маеди (VMV); вируса артрита-энцефалита коз (CAEV); вируса инфекционной анемии лошадей (EIAV); вируса иммунодефицита кошачьих (FIV); вируса иммунодефицита крупного рогатого скота (BIV) и вируса иммунодефицита обезьян (SIV). В некоторых аспектах вектор представляет собой вектор на основе аденоассоциированного вируса.

В любом из указанных выше или связанных аспектов вектор содержит левый (5') LTR ретровируса, сигнал упаковки Psi ( $\Psi$ ), центральный полипуриновый тракт/флэп ДНК (сРРТ/FLAP), элемент экспорта ретровируса; промотор, функционально связанный с полинуклеотидом, описанным в настоящей заявке; и правый (3') LTR ретровируса. В некоторых аспектах вектор содержит гетерологичную последовательность полиаденилирования. В некоторых аспектах промотор 5'-LTR заменен гетерологичным промотором. В некоторых аспектах гетерологичный промотор представляет собой

промотор цитомегаловируса (CMV), промотор вируса саркомы Рауса (RSV) или промотор вируса обезьян 40 (SV40). В некоторых аспектах 5'-LTR или 3'-LTR представляет собой LTR лентивируса. В некоторых аспектах 3'-LTR содержит одну или более модификаций. В некоторых аспектах 3'-LTR содержит одну или более делеций. В некоторых аспектах 3'-LTR представляет собой самоинактивирующийся (SIN) LTR. В некоторых аспектах промотор, функционально связанный с полинуклеотидом, описанным в данном документе, выбран из группы, состоящей из: промотора немедленно-ранних генов цитомегаловируса (CMV), промотора фактора элонгации 1-альфа (EF1- $\alpha$ ), промотора фосфоглицераткиназы 1 (PGK), промотора убиквитина-C (UBQ-C), энхансера цитомегаловируса/промотора бета-актина кур (CAG), энхансера полиомы/промотора тимидинкиназы вируса простого герпеса (MC1), промотора бета-актина ( $\beta$ -ACT), промотора вируса обезьян 40 (SV40), и промотора MND с энхансером вируса миелопролиферативной саркомы, с делецией участка, опосредующего отрицательную регуляцию, с сайтом связывания праймера, замещенным на последовательность из dl587rev. В некоторых аспектах промотор, функционально связанный с полинуклеотидом, описанным в настоящей заявке, представляет собой промотор MND.

В некоторых аспектах в соответствии с настоящим изобретением предложена клетка, содержащая вектор, описанный в настоящей заявке. В некоторых аспектах в соответствии с настоящим изобретением предложена клетка, содержащая CAR, описанный в настоящей заявке. В некоторых аспектах клетка представляет собой иммунную эффекторную клетку. В некоторых аспектах иммунная эффекторная клетка представляет собой цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL) или хелперную Т-клетку. В некоторых аспектах клетка представляет собой Т-клетку. В некоторых аспектах клетка представляет собой  $\alpha\beta$ -Т-клетку,  $\gamma\delta$ -Т-клетку, клетку - естественного киллера (NK) или Т-клетку - естественного киллера (NKT).

В некоторых аспектах в соответствии с настоящим изобретением предложена композиция, содержащая клетку, описанную в настоящей заявке. В некоторых аспектах в соответствии с настоящим изобретением предложена фармацевтическая композиция, содержащая клетку, описанную в настоящей заявке, и физиологически приемлемое вспомогательное вещество.

В некоторых аспектах настоящего изобретения предложен способ получения иммунной эффекторной клетки, содержащей CAR, описанный в настоящей заявке, включающий введение в иммунную эффекторную клетку полинуклеотида или вектора, описанных в настоящей заявке.

В некоторых аспектах в соответствии с настоящим изобретением предложен способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции, описанной в настоящей заявке. В некоторых аспектах рак представляет собой солидный рак, причем необязательно солидный рак экспрессирует MUC16. В некоторых аспектах солидный рак выбран из группы, состоящей из саркомы, рака предстательной железы, рака матки, рака щитовидной железы, рака яичка, рака почки, рака поджелудочной железы, рака яичника, рака шейки матки, мезотелиомы, рака пищевода, рака легкого, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), мелкоклеточного рака легкого (SCLC), меланомы, гепатоцеллюлярной карциномы, рака головы и шеи, рака желудка, рака эндометрия, рака фаллопиевой трубы, колоректального рака, холангиокарциномы, рака молочной железы и рака мочевого пузыря. В некоторых аспектах солидный рак выбран из группы, состоящей из рака яичника, рака эндометрия, рака шейки матки, мезотелиомы, NSCLC и SCLC. В некоторых аспектах солидный рак представляет собой рак яичника.

В любом из указанных выше или связанных аспектов композицию вводят в комбинации с дополнительным терапевтическим средством.

В некоторых аспектах в соответствии с настоящим изобретением предложен способ лечения рака у субъекта, который получал или получает терапевтическое средство, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции, описанной в настоящей заявке.

В любом из указанных выше или связанных аспектов композицию и терапевтическое средство вводят последовательно или одновременно.

В любом из указанных выше или связанных аспектов терапевтическое средство представляет собой ингибитор иммунной контрольной точки, онколитический вирус или костимулирующее антитело. В некоторых аспектах ингибитор иммунной контрольной точки связывает белок контрольной точки или соответствующий лиганд,

выбранный из группы, состоящей из: белка 1 запрограммированной гибели клеток (PD-1; PDCD1), белка 3 гена активации лимфоцитов (LAG-3), белка 3, содержащего Т-клеточный иммуноглобулиновый домен и домен муцина (TIM-3), антигена-4 цитотоксических Т-лимфоцитов (CTLA-4), аттенуатора В- и Т-лимфоцитов (BTLA), индуцируемого глюкокортикоидами рецептора фактора некроза опухоли (GITR), домена Т-клеточного иммуноглобулина и тирозинсодержащего ингибиторного мотива иммунорецептора (TIGIT), содержащего V-домен Ig супрессора активации Т-клеток (VISTA), иммуноглобулин-подобного рецептора (KIR) клеток-киллеров, ICOS, ICOSL, OX40, B7-H3, B7-H4, CD47, 4-1BB, CD27 и CD70. В некоторых аспектах ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой ингибитор PD-1 или ингибитор PD-L1. В некоторых аспектах ингибитор PD-1 или ингибитор PD-L1 представляет собой антитело против PD-1 или антитело против PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых аспектах ингибитор PD-1 выбран из группы, состоящей из ниволизумаба, пембролизумаба, атезолизумаба и цемиплимаба.

В любом из указанных выше или связанных аспектов костимулирующее антитело представляет собой биспецифическое антитело. В некоторых аспектах биспецифическое антитело связывает опухолеассоциированный антиген (ТАА) и CD3. В некоторых аспектах биспецифическое антитело связывает ТАА и CD28. В некоторых аспектах ТАА выбран из группы, состоящей из: AFP, ALK, белков BAGE,  $\beta$ -катенина, bcr-abl, BRCA1, BORIS, CA9, карбоангидразы IX, каспазы-8, CCR5, CD40, CDK4, CEA, CTLA4, циклина-B1, CYP1B1, ErbB3, ErbB4, ETV6-AML, Fra-1, FOLR1, белков GAGE (например, GAGE-1, -2), GD2, GloboH, глипикана-3, GM3, gp100, Her2, HLA/B-raf, HLA/k-ras, HLA/MAGE-A3, hTERT, LMP2, MART-1, ML-IAP, Muc1, Muc2, Muc3, Muc4, Muc5, Muc16, MUM1, NA17, NY-BR1, NY-BR62, NY-BR85, OX40, p15, p53, PAP, PAX3, PAX5, PCTA-1, PRLR, белков RAGE, Ras, RGS5, Rho, SART-1, SART-3, Steap-1, Steap-2, сурвивина, TGF- $\beta$ , TMPRSS2, Tn, TRP-1, TRP-2, тирозиназы, уроплакина-3, рецептора фолиевой кислоты альфа (FR $\alpha$ ), интегрина  $\alpha$ v $\beta$ 6, антигена созревания В-клеток (BCMA), B7-H3 (CD276), B7-H6, карбоангидразы IX (CAIX), CCR1, CD16, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD37, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD133, CD135 (также известного как fms-подобная тирозинкиназа 3; FLT3), CD138, CD171, карциноэмбрионального антигена (CEA), клаудина-6 (CLDN6), подобной лектину С-типа молекулы 1 (CLL-1), белка подгруппы 1 CD2 (CS-1), хондроитинсульфат-протеогликана 4 (CSPG4), антигена 1,

ассоциированного с Т-клеточной лимфомой кожи (CTAGE1), рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), варианта III рецептора эпидермального фактора роста (EGFRvIII), эпителиального гликопротеина 2 (EGP2), эпителиального гликопротеина 40 (EGP40), молекулы адгезии эпителиальных клеток (EPCAM), рецептора 2 эфрина типа А (EPHA2), белка активации фибробластов (FAP), белка 5, подобного Fc-рецептору (FCRL5), фетального рецептора ацетилхолинэстеразы (AChR), ганглиозида G2 (GD2), ганглиозида G3 (GD3), глипикана-3 (GPC3), семейства EGFR, включая ErbB2 (HER2), IL-11R $\alpha$ , IL-13R $\alpha$ 2, каппа, раково-тестикулярного антигена 2 (LAGE-1A), лямбда, Льюис-Y (LeY), молекулы клеточной адгезии L1 (L1-CAM), представителя 2 подсемейства В иммуноглобулин-подобного рецептора лейкоцитов (LILRB2); гена антигена меланомы (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGEA10, антигена меланомы 1, распознаваемого Т-клетками (MelanA или MART1), мезотелина (MSLN), молекулы адгезии нервных клеток (NCAM), раково-тестикулярного антигена 1 (NY-ESO-1), полисиаловой кислоты; специфического для плаценты белка 1 (PLAC1), преимущественно экспрессируемого меланомой антигена (PRAME), антигена стволовых клеток предстательной железы (PSCA), простатспецифического мембранного антигена (PSMA), орфанного рецептора 1, подобного рецепторной тирозинкиназе (ROR1), белка точки разрыва-2 хромосомы X при синовиальной саркоме (SSX2), опухольассоциированного гликопротеина 72 (TAG72), белка 3, содержащего Т-клеточный иммуноглобулиновый домен и домен муцина (TIM-3), эндотелиального маркера опухоли 1 (TEM1/CD248), родственного эндотелиальному маркеру опухоли белка 7 (TEM7R), трофобластического гликопротеина (TPBG), лигандов NKG2D, рецептора фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGFR2) и белка 1 опухоли Вильмса (WT-1). В некоторых аспектах ТАА представляет собой MSLN. В некоторых аспектах ТАА представляет собой рецептор фолиевой кислоты альфа (FR $\alpha$ ). В некоторых аспектах ТАА представляет собой MUC16.

В любом из указанных выше или связанных аспектов терапевтическое средство представляет собой ингибитор фактора роста эндотелия сосудов (VEGF). В одном варианте реализации ингибитор VEGF представляет собой бевацизумаб. В одном варианте реализации терапевтическое средство представляет собой цитокин. В одном варианте реализации цитокин представляет собой IL-2 или маскированный IL-2. В одном варианте реализации терапевтическое средство представляет собой

онколитический вирус. В некоторых вариантах реализации онколитический вирус выбран из группы, состоящей из VSV (Voyager V1), HSV, аденовируса, вируса Мараба, вируса кори, NDV, пикорнавируса, реовируса или вируса осповакцины. В одном варианте реализации онколитический вирус представляет собой Voyager V1.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ**

На **фигуре 1** представлено схематическое изображение полипептида MUC16.

На **фигуре 2** представлен график, показывающий число копий вектора (VCN) из Т-клеток здорового донора, трансдуцированных каждым из показанных векторов с CAR против MUC16.

На **фигуре 3** представлен график, показывающий экспрессию CAR на Т-клетках здорового донора, трансдуцированных каждым из показанных векторов с CAR против MUC16.

На **фигуре 4А** представлен график, показывающий высвобождение IFN $\gamma$  из Т-клеток с CAR против MUC16.

На **фигуре 4В** представлен график, показывающий высвобождение IFN $\gamma$  из Т-клеток с CAR против MUC16, совместно культивируемых в присутствии клеток OVCAR3, которые экспрессируют MUC16.

На **фигуре 4С** представлен график, показывающий высвобождение IFN $\gamma$  из Т-клеток с CAR против MUC16, совместно культивируемых в присутствии клеток Jurkat, которые не экспрессируют MUC16.

На **фигуре 4D** представлен график, показывающий высвобождение IFN $\gamma$  из Т-клеток с CAR против MUC16, совместно культивируемых в присутствии клеток PANC-1, которые не экспрессируют MUC16.

На **фигуре 5** показано высвобождение IFN $\gamma$  из Т-клеток с CAR против MUC16, совместно культивируемых в присутствии отрицательных по антигену линий опухолевых клеток (Jurkat, PANC-1, HUH7, K562, A549 и RD)

На **фигуре 6А** показана экспрессия эктодомена MUC16 в клетках RD, стабильно экспрессирующих высокие, средние или низкие уровни эктодомена MUC16.

На **фигуре 6B** показано высвобождение  $IFN\gamma$  из Т-клеток с CAR против MUC16, совместно культивируемых с клетками RD, стабильно экспрессирующими высокие, средние или низкие уровни эктодомена MUC16.

На **фигуре 7A** показано число копий мРНК выпуклости MUC16 в опухолевых клетках K562, в которые путем электропорации ввели титрованные количества мРНК выпуклости MUC16.

На **фигуре 7B** показано высвобождение  $IFN\gamma$  из Т-клеток с CAR против MUC16, совместно культивируемых с опухолевыми клетками K562, экспрессирующими титрованные количества введенной путем электропорации мРНК выпуклости MUC16.

На **фигуре 8A** показана цитотоксичность Т-клеток с CAR против MUC16, совместно культивируемых с клетками RD, экспрессирующими высокие, средние или низкие уровни эктодомена MUC16, при соотношениях эффектора к Т-клеткам (Э:М), составляющем 10:1, 5:1 и 2,5:1.

На **фигуре 8B** показана цитотоксичность Т-клеток с CAR против MUC16, совместно культивируемых с клетками RD, которые экспрессируют высокие, средние или низкие уровни эктодомена MUC16, при соотношении эффектора к Т-клеткам (Э:М), составляющем 2,5:1.

На **фигуре 9** показан анализ фенотипических маркеров с помощью проточной цитометрии Т-клеток с CAR против MUC16.

На **фигурах 10A** и **10B** представлены графики, демонстрирующие продуцирование  $IFN\gamma$  клетками, экспрессирующими CAR против MUC16, культивируемыми в присутствии эктодомена выпуклости MUC16 (**фигура 10A**) или CA125 (**фигура 10B**).

На **фигуре 11** представлен график, демонстрирующий уменьшение количества экспрессирующих MUC16 и люциферазу опухолевых клеток OVCAR3.FP, что показано по снижению экспрессии люциферазы. Через 14 дней после инокуляции мышей клетками OVCAR3.FP, для мышей, которых лечили Т-клетками с CAR против MUC16, демонстрировали снижение уровня люциферазы. Мышам повторно вводили опухолевые клетки OVCAR3.FP через 28 дней после введения Т-клеток с CAR против MUC16, и количество опухолевых клеток снижалось, что указывает на персистенцию Т-клеток с CAR против MUC16. Контролями служили нетрансдуцированные клетки

(UTD), не получившие лечения мыши (OVCAR3.FP) и клетки, трансдуцированные только средой-носителем (носитель).

На **фигурах 12A, 12B и 12C** показана противоопухолевая активность Т-клеток с CAR против MUC16, трансдуцированных указанными конструкциями CAR против MUC16, у мышей NGS, которым инокулировали опухолевые клетки OVCAR3.

На **фигурах 13A, 13B и 13C** показана противоопухолевая активность Т-клеток с CAR против MUC16, трансдуцированных указанными конструкциями CAR против MUC16 в модели опухоли OVCAR3.FP IP.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИДЕНТИФИКАТОРОВ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

В **SEQ ID NO: 1 — 3** представлены аминокислотные последовательности типичных CDR легкой цепи scFv против MUC16 для CAR против MUC16, предложенных в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 4 — 6** представлены аминокислотные последовательности типичных CDR тяжелой цепи scFv против MUC16 для CAR против MUC16, предложенных в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 7** представлена аминокислотная последовательность типичной варибельной области легкой цепи scFv против MUC16 для CAR против MUC16, предложенных в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 8** представлена аминокислотная последовательность типичной варибельной области тяжелой цепи scFv против MUC16 для CAR против MUC16, предложенных в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 9** представлена аминокислотная последовательность типичного CAR против MUC16 без сигнального пептида, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 10** представлена нуклеотидная последовательность типичного CAR против MUC16 без сигнального пептида, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 11** представлена аминокислотная последовательность типичного CAR против MUC16, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 12** представлена нуклеотидная последовательность типичного CAR против MUC16, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 13** представлена аминокислотная последовательность MUC16 человека.

В **SEQ ID NO: 14 — 25** представлены аминокислотные последовательности типичных линкеров, подходящих для применения в CAR против MUC16, предложенных в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 26 — 35** представлены аминокислотные последовательности типичных сайтов расщепления 2A.

В **SEQ ID NO: 36 — 38**, представлены аминокислотные последовательности типичных сайтов расщепления.

В **SEQ ID NO: 39** представлена аминокислотная последовательность фрагмента MUC16 человека после протеолитического расщепления, содержащего метку мус-мус-his.

В **SEQ ID NO: 40** представлена аминокислотная последовательность MUC16 человека, в котором отсутствует антиген эктодомена выпуклости (CA125).

В **SEQ ID NO: 41 — 43** представлены аминокислотные последовательности типичных CDR легкой цепи scFv против MUC16 для CAR против MUC16, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 44 — 46** представлены аминокислотные последовательности типичных CDR тяжелой цепи scFv против MUC16 для CAR против MUC16, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 47** представлена аминокислотная последовательность типичной переменной области легкой цепи scFv против MUC16 для CAR против MUC16, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 48** представлена аминокислотная последовательность типичной переменной области тяжелой цепи scFv против MUC16 для CAR против MUC16, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 49** представлена аминокислотная последовательность типичного CAR против MUC16 без сигнального пептида, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 50** представлена аминокислотная последовательность типичного CAR против MUC16, содержащего сигнальный пептид, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 51** представлена аминокислотная последовательность типичного CAR против MUC16 без сигнального пептида, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 52** представлена аминокислотная последовательность типичного CAR против MUC16, содержащего сигнальный пептид, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 53 — 55** представлены аминокислотные последовательности типичных CDR легкой цепи scFv против MUC16 для CAR против MUC16, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 56 — 58**, представлены аминокислотные последовательности типичных CDR тяжелой цепи scFv против MUC16 для CAR против MUC16, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 59** представлена аминокислотная последовательность типичной вариабельной области легкой цепи scFv против MUC16 для CAR против MUC16, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 60** представлена аминокислотная последовательность типичной вариабельной области тяжелой цепи scFv против MUC16 для CAR против MUC16, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 61** представлена аминокислотная последовательность типичного CAR против MUC16 без сигнального пептида, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 62** представлена аминокислотная последовательность типичного CAR против MUC16, содержащего сигнальный пептид, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 63** представлена аминокислотная последовательность типичного CAR против MUC16 без сигнального пептида, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 64** представлена аминокислотная последовательность типичного CAR

против MUC16, содержащего сигнальный пептид, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 65 — 67** представлены аминокислотные последовательности типичных CDR легкой цепи scFv против MUC16 для CAR против MUC16, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 68 — 70** представлены аминокислотные последовательности типичных CDR тяжелой цепи scFv против MUC16 для CAR против MUC16, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 71** представлена аминокислотная последовательность типичной варибельной области легкой цепи scFv против MUC16 для CAR против MUC16, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 72** представлена аминокислотная последовательность типичной варибельной области тяжелой цепи scFv против MUC16 для CAR против MUC16, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 73** представлена аминокислотная последовательность типичного CAR против MUC16 без сигнального пептида, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 74** представлена аминокислотная последовательность типичного CAR против MUC16, содержащего сигнальный пептид, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 75** представлена аминокислотная последовательность типичного CAR против MUC16 без сигнального пептида, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 76** представлена аминокислотная последовательность типичного CAR против MUC16, содержащего сигнальный пептид, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 77 — 79** представлены аминокислотные последовательности типичных CDR легкой цепи scFv против MUC16 для CAR против MUC16, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 80 — 82** представлены аминокислотные последовательности типичных CDR тяжелой цепи scFv против MUC16 для CAR против MUC16, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 83** представлена аминокислотная последовательность типичной варибельной области легкой цепи scFv против MUC16 для CAR против MUC16, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 84** представлена аминокислотная последовательность типичной варибельной области тяжелой цепи scFv против MUC16 для CAR против MUC16, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 85** представлена аминокислотная последовательность типичного CAR против MUC16 без сигнального пептида, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 86** представлена аминокислотная последовательность типичного CAR против MUC16, содержащего сигнальный пептид, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 87** представлена аминокислотная последовательность типичного CAR против MUC16 без сигнального пептида, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 88** представлена аминокислотная последовательность типичного CAR против MUC16, содержащего сигнальный пептид, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 89 — 91** представлены аминокислотные последовательности типичных CDR легкой цепи scFv против MUC16 для CAR против MUC16, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 92 — 94** представлены аминокислотные последовательности типичных CDR тяжелой цепи scFv против MUC16 для CAR против MUC16, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 95** представлена аминокислотная последовательность типичной варибельной области легкой цепи scFv против MUC16 для CAR против MUC16, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 96** представлена аминокислотная последовательность типичной варибельной области тяжелой цепи scFv против MUC16 для CAR против MUC16, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 97** представлена аминокислотная последовательность типичного CAR против MUC16 без сигнального пептида, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 98** представлена аминокислотная последовательность типичного CAR против MUC16, содержащего сигнальный пептид, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 99** представлена аминокислотная последовательность типичного CAR против MUC16 без сигнального пептида, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 100** представлена аминокислотная последовательность типичного CAR против MUC16, содержащего сигнальный пептид, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 101 — 103** представлены аминокислотные последовательности типичных CDR легкой цепи scFv против MUC16 для CAR против MUC16, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 104 — 106** представлены аминокислотные последовательности типичных CDR тяжелой цепи scFv против MUC16 для CAR против MUC16, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 107** представлена аминокислотная последовательность типичной варибельной области легкой цепи scFv против MUC16 для CAR против MUC16, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 108** представлена аминокислотная последовательность типичной варибельной области тяжелой цепи scFv против MUC16 для CAR против MUC16, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 109** представлена аминокислотная последовательность типичного CAR против MUC16 без сигнального пептида, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 110** представлена аминокислотная последовательность типичного CAR против MUC16, содержащего сигнальный пептид, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 111** представлена аминокислотная последовательность типичного CAR против MUC16 без сигнального пептида, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 112** представлена аминокислотная последовательность типичного CAR против MUC16, содержащего сигнальный пептид, предложенного в настоящей заявке.

В SEQ ID NO: 113 — 115 представлены аминокислотные последовательности типичных CDR легкой цепи scFv против MUC16 для CAR против MUC16, предложенного в настоящей заявке.

В SEQ ID NO: 116 — 118 представлены аминокислотные последовательности типичных CDR тяжелой цепи scFv против MUC16 для CAR против MUC16, предложенного в настоящей заявке.

В SEQ ID NO: 119 представлена аминокислотная последовательность типичной варибельной области легкой цепи scFv против MUC16 для CAR против MUC16, предложенного в настоящей заявке.

В SEQ ID NO: 120 представлена аминокислотная последовательность типичной варибельной области тяжелой цепи scFv против MUC16 для CAR против MUC16, предложенного в настоящей заявке.

В SEQ ID NO: 121 представлена аминокислотная последовательность типичного CAR против MUC16 без сигнального пептида, предложенного в настоящей заявке.

В SEQ ID NO: 122 представлена аминокислотная последовательность типичного CAR против MUC16, содержащего сигнальный пептид, предложенного в настоящей заявке.

В SEQ ID NO: 123 представлена аминокислотная последовательность типичного CAR против MUC16 без сигнального пептида, предложенного в настоящей заявке.

В SEQ ID NO: 124 представлена аминокислотная последовательность типичного CAR против MUC16, содержащего сигнальный пептид, предложенного в настоящей заявке.

В SEQ ID NO: 125 представлена аминокислотная последовательность типичного CAR против MUC16 без сигнального пептида, предложенного в настоящей заявке.

В SEQ ID NO: 126 представлена аминокислотная последовательность типичного CAR против MUC16, содержащего сигнальный пептид, предложенного в настоящей заявке.

В SEQ ID NO: 127 — 129 представлены аминокислотные последовательности типичных CDR легкой цепи scFv против MUC16 для CAR против MUC16, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 130 — 132** представлены аминокислотные последовательности типичных CDR тяжелой цепи scFv против MUC16 для CAR против MUC16, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 133** представлена аминокислотная последовательность типичной варибельной области легкой цепи scFv против MUC16 для CAR против MUC16, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 134** представлена аминокислотная последовательность типичной варибельной области тяжелой цепи scFv против MUC16 для CAR против MUC16, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 135** представлена аминокислотная последовательность типичного CAR против MUC16 без сигнального пептида, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 136** представлена аминокислотная последовательность типичного CAR против MUC16, содержащего сигнальный пептид, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 137** представлена аминокислотная последовательность типичного CAR против MUC16 без сигнального пептида, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 138** представлена аминокислотная последовательность типичного CAR против MUC16, содержащего сигнальный пептид, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 139 — 141** представлены аминокислотные последовательности типичных CDR легкой цепи scFv против MUC16 для CAR против MUC16, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 142 — 144** представлены аминокислотные последовательности типичных CDR тяжелой цепи scFv против MUC16 для CAR против MUC16, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 145** представлена аминокислотная последовательность типичной варибельной области легкой цепи scFv против MUC16 для CAR против MUC16, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 146** представлена аминокислотная последовательность типичной варибельной области тяжелой цепи scFv против MUC16 для CAR против MUC16, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 147** представлена аминокислотная последовательность типичного CAR против MUC16, в которой отсутствует сигнальный пептид, предложенный в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 148** представлена аминокислотная последовательность типичного CAR против MUC16, содержащего сигнальный пептид, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 149** представлена аминокислотная последовательность типичного CAR против MUC16 без сигнального пептида, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 150** представлена аминокислотная последовательность типичного CAR против MUC16, содержащего сигнальный пептид, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 151** представлена аминокислотная последовательность фрагмента MUC16 человека после протеолитического расщепления без метки мус-мус-his.

В **SEQ ID NO: 152** представлена аминокислотная последовательность типичного сигнального пептида, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 153** представлена аминокислотная последовательность типичного пептида шарнирной области, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 154** представлена аминокислотная последовательность типичного пептида трансмембранной области, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 155** представлена аминокислотная последовательность типичного костимулирующего пептида, предложенного в настоящей заявке.

В **SEQ ID NO: 156** представлена аминокислотная последовательность типичного пептида сигнальной области, предложенного в настоящей заявке.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

**А. Обзор**

В некоторых вариантах реализации в соответствии с настоящим изобретением предложены химерные антигенные рецепторы (CAR), содержащие связывающий домен для связывания с MUC16. MUC16, также известный как раковый антиген 125, антиген карциномы 125, углеводный антиген 125 или CA-125, представляет собой интегральный мембранный гликопротеин с высокой степенью гликозилирования. MUC16 экспрессируется на повышенном уровне при раке, включая рак яичника, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, немелкоклеточный рак легкого, внутриспеченочную холангиокарциному массивного типа, аденокарциному шейки матки и аденокарциному желудочного тракта, а также при заболеваниях и состояниях, включая воспалительное заболевание кишечника, цирроз печени, сердечную недостаточность, перитонеальную инфекцию и абдоминальное хирургическое вмешательство (Haridas, D. et al., 2014, FASEB J., 28:4183-4199), и было показано, что экспрессия MUC16 на раковых клетках защищает раковые клетки от иммунной системы (Felder, M. et al., 2014, Molecular Cancer, 13:129). В некоторых вариантах реализации иммунные эффекторные клетки, экспрессирующие CAR, содержащие домен связывания с MUC16, неожиданно демонстрируют повышенный иммунный ответ и цитотоксичность по сравнению с нетрансдуцированными эффекторными клетками при совместном культивировании с раковыми клетками.

MUC16 содержит один трансмембранный домен, состоящий из трех основных доменов: внеклеточного N-концевого домена, большого домена тандемных повторов с рассеянными доменами спермы морского ежа, энтерокиназы и агрина (SEA), и карбоксиконцевого домена, который содержит сегмент трансмембранной области и короткий цитоплазматический хвост. На **фигуре 1** представлена схема, показывающая домены MUC16. После протеолитического расщепления MUC16 большая часть внеклеточной части отщепляется и уходит в кровоток. Фрагмент MUC16 остается на поверхности клетки. В некоторых вариантах реализации MUC16 содержит 16 SEA-доменов на C-конце полипептида, пронумерованных от 1 до 16 от N-конца к C-концу. В некоторых вариантах реализации фрагмент MUC16, оставшийся на поверхности клетки, содержит SEA-домены 12 — 16. В некоторых вариантах реализации CAR, описанные в настоящей заявке, селективно связывают SEA-домены 12 — 16 MUC16. В

некоторых вариантах реализации CAR, описанные в настоящей заявке, не связывают SEA-домены 1 — 11 в MUC16.

Технологии рекомбинантных (т. е. сконструированных) ДНК, синтез пептидов и олигонуклеотидов, иммуноанализы, культуры тканей, трансформации (например, электропорация, липофекция), ферментативные реакции, очистка и связанные с ними методики и процедуры, как правило, могут быть осуществлены, как описано в различных общих и более конкретных источниках в области микробиологии, молекулярной биологии, биохимии, молекулярной генетики, клеточной биологии, вирусологии и иммунологии, цитируемых и обсуждаемых в настоящем описании. См., например, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, дополненный в июле 2008 г.); *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Glover, *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I & II (IRL Press, Oxford Univ. Press USA, 1985); *Current Protocols in Immunology* (Edited by John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober 2001 John Wiley & Sons, NY, NY); *Real-Time PCR: Current Technology and Applications*, Edited by Julie Logan, Kirstin Edwards and Nick Saunders, 2009, Caister Academic Press, Norfolk, UK; Anand, *Techniques for the Analysis of Complex Genomes*, (Academic Press, New York, 1992); Guthrie and Fink, *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology* (Academic Press, New York, 1991); *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, Ed., 1984); *Nucleic Acid The Hybridization* (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1985); *Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1984); *Animal Cell Culture* (R. Freshney, Ed., 1986); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); *Next-Generation Genome Sequencing* (Janitz, 2008 Wiley-VCH); *PCR Protocols (Methods in Molecular Biology)* (Park, Ed., 3rd Edition, 2010 Humana Press); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press, 1986); научный трактат, *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells* (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Harlow and Lane, *Antibodies*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998); *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); *Handbook Of Experimental Immunology*, Volumes I-IV (D. M. Weir and CC Blackwell, eds., 1986); Roitt, *Essential Immunology*, 6th Edition, (Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988); *Current Protocols in Immunology* (Q. E.

Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach and W. Strober, eds., 1991); *Annual Review of Immunology*; а также монографии в журналах, таких как *Advances in Immunology*.

## **В. Определения**

Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют такое же значение, которое обычно понимают специалисты в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Хотя при практическом осуществлении или тестировании конкретных вариантов реализации могут применяться любые способы и материалы, схожие с описанными в настоящем документе или эквивалентные им, в настоящем документе описаны предпочтительные варианты реализации композиций, способов и материалов. Для целей настоящего изобретения ниже даны определения следующим терминам.

Термины в единственном числе используются в настоящем документе для обозначения одного или более чем одного (т. е. по меньшей мере одного или одного или более) такого термина. В качестве примера, «элемент» означает один элемент или один или более элементов.

Использование альтернативы (например, «или») следует понимать как одну из альтернатив, обе или любую их комбинацию.

Под термином «и/или» следует понимать одну из альтернатив или обе из них.

В контексте настоящего документа термин «приблизительно» или «примерно» относится к величине, уровню, значению, числу, частоте, проценту, измерению, размеру, количеству, массе или длине, которые варьируют на вплоть до 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1% от референсной величины, уровня, значения, числа, частоты, процента, измерения, размера, количества, массы или длины. В одном варианте реализации термин «приблизительно» или «примерно» относится к диапазону величины, уровня, значения, числа, частоты, процента, измерения, размера, количества, массы или длины  $\pm 15\%$ ,  $\pm 10\%$ ,  $\pm 9\%$ ,  $\pm 8\%$ ,  $\pm 7\%$ ,  $\pm 6\%$ ,  $\pm 5\%$ ,  $\pm 4\%$ ,  $\pm 3\%$ ,  $\pm 2\%$  или  $\pm 1\%$  от референсной величины, уровня, значения, числа, частоты, процента, измерения, размера, количества, массы или длины.

В одном варианте реализации диапазон, например, от 1 до 5, от приблизительно 1 до 5 или от приблизительно 1 до приблизительно 5, относится к каждому численному значению, входящему в указанный диапазон. Например, в одном неограничивающем и лишь типичном варианте реализации диапазон «от 1 до 5» эквивалентен указанию 1, 2, 3, 4, 5; или 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5 или 5,0; или 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9 или 5,0.

В контексте настоящего документа термин «по существу» относится к величине, уровню, значению, числу, частоте, проценту, измерению, размеру, количеству, массе или длине, которые составляют 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более от референсной величины, уровня, значения, числа, частоты, процента, измерения, размера, количества, массы или длины. В одном варианте реализации «по существу такой же» относится к величине, уровню, значению, числу, частоте, проценту, измерению, размеру, количеству, массе или длине, которые вызывают эффект, например, физиологический эффект, который является приблизительно таким же, как эффект, вызываемый референсной величиной, уровнем, значением, числом, частотой, процентом, измерением, размером, количеством, массой или длиной.

По всему тексту данного описания, если из контекста не следует иное, под словами «содержать», «содержит» и «содержащий» подразумевается включение указанной этапа или элемента, или группы этапов или элементов, но не исключение любого другого этапа или элемента, или группы этапов или элементов. Под термином «состоящий из» подразумевается включающий и ограниченный тем, что следует за фразой «состоящий из». Таким образом, фраза «состоящий из» указывает на то, что перечисленные элементы являются необходимыми или обязательными, и что никакие другие элементы не могут присутствовать. Под термином «по существу состоящий из» подразумевается включение любых элементов, перечисленных после этой фразы, и ограничение другими элементами, которые не препятствуют или не вносят вклад в активность или действие, указанные в настоящем описании для перечисленных элементов. Таким образом, фраза «по существу состоящий из» указывает на то, что перечисленные элементы являются необходимыми или обязательными, но при этом

отсутствуют другие элементы, которые в существенной степени влияют на активность или действие перечисленных элементов.

Упоминание по всему тексту настоящего описания «одного варианта реализации», «варианта реализации», «конкретного варианта реализации», «связанного варианта реализации», «некоторого варианта реализации», «дополнительного варианта реализации» или «еще одного варианта реализации», или их комбинаций, означает, что конкретный признак, структура или характеристика, описанные в связи с данным вариантом реализации, включены в по меньшей мере один вариант реализации. Таким образом, вышеуказанные фразы, присутствующие в различных местах по всему тексту данного описания, необязательно все относятся к одному и тому же варианту реализации. Кроме того, конкретные признаки, структуры или характеристики могут быть комбинированы любым подходящим образом в одном или более вариантах реализации. Также следует исходить из того, что утвердительное указание признака в одном варианте реализации служит основанием для исключения признака в конкретном варианте реализации.

### **С. Химерные антигенные рецепторы**

В некоторых вариантах реализации предложены улучшенные генетически сконструированные рецепторы, которые перенацеливают цитотоксичность иммунных эффекторных клеток на экспрессирующие MUC16 клетки. Эти генетически сконструированные рецепторы называют в настоящей заявке химерными антигенными рецепторами (CAR). CAR представляют собой молекулы, в которых сочетается специфичность на основе антител к требуемому антигену (например, MUC16) с внутриклеточным доменом, активирующим T-клеточный рецептор, с образованием химерного белка, который проявляет специфическую клеточную иммунную активность против MUC16. Используемый в данном документе термин «химерный» описывает, что молекула состоит из частей различных белков или ДНК разного происхождения.

В некоторых вариантах реализации CAR, предложенные в настоящей заявке, содержат внеклеточный домен (также называемый связывающим доменом или антигенсвязывающим доменом), который связывается с MUC16, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен. Взаимодействие антигенсвязывающего домена CAR против MUC16 с MUC16 на поверхности клетки-мишени приводит к

кластеризации CAR и передает стимул активации содержащей CAR клетке. Основной характеристикой CAR является их способность перенацеливать специфичность иммунных эффекторных клеток, тем самым запуская пролиферацию, продуцирование цитокинов, фагоцитоз или продуцирование молекул, которые могут опосредовать гибель клетки, экспрессирующей целевой антиген, способом, не зависящим от главного комплекса гистосовместимости (МНС), используя способности специфически нацеливаться на клетки моноклональных антител, растворимых лигандов или специфических для клеток корцепторов.

В некоторых вариантах реализации CAR содержит внеклеточный связывающий домен, который содержит человеческий связывающий домен, специфический к MUC16; трансмембранный домен; один или более внутриклеточных костимулирующих сигнальных доменов; и первичный сигнальный домен.

В некоторых вариантах реализации CAR содержит внеклеточный связывающий домен, который содержит человеческое антитело против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент; один или более шарнирных доменов или спейсерных доменов; трансмембранный домен; один или более внутриклеточных костимулирующих сигнальных доменов; и первичный сигнальный домен.

### *1. Связывающий домен*

В некоторых вариантах реализации CAR, предложенные в настоящей заявке, содержат внеклеточный связывающий домен, который содержит антитело против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с полипептидом MUC16 человека, экспрессируемым на клетке-мишени (например, раковой клетке). Используемый в данном документе термин «MUC16» относится к белку MUC16 человека, если не указано, что он происходит из вида, отличного от человека (например, «MUC16 мыши», «MUC16 обезьяны» и т. д.). MUC16 содержит три основных домена: внеклеточный N-концевой домен, большой домен тандемных повторов с рассеянными доменами спермы морского ежа, энтерокиназы и агрина (SEA), и карбоксиконцевой домен, который содержит сегмент трансмембранной области и короткий цитоплазматический хвост. Белок MUC16 человека имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, и/или имеет аминокислотную последовательность, представленную в NCBI под номером доступа

NP\_078966. Ближний к мембране домен MUC16 человека (P13810-P14451) («выпуклость» MUC16), содержащий метку тус-тус-his, представлен как SEQ ID NO: 39. Ближний к мембране домен MUC16 человека (P13810-P14451) («выпуклость» MUC16), в котором отсутствует метка тус-тус-his, представлен как SEQ ID NO: 151. Используемый в данном документе термин «CA125» относится к человеческому полипептиду MUC16 без ближнего к мембране домена MUC16 («выпуклости» MUC16), представленному как SEQ ID NO: 40.

Термины «выпуклость MUC16», «выпуклость», «эктодомен MUC16», «эктодомен выпуклости MUC16» и «эктодомен», используемые в данном документе, являются взаимозаменяемыми и относятся к ближнему к мембране домену или фрагменту полипептида MUC16, оставшимся на поверхности клетки после расщепления. В некоторых вариантах реализации эктодомен выпуклости MUC16 содержит SEA-домены 12 — 16.

Используемые в данном документе термины «связывающий домен», «внеклеточный домен», «внеклеточный связывающий домен», «антигенсвязывающий домен» и «внеклеточный антигенсвязывающий домен» используют взаимозаменяемо, и такие домены придают CAR способность специфически связываться с представляющим интерес целевым антигеном, например MUC16. Связывающий домен может быть получен из природного, синтетического, полусинтетического или рекомбинантного источника.

Термины «аффинность специфичного связывания» или «специфически связывает», или «специфически связанный», или «специфическое связывание», или «специфически нацеливается», используемые в данном документе, описывают связывание антитела против MUC16 или его антигенсвязывающего фрагмента (или CAR, содержащего его) с MUC16 с большей аффинностью связывания, чем фоновое связывание. Связывающий домен (или CAR, содержащий связывающий домен или слитый белок, содержащий связывающий домен) «специфически связывается» с MUC16, если он связывается или соединяется с MUC16 с аффинностью или  $K_a$  (т. е. равновесной константой ассоциации конкретного связывающего взаимодействия в единицах  $1/M$ ), например, большей или равной приблизительно  $10^5 M^{-1}$ . В некоторых вариантах реализации связывающий домен (или содержащий его слитый белок) связывается с мишенью с  $K_a$ , большей или равной приблизительно  $10^6 M^{-1}$ ,  $10^7 M^{-1}$ ,  $10^8 M^{-1}$ ,  $10^9 M^{-1}$ ,  $10^{10} M^{-1}$ ,  $10^{11} M^{-1}$ ,  $10^{12} M^{-1}$  или

$10^{13} \text{ M}^{-1}$ . «Высокоаффинные» связывающие домены (или содержащие их одноцепочечные слитые белки) относятся к связывающим доменам с  $K_a$ , составляющей по меньшей мере  $10^7 \text{ M}^{-1}$ , по меньшей мере  $10^8 \text{ M}^{-1}$ , по меньшей мере  $10^9 \text{ M}^{-1}$ , по меньшей мере  $10^{10} \text{ M}^{-1}$ , по меньшей мере  $10^{11} \text{ M}^{-1}$ , по меньшей мере  $10^{12} \text{ M}^{-1}$ , по меньшей мере  $10^{13} \text{ M}^{-1}$  или более.

В качестве альтернативы, аффинность может быть определена как равновесная константа диссоциации ( $K_d$ ) конкретного связывающего взаимодействия в единицах М (например, от  $10^{-5} \text{ M}$  до  $10^{-13} \text{ M}$  или меньше). Аффинности полипептидов связывающего домена и белков CAR в соответствии с настоящим изобретением можно легко определить с помощью обычных методик, например с помощью конкурентного анализа ELISA (твердофазного иммуноферментного анализа), или посредством связывающего взаимодействия, или анализа вытеснения с применением меченых лигандов, или с использованием устройства для поверхностно-плазмонного резонанса, такого как Biacore T100, которое доступно от Biacore, Inc., Пискатауэй, Нью-Джерси, или технологии оптических биосенсоров, такой как система EPIC или EnSpire, которые доступны от Corning и Perkin Elmer, соответственно (см. также, например, Scatchard *et al.* (1949) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51:660; и патенты США №№ 5283173; 5468614 или эквивалентные).

В некоторых вариантах реализации аффинность специфического связывания приблизительно в 2 раза превышает фоновое связывание, приблизительно в 5 раз превышает фоновое связывание, приблизительно в 10 раз превышает фоновое связывание, приблизительно в 20 раз превышает фоновое связывание, приблизительно в 50 раз превышает фоновое связывание, приблизительно в 100 раз превышает фоновое связывание или приблизительно в 1000 раз превышает фоновое связывание или больше.

В некоторых вариантах реализации внеклеточный связывающий домен CAR содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. «Антитело» относится к связывающему средству, которое представляет собой полипептид, содержащий по меньшей мере вариабельную область легкой цепи или тяжелой цепи иммуноглобулина, которая специфически распознает и связывает эпитоп антигена, такого как пептид, липид, полисахарид или нуклеиновая кислота, содержащие антигенную детерминанту, такую как детерминанта, распознаваемая иммунной клеткой.

Термин «антиген (АГ)» относится к соединению, композиции или веществу, которые могут стимулировать продуцирование антител или Т-клеточный ответ у животного, включая композиции (такие как композиция, которая содержит специфический для рака белок), которые инъецируют животному или которые поглощаются животным. Антиген вступает в реакцию с продуктами специфического гуморального или клеточного иммунитета, в том числе индуцированными гетерологичными антигенами, такими как описанные антигены. В некоторых вариантах реализации целевой антиген представляет собой эпитоп полипептида MUC16.

Термины «эпитоп» или «антигенная детерминанта» относятся к области антигена, с которой связывается связывающее средство. Эпитопы могут быть образованы как из смежных аминокислот, так и из несмежных аминокислот, которые располагаются рядом благодаря третичной укладке белка. Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, как правило, сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные третичной укладкой, как правило, утрачиваются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп обычно содержит по меньшей мере 3 и более часто по меньшей мере 5, приблизительно 9 или приблизительно 8 — 10 аминокислот в уникальной пространственной конформации.

Антитела включают их антигенсвязывающие фрагменты, такие как верблюжий Ig, Ig NAR, Fab-фрагменты, Fab'-фрагменты, F(ab)'2-фрагменты, F(ab)'3-фрагменты, Fv, белки одноцепочечных Fv («scFv»), бис-scFv, (scFv)<sub>2</sub>, минитела, диатела, триатела, тетратела, стабилизированные дисульфидными связями белки Fv («dsFv») и однодоменное антитело (sdAb, нанотело) и части полноразмерных антител, отвечающие за связывание антигена. Термин также включает генетически сконструированные формы, такие как химерные антитела (например, гуманизированные мышинные антитела), гетероконъюгатные антитела (такие как биспецифические антитела) и их антигенсвязывающие фрагменты. См. также Pierce Catalog and Handbook 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Рокфорд, Иллинойс); Kuby, J., Immunology, 3rd Ed., W. H. Freeman & Co., New York, 1997.

Используемое в данном документе выражение «биспецифическое антитело» означает антитело, содержащее по меньшей мере первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен. Каждый антигенсвязывающий домен в биспецифическом антителе содержит по меньшей мере одну CDR, которая отдельно или в комбинации с

одной или более дополнительными CDR и/или FR специфически связывается с конкретным антигеном.

Как будет понятно специалисту в данной области техники и как описано в другом месте данного документа, полное антитело содержит две тяжелые цепи и две легкие цепи. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области и первой, второй и третьей константных областей, тогда как каждая легкая цепь состоит из переменной области и константной области. Тяжелые цепи млекопитающих классифицируют как  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  и  $\mu$ . Легкие цепи млекопитающих классифицируют как  $\lambda$  или  $\kappa$ . Иммуноглобулины, содержащие тяжелые цепи  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  и  $\mu$ , классифицируют как иммуноглобулины (Ig)A, IgD, IgE, IgG и IgM. Полноразмерное антитело образует «Y»-образную форму. Стебель Y состоит из второй и третьей константных областей (и для IgE и IgM — четвертой константной области) двух тяжелых цепей, связанных вместе, и в шарнире образуются дисульфидные связи (межцепочечные). Тяжелые цепи  $\gamma$ ,  $\alpha$  и  $\delta$  содержат константную область, состоящую из трех tandemных (расположенных последовательно) доменов Ig, и шарнирную область для дополнительной гибкости; тяжелые цепи  $\mu$  и  $\epsilon$  содержат константную область, состоящую из четырех доменов иммуноглобулина. Вторую и третью константные области называют «доменом CH2» и «доменом CH3», соответственно. Каждое плечо Y содержит переменную область и первую константную область одной тяжелой цепи, связанные с переменной и константными областями одной легкой цепи. Переменные области легкой и тяжелой цепей отвечают за связывание антигена.

Переменные области легкой и тяжелой цепей содержат «каркасную» область (FR), прерывающуюся тремя гиперпеременными областями, также называемыми «определяющими комплементарность областями» или «CDR». CDR могут быть определены или идентифицированы с помощью обычных способов, например по последовательности в соответствии с Kabat *et al* (Wu, TT and Kabat, E. A., *J Exp Med.* 132(2):211-50, (1970); Borden, P. and Kabat E. A., *PNAS*, 84: 2440-2443 (1987); (см., Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Department of Health and Human Services, 1991, который настоящим включен в данную заявку посредством ссылки) или по структуре в соответствии с Chothia *et al* (Chothia, C. and Lesk, A.M., *J Mol. Biol.*, 196(4): 901—917 (1987), Chothia, C. *et al*, *Nature*, 342: 877—883 (1989)).

Последовательности каркасных областей различных легких или тяжелых цепей относительно консервативны внутри вида, такого как люди. Каркасная область антитела, то есть объединенные каркасные области составляющих ее легкой и тяжелой цепей, служит для позиционирования и выстраивания CDR в трехмерном пространстве. CDR в первую очередь отвечают за связывание с эпитопом антигена. CDR каждой цепи, как правило, называют CDR1, CDR2 и CDR3, пронумерованные последовательно, начиная с N-конца, а также, как правило, идентифицируют по цепи, в которой расположена конкретная CDR. Таким образом, CDR, расположенные в переменном домене тяжелой цепи антитела, обозначают как CDRH1, CDRH2 и CDRH3, тогда как CDR, расположенные в переменном домене легкой цепи антитела, обозначают как CDRL1, CDRL2 и CDRL3. Антитела с разными специфичностями (т. е. с разными сайтами связывания для разных антигенов) содержат разные CDR. Хотя именно CDR варьируются от антитела к антителу, лишь ограниченное количество положений аминокислот в CDR непосредственно вовлечены в связывание антигена. Эти положения в CDR называются определяющими специфичность остатками (SDR). Типичные примеры CDR легкой цепи, которые подходят для конструирования CAR против MUC16, предложенных в настоящей заявке, включают, но не ограничены последовательностями CDR, представленными в SEQ ID NO: 1 — 3. Типичные примеры CDR тяжелой цепи, которые подходят для конструирования CAR против MUC16, предложенных в настоящей заявке, включают, но не ограничены перечисленными: последовательности CDR, представленные в SEQ ID NO: 4 — 6.

Типичные примеры правил предсказания CDR легкой цепи включают следующие: CDR-L1 начинается приблизительно с остатка 24, ей предшествует Cys, длина составляет приблизительно 10 — 17 остатков и за ней следует Trp (как правило, Trp-Tyr-Gln, но также Trp-Leu-Gln, Trp-Phe-Gln, Trp-Tyr-Leu); CDR-L2 начинается приблизительно через 16 остатков после конца CDR-L1, ей обычно предшествует Ile-Tyr, но также Val-Tyr, Ile-Lys, Ile-Phe, и ее длина составляет 7 остатков; и CDR-L3 начинается приблизительно через 33 остатка после конца CDR-L2, ей предшествует Cys, ее длина составляет 7 — 11 остатков и за ней следует Phe-Gly-XXX-Gly (XXX представляет собой любую аминокислоту).

Типичные примеры правил предсказания CDR тяжелой цепи включают следующие: CDR-H1 начинается приблизительно с остатка 26, ей предшествует Cys-XXX-XXX-

XXX, ее длина составляет 10 - 12 остатков, и за ней следует Trp (обычно Trp-Val, но также Trp-Ile, Trp-Ala); CDR-H2 начинается приблизительно через 15 остатков после конца CDR-H1, ей обычно предшествует Leu-Glu-Trp-Ile-Gly, или ряд вариаций, ее длина составляет 16 — 19 остатков, и за ней следует Lys/Arg-Leu/Ile/Val/Phe/Thr/Ala-Thr/Ser/Ile/Ala; и CDR-H3 начинается приблизительно через 33 остатка после конца CDR-H2, ей предшествует Cys-XXX-XXX (как правило, Cys-Ala-Arg), ее длина составляет от 3 до 25 остатков и за ней следует Trp-Gly-XXX-Gly.

В некоторых вариантах реализации CDR легкой цепи и CDR тяжелой цепи определяют в соответствии со способом по Kabat. В некоторых вариантах реализации CDR легкой цепи и CDR2 и CDR3 тяжелой цепи определяют в соответствии со способом по Kabat, и CDR1 тяжелой цепи определяют в соответствии со способом AbM, который представляет собой компромисс между способами по Kabat и Chothia, см., например, Whitelegg N & Rees AR, *Protein Eng.* 2000 Dec;13(12):819-24 и *Methods Mol Biol.* 2004; 248:51-91. Программы для предсказания CDR общедоступны, например, AbYsis ([www.bioinf.org.uk/abysis/](http://www.bioinf.org.uk/abysis/)).

Упоминание «VH» или «VH» относится к вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина, включая таковую у антитела, Fv, scFv, dsFv, Fab или другого фрагмента антитела, описанного в данном документе. Упоминание «VL» или «VL» относится к вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина, включая таковую у антитела, Fv, scFv, dsFv, Fab или другого фрагмента антитела, описанного в данном документе.

«Моноклональное антитело» представляет собой антитело, продуцируемое одним клоном В-лимфоцитов или клеткой, которые были трансфицированы генами легкой и тяжелой цепей одного антитела. Моноклональные антитела получают с помощью способов, известных специалистам в данной области техники, например, путем получения гибридных образующих антитела клеток посредством слияния клеток миеломы с иммунными клетками селезенки. Моноклональные антитела включают гуманизированные моноклональные антитела.

«Химерное антитело» содержит каркасные остатки от одного вида, такого как человек, и CDR (которые обычно придают способность связывать антиген) от другого вида, такого как мышь. В конкретных предпочтительных вариантах реализации CAR,

предложенный в настоящей заявке, содержит антигенспецифический связывающий домен, который представляет собой химерное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

«Гуманизированное» антитело представляет собой иммуноглобулин, содержащий человеческую каркасную область и одну или более CDR из отличного от человеческого (например, мышинового, крысиного или синтетического) иммуноглобулина. Отличный от человеческого иммуноглобулин, предоставляющий CDR, называется «донором», а человеческий иммуноглобулин, предоставляющий каркас, называется «акцептором».

В конкретных вариантах реализации антитело против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент включают, но не ограничены перечисленными: верблюжий Ig (антитело верблюдовых (VHH)), NAR Ig, Fab-фрагменты, Fab'-фрагменты, F(ab)'<sub>2</sub>-фрагменты, F(ab)'<sub>3</sub>-фрагменты, Fv, одноцепочечное антитело Fv («scFv»), бис-scFv, (scFv)<sub>2</sub>, минитело, диатело, триатело, тетратело, стабилизированный дисульфидными связями белок Fv («dsFv») и однодоменное антитело (sdAb, нанотело).

Используемый в данном документе термин «верблюжий Ig» или «VHH верблюдовых» относится к наименьшей известной антигенсвязывающей единице антитела из тяжелой цепи (Koch-Nolte, *et al*, FASEB J., 21: 3490-3498 (2007)). Термин «антитело из тяжелой цепи» или «антитело верблюдовых» относится к антителу, которое содержит два домена VH и не содержит легких цепей (Riechmann L. *et al*, J. Immunol. Methods 231:25–38 (1999); WO94/04678; WO94/25591; патент США № 6005079).

«IgNAR» или «новый антигенный рецептор иммуноглобулина» относится к классу антител из иммунного репертуара акул, которые состоят из гомодимеров одного переменного домена нового антигенного рецептора (VNAR) и пяти константных доменов нового антигенного рецептора (CNAR). IgNAR представляют собой некоторые из наименьших известных каркасов на основе белков иммуноглобулинов, являются высокостабильными и обладают эффективными характеристиками связывания. Собственная стабильность может быть связана как с (i) лежащим в их основе каркасом Ig, в котором присутствует значительное количество заряженных и гидрофильных вышвыленных на поверхность остатков по сравнению с обычными доменами VH и VL антитела, обнаруженными в мышинных антителах; так и со (ii) стабилизирующими структурными особенностями в петлях определяющих комплементарность областей

(CDR), включая дисульфидные мостики между петлями и паттерны водородных связей внутри петель.

При расщеплении антител папаином образуется два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, называемых «Fab»-фрагментами, каждый из которых содержит один антигенсвязывающий участок, и остаточный «Fc»-фрагмент, название которого отражает его способность легко кристаллизоваться. Обработка пепсином приводит к получению фрагмента  $F(ab')_2$ , который содержит два сайта связывания антигена и все еще способен к перекрестному связыванию антигена.

«Fv» представляет собой минимальный фрагмент антитела, который содержит полный антигенсвязывающий участок. В одном варианте реализации разновидность двухцепочечного Fv состоит из димера одного переменного домена тяжелой и одного переменного домена легкой цепей в плотной нековалентной ассоциации. В разновидности одноцепочечного Fv (scFv) один переменный домен тяжелой и один переменный домен легкой цепей могут быть ковалентно связаны гибким пептидным линкером таким образом, что легкая и тяжелая цепи могут соединяться с образованием «димерной» структуры, аналогичной структуре в разновидности двухцепочечного Fv (scFv)<sub>2</sub>. Именно в этой конфигурации три гиперпеременные области (HVR) каждого переменного домена взаимодействуют с образованием антигенсвязывающего участка на поверхности димера VH-VL. В совокупности шесть HVR придают антителу специфичность связывания антигена. Тем не менее даже один переменный домен (или половина Fv, содержащая только три HVR, специфические к антигену) обладает способностью распознавать и связывать антиген, хотя и с более низкой аффинностью, чем полноразмерный сайт связывания.

Fab-фрагмент содержит переменные домены тяжелой и легкой цепей, а также содержит константный домен легкой цепи и первый константный домен (CH1) тяжелой цепи. Fab'-фрагменты отличаются от Fab-фрагментов добавлением нескольких остатков на карбоксильном конце домена CH1 тяжелой цепи, включая один или более цистеинов из шарнирной области антитела. Fab'-SH представляет собой обозначение в данном документе для Fab', в котором остаток(-ки) цистеина константных доменов несут свободную тиольную группу.  $F(ab')_2$  - фрагменты антитела изначально получали в виде пар Fab'-фрагментов, между которыми находятся цистеины шарнира. Также известны другие химические сочетания фрагментов антител.

Термин «диатела» относится к фрагментам антител с двумя антигенсвязывающими областями, при этом указанные фрагменты содержат переменный домен тяжелой цепи (VH), соединенный с переменным доменом легкой цепи (VL) в одной полипептидной цепи (VH-VL). При использовании линкера, слишком короткого, чтобы позволить спаривание между двумя доменами на одной цепи, домены вынуждены спариваться с комплементарными доменами другой цепи и создавать два антигенсвязывающих участка. Диатела могут быть бивалентными или биспецифическими. Диатела более подробно описаны, например, в EP 404097; WO 1993/01161; Hudson *et al.*, Nat. Med. 9:129—134 (2003); и Hollinger *et al.*, PNAS USA 90: 6444-6448 (1993). Триатела и тетраатела также описаны в Hudson *et al.*, Nat. Med. 9:129—134 (2003).

Термин «однодоменное антитело», или «sdAb», или «наноантитело» относится к фрагменту антитела, который состоит из переменной области тяжелой цепи антитела (домена VH) или переменной области легкой цепи антитела (домена VL) (Holt, L., *et al.*, Trends in Biotechnology, 21(11): 484—490).

Фрагменты антитела «одноцепочечный Fv» или «scFv» содержат домены VH и VL антитела, причем эти домены присутствуют в одной полипептидной цепи и в любой ориентации (например, VL-VH или VH-VL). Как правило, полипептид scFv дополнительно содержит полипептидный линкер между доменами VH и VL, который позволяет scFv образовывать требуемую структуру для связывания антигена. Обзор scFv см., например, в источнике Pluckthün, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York, 1994), pp. 269—315.

В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий связывающий домен представляет собой scFv. Одноцепочечные антитела можно клонировать из генов области V гибридомы, специфичной к требуемой мишени. Получение таких гибридом стало рутинным. Методика, которую можно применять для клонирования переменной области тяжелой цепи (VH) и переменной области легкой цепи (VL), была описана, например, в Orlandi *et al.*, PNAS, 1989; 86: 3833-3837.

В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен представляет собой scFv, который связывает полипептид MUC16 человека. Типичный пример переменной области тяжелой цепи, которая подходит для конструирования

CAR против MUC16, предложенных в настоящей заявке, представляет собой аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8. Типичный пример вариабельной области легкой цепи, которая подходит для конструирования CAR против MUC16, предложенных в настоящей заявке, представляет собой аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48. В некоторых вариантах реализации антигенсвязывающий домен CAR против MUC16 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 48. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность

SEQ ID NO: 47. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 47. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47.

В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60.

В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 60. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 59. В некоторых вариантах реализации антигенсвязывающий домен CAR против MUC16 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59.

В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную

последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 72. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 71. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71.

В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84.

В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 84. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 83. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83.

В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 96. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 95. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95.

В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 108. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 108. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 107. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 108, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107.

В некоторых вариантах реализации антигенспецифической связывающей домен CAR против MUC16 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120. В некоторых вариантах реализации антигенспецифической связывающей домен CAR против MUC16 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 120. В некоторых вариантах реализации антигенспецифической связывающей домен CAR против MUC16 содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 119. В некоторых вариантах реализации антигенспецифической связывающей домен CAR против MUC16 содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 119. В некоторых вариантах реализации антигенспецифической связывающей домен CAR против MUC16 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 119.

В некоторых вариантах реализации антигенспецифической связывающей домен CAR против MUC16 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 134. В некоторых вариантах реализации антигенспецифической связывающей домен CAR против MUC16 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 134. В некоторых вариантах реализации антигенспецифической связывающей домен CAR против MUC16 содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133. В некоторых вариантах реализации антигенспецифической связывающей домен CAR против MUC16 содержит

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 133. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 134, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 133.

В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 146. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 146. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 145. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 146, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 145.

MUC16-специфические связывающие домены, предложенные в настоящей заявке, также содержат одну, две, три, четыре, пять или шесть CDR. Такие CDR могут представлять собой CDR, отличные от человеческих, или измененные CDR, отличные от человеческих, выбранные из CDRL1, CDRL2 и CDRL3 легкой цепи и CDRH1, CDRH2 и CDRH3 тяжелой цепи. В некоторых вариантах реализации MUC16-специфический связывающий домен содержит (a) вариабельную область легкой цепи, которая содержит CDRL1 легкой цепи, CDRL2 легкой цепи и CDRL3 легкой цепи, и (b)

вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит CDRH1 тяжелой цепи, CDRH2 тяжелой цепи и CDRH3 тяжелой цепи.

В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит CDR легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 1 — 3. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит CDR тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 4 — 6. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит CDR легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 1 — 3 и CDR тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 4 — 6.

В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит CDR легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 41 — 43. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит CDR тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 44 — 46. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит CDR легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 41 — 43, и CDR тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 44 — 46.

В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит CDR легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 53 — 55. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит CDR тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 56 — 58. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит CDR легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 53 — 55, и CDR тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 56 — 58.

В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит CDR легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 65 — 67. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит CDR тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 68 — 70. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит CDR легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 65 — 67, и CDR тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 68 — 70.

В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит CDR легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 77 — 79. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит CDR тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 80 — 82. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит CDR легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 77 — 79, и CDR тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 80 — 82.

В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит CDR легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 89 — 91. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит CDR тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 92 — 94. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит CDR легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 89 - 91, и CDR тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 92 - 94.

В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит CDR легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 101 — 103. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит CDR тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 104 — 106. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит CDR легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 101 — 103, и CDR тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 104 — 106.

В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит CDR легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 113 — 115. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит CDR тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 116 — 118. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит CDR легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 113 — 115, и CDR тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 116 — 118.

В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит CDR легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 127 — 129. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR

против MUC16 содержит CDR тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 130 — 132. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит CDR легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 127 - 129, и CDR тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 130 - 132.

В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит CDR легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 139 — 141. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит CDR тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 142 — 144. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 содержит CDR легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 139 - 141, и CDR тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 142 - 144.

Дополнительные антитела против MUC16 и их антигенсвязывающие фрагменты известны из уровня техники. См., например, WO2018/058003, опубликованную 29 марта 2018 г., содержание каждой из которых явным образом в полном объеме включено в настоящую заявку посредством ссылки.

В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 связывает MUC16 человека в одном или более пяти ближних к мембране SEA-доменах MUC16 человека. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 связывает SEA-домены 12 — 16, пронумерованные от N-конца к С-концу, MUC16 человека. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 связывает SEA-домены MUC16 человека, представленные в остатках 13791 - 14451 последовательности SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 связывается в пределах остатков 13810 - 14451 последовательности SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 не связывает SEA-домены 1 — 11, пронумерованные от N-конца к С-концу, человеческого MUC16. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 не связывается в пределах остатков 1 — 13790 последовательности SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 не связывается в пределах остатков 1 — 13809 последовательности SEQ ID NO: 13. В некоторых

вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 связывается в пределах последовательности SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 связывается в пределах последовательности SEQ ID NO: 151. В некоторых вариантах реализации антигенспецифический связывающий домен CAR против MUC16 не связывается в пределах последовательности SEQ ID NO: 40.

## *2. Линкеры*

В некоторых вариантах реализации CAR, предложенные в настоящей заявке, могут содержать остатки линкера между различными доменами, например, добавленные для подходящего разделения доменов и конформации молекулы. В некоторых вариантах реализации линкер представляет собой линкерную последовательность вариабельной области. «Линкерная последовательность вариабельной области» представляет собой аминокислотную последовательность, которая соединяет домены  $V_H$  и  $V_L$  и выполняет функцию спейсера, совместимую с взаимодействием двух субсвязывающих доменов, так что полученный полипептид сохраняет аффинность специфического связывания с той же молекулой-мишенью, что и антитело, которое содержит те же вариабельные области легкой и тяжелой цепей. В других вариантах реализации линкер представляет собой линкерную последовательность между трансмембранным доменом и одним или более внутриклеточными доменами.

CAR, предложенные в настоящей заявке, могут содержать один, два, три, четыре или пять или более линкеров. В некоторых вариантах реализации длина линкера составляет от приблизительно 1 до приблизительно 25 аминокислот, от приблизительно 5 до приблизительно 20 аминокислот, или от приблизительно 10 до приблизительно 20 аминокислот, или любую длину из промежуточного количества аминокислот. В некоторых вариантах реализации длина линкера составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или более аминокислот.

Типичные примеры линкеров включают полимеры глицина ( $(G)_n$ ); полимеры глицин-серин ( $(G_{1-5}S_{1-5})_n$ ), где  $n$  представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере один, два, три, четыре или пять; полимеры глицин-аланин; полимеры аланин-серин; и другие гибкие линкеры, известные из уровня техники. Полимеры глицина и глицина-серина относительно неструктурированы и, следовательно, могут быть способны

служить в качестве нейтральной связки между доменами слитых белков, таких как CAR, описанные в настоящей заявке. Глицин имеет доступ к значительно большему пространству  $\phi$ - $\psi$ , даже по сравнению с аланином, и гораздо менее ограничен, чем остатки с более длинными боковыми цепями (см. Scheraga, Rev. Computational Chem. 11173-142 (1992)). Среднему специалисту в данной области техники будет понятно, что конструкция CAR может содержать линкеры, которые полностью или частично гибкие, так что линкер может содержать гибкий линкер, а также одну или более частей, которые придают менее гибкую структуру для обеспечения желаемой структуры CAR.

Другие типичные линкеры включают, но не ограничены перечисленными аминокислотными последовательностями: GGG; DGGGS (SEQ ID NO: 14); TGEKP (SEQ ID NO: 15) (см., например, Liu et al., PNAS 5525-5530 (1997)); GGRR (SEQ ID NO: 16) (Pomerantz et al. 1995, см. выше); (GGGS)<sub>n</sub>, где n = 1, 2, 3, 4 или 5 (SEQ ID NO: 17) (Kim et al., PNAS 93, 1156-1160 (1996.)); EGKSSGSGSESKVD (SEQ ID NO: 18) (Chaudhary et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:1066-1070); KESGSVSSEQLAQFRSLD (SEQ ID NO: 19) (Bird et al., 1988, Science 242:423-426), GGRRGGGS (SEQ ID NO: 20); LRQRDGERP (SEQ ID NO: 21); LRQKDGGGSERP (SEQ ID NO: 22); LRQKd(GGGS)<sub>2</sub> ERP (SEQ ID NO: 23). В некоторых вариантах реализации линкер представляет собой GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 24). В качестве альтернативы, гибкие линкеры могут быть рационально сконструированы с использованием компьютерной программы, способной моделировать как сайты связывания ДНК, так и сами пептиды (Desjarlais & Berg, PNAS 90:2256-2260 (1993), PNAS 91:11099-11103 (1994), или методами фагового дисплея. В некоторых вариантах реализации линкер содержит следующую аминокислотную последовательность: GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 25) (Cooper et al., Blood, 101(4): 1637-1644 (2003)). В одном варианте реализации линкер содержит последовательность LYC.

### 3. Спейсерный домен

В некоторых вариантах реализации за связывающим доменом CAR следуют один или более «спейсерных доменов», которые относятся к области, которая отводит антигенсвязывающий домен от поверхности эффекторной клетки для обеспечения надлежащего контакта клетка/клетка, связывания антигена и активации (Patel et al., Gene Therapy, 1999; 6: 412—419). Спейсерный домен может быть получен из природного, синтетического, полусинтетического или рекомбинантного источника. В

некоторых вариантах реализации спейсерный домен представляет собой часть иммуноглобулина, в том числе, но не ограничиваясь одной или более константными областями тяжелой цепи, например, CH2 и CH3. Спейсерный домен может содержать аминокислотную последовательность встречающейся в природе шарнирной области иммуноглобулина или измененной шарнирной области иммуноглобулина.

В некоторых вариантах реализации спейсерный домен содержит домены CH2 и CH3 IgG1 или IgG4.

#### ***4. Шарнирный домен***

В некоторых вариантах реализации за связывающим доменом CAR следуют один или более «шарнирных доменов» или «шарнирных областей», которые играют роль в расположении антигенсвязывающего домена вдали от поверхности эффекторной клетки для обеспечения надлежащего контакта клетка/клетка, связывания антигена и активации. В некоторых вариантах реализации CAR содержит один или более шарнирных доменов между связывающим доменом и трансмембранным доменом (ТМ). Шарнирный домен может быть получен из природного, синтетического, полусинтетического или рекомбинантного источника. Шарнирный домен может содержать аминокислотную последовательность встречающейся в природе шарнирной области иммуноглобулина или измененной шарнирной области иммуноглобулина.

«Измененная шарнирная область» относится к (а) встречающейся в природе шарнирной области с не более чем 30% замен аминокислот (например, до 25%, 20%, 15%, 10% или 5% замен или делеций аминокислот), (b) части встречающейся в природе шарнирной области, длина которой составляет по меньшей мере 10 аминокислот (например, по меньшей мере 12, 13, 14 или 15 аминокислот) не более чем с 30% замен аминокислот (например, до 25%, 20%, 15%, 10%, или 5% замен или делеций аминокислот), или (с) части встречающейся в природе шарнирной области, которая содержит кор шарнирной области (длина которого может составлять 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15, или по меньшей мере 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот). В некоторых вариантах реализации один или более остатков цистеина во встречающейся в природе шарнирной области иммуноглобулина могут быть заменены одним или более другими аминокислотными остатками (например, одним или более остатками серина). В качестве альтернативы или дополнения измененная шарнирная область

иммуноглобулина может содержать замену остатка пролина шарнирной области иммуноглобулина дикого типа на другой аминокислотный остаток (например, остаток серина).

Другие типичные шарнирные домены, подходящие для применения в CAR, описанных в данном документе, включают шарнирную область, полученную из внеклеточных областей мембранных белков I типа, таких как CD8 $\alpha$ , CD4, CD28 и CD7, которые могут представлять собой шарнирные области дикого типа из этих молекул или могут быть изменены. В одном варианте реализации шарнирный домен содержит шарнирную область CD28. В другом варианте реализации шарнирный домен содержит шарнирную область CD4. В другом варианте реализации шарнирный домен содержит шарнирную область CD8 $\alpha$ .

В различных вариантах реализации модифицированная шарнирная область содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% аминокислотной последовательности подходящего шарнирного домена/области, как предложено в данном документе и/или известно из уровня техники. В некоторых вариантах реализации модифицированная шарнирная область содержит шарнирную последовательность, предложенную в данном документе, содержащую 4 или меньше, 3 или меньше или 2 или меньше замен и/или делеций аминокислот.

В некоторых вариантах реализации один или более остатков цистеина во встречающейся в природе шарнирной области/домене могут быть заменены одним или более другими аминокислотными остатками с получением модифицированного шарнирного домена. В некоторых вариантах реализации модифицированный шарнирный домен содержит замену одного или более остатков цистеина на серин (серины) или аланин (аланины). В другом варианте реализации модифицированный шарнирный домен содержит замену одного или более остатков цистеина на серин (серины). В другом варианте реализации модифицированный шарнирный домен содержит замену одного или более остатков цистеина на аланин (аланины).

В конкретных вариантах реализации измененная шарнирная область содержит замену остатка пролина на другой аминокислотный остаток (например, остаток серина).

В некоторых аспектах шарнирная область содержит последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательности SEQ ID NO: 153, или содержит указанную последовательность. В одном варианте реализации полипептид шарнирной области содержит последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности SEQ ID NO: 153. В одном варианте реализации полипептид шарнирной области содержит SEQ ID NO: 153.

### **5. Трансмембранный (ТМ) домен**

В некоторых вариантах реализации CAR, предложенный в настоящей заявке, содержит трансмембранный домен. «Трансмембранный домен» или «ТМ-домен» представляет собой часть CAR, которая соединяет внеклеточную связывающую часть и внутриклеточный сигнальный домен и закрепляет CAR в плазматической мембране иммунной эффекторной клетки. ТМ-домен может быть получен из природного, синтетического, полусинтетического или рекомбинантного источника. ТМ-домен может быть получен (т. е. содержит по меньшей мере трансмембранную область(-и)) из альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$ , CD3 $\gamma$ , CD3 $\zeta$ , CD4, CD5, CD8 $\alpha$ , CD9, CD16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD152, CD154 и PD1. В конкретном варианте реализации ТМ-домен является синтетическим и преимущественно содержит гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин.

В некоторых аспектах CAR, предложенные в настоящей заявке, содержат ТМ-домен, полученный из CD8 $\alpha$ . В некоторых вариантах реализации трансмембранный домен содержит последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательности SEQ ID NO: 154, или содержит указанную последовательность. В одном варианте реализации трансмембранный домен содержит последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности SEQ ID NO: 154. В одном варианте реализации трансмембранный домен содержит SEQ ID NO: 154.

В некоторых вариантах реализации CAR, предложенный в настоящей заявке, содержит ТМ-домен, полученный из CD8 $\alpha$ , и короткий олиго- или полипептидный линкер, предпочтительно длиной 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот, который связывает

TM-домен и внутриклеточный сигнальный домен CAR. В некоторых вариантах реализации линкер представляет собой линкер на основе глицина-серина. В других вариантах реализации линкер представляет собой линкер LYS.

В другом аспекте CAR, предложенные в настоящей заявке, содержат TM-домен, полученный из CD28. В другом аспекте CAR, предложенные в настоящей заявке, содержат TM-домен, полученный из CD4.

### ***6. Внутриклеточный сигнальный домен***

В некоторых вариантах реализации CAR, предложенные в настоящей заявке, содержат внутриклеточный сигнальный домен. Термин «внутриклеточный сигнальный домен» относится к части CAR, которая участвует в передаче сигнала об эффективном связывании CAR против MUC16 с полипептидом MUC16 человека во внутреннее пространство иммунной эффекторной клетки, чтобы вызвать эффекторную функцию клетки, например, активацию, продукцию цитокинов, пролиферацию и цитотоксическую активность, включая высвобождение цитотоксических факторов в связанную с CAR клетку-мишень, или другие клеточные ответы, вызванные связыванием антигена с внеклеточным доменом CAR.

Термин «эффекторная функция» относится к специализированной функции иммунной эффекторной клетки. Эффекторная функция Т-клетки, например, может представлять собой цитолитическую активность, или содействие или активность, включая секрецию цитокина. Таким образом, термин «внутриклеточный сигнальный домен» относится к части белка, которая передает сигнал эффекторной функции и которая направляет клетку на осуществление специализированной функции. Хотя обычно можно использовать весь внутриклеточный сигнальный домен, во многих случаях нет необходимости использовать весь домен. В той степени, в которой используется усеченная часть внутриклеточного сигнального домена, такую усеченную часть можно использовать вместо всего домена при условии, что она передает сигнал эффекторной функции. Предполагается, что термин «внутриклеточный сигнальный домен» включает любую усеченную часть внутриклеточного сигнального домена, достаточную для передачи сигнала эффекторной функции.

Известно, что сигналов, генерируемых только посредством 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 разными классами внутриклеточных сигнальных доменов: первичными сигнальными доменами, которые инициируют антигензависимую первичную активацию посредством TCR (например, комплекса TCR/CD3), и костимулирующими сигнальными доменами, которые действуют антигеннезависимым образом для обеспечения вторичного или костимулирующего сигнала. В предпочтительных вариантах реализации CAR, предложенный в настоящей заявке, содержит внутриклеточный сигнальный домен, который содержит один или более «костимулирующих сигнальных доменов» и «первичный сигнальный домен».

Первичные сигнальные домены регулируют первичную активацию комплекса TCR либо стимулирующим образом, либо ингибирующим образом. Первичные сигнальные домены, которые действуют стимулирующим образом, могут содержать сигнальные мотивы, которые известны как активирующие мотивы иммунорецептора на основе тирозина или ITAM.

Типичные примеры ITAM, содержащего первичные сигнальные домены, которые, в частности, применимы в настоящем изобретении, включают домены, полученные из TCR $\zeta$ , FcR $\gamma$ , FcR $\beta$ , CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$ , CD3 $\zeta$ , CD22, CD79a, CD79b и CD66d. В некоторых вариантах реализации CAR содержит первичный сигнальный домен CD3 $\zeta$  и один или более костимулирующих сигнальных доменов. Внутриклеточный первичный сигнальный домен и костимулирующие сигнальные домены могут быть связаны последовательно в любом порядке с карбоксильным концом трансмембранного домена.

CAR, предложенные в настоящей заявке, содержат один или более костимулирующих сигнальных доменов для повышения эффективности и размножения Т-клеток, экспрессирующих рецепторы CAR. Используемый в данном документе термин «костимулирующий сигнальный домен» или «костимулирующий домен» относится к внутриклеточному сигнальному домену костимулирующей молекулы. Костимулирующие молекулы представляют собой молекулы поверхности клетки, отличные от антигенных рецепторов или Fc-рецепторов, которые предоставляют второй сигнал, необходимый для эффективной активации и функции Т-лимфоцитов при связывании с антигеном. Типичные примеры таких костимулирующих молекул включают CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270

(HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM и ZAP70. В некоторых вариантах реализации CAR содержит один или более костимулирующих сигнальных доменов, выбранных из группы, состоящей из CD28, CD137 и CD134, и первичный сигнальный домен CD3 $\zeta$ .

В некоторых вариантах реализации CAR содержит костимулирующие сигнальные домены CD28 и CD137 и первичный сигнальный домен CD3 $\zeta$ .

В некоторых вариантах реализации CAR содержит костимулирующие сигнальные домены CD28 и CD134 и первичный сигнальный домен CD3 $\zeta$ .

В некоторых вариантах реализации CAR содержит костимулирующие сигнальные домены CD137 и CD134 и первичный сигнальный домен CD3 $\zeta$ .

В некоторых вариантах реализации CAR содержит костимулирующий сигнальный домен CD134 и первичный сигнальный домен CD3 $\zeta$ .

В некоторых вариантах реализации CAR содержит костимулирующий сигнальный домен CD28 и первичный сигнальный домен CD3 $\zeta$ .

В некоторых вариантах реализации CAR содержит костимулирующий сигнальный домен CD137 и первичный сигнальный домен CD3 $\zeta$ .

В некоторых аспектах один или более костимулирующих сигнальных доменов получены из CD137 (4-1BB). В некоторых аспектах костимулирующий сигнальный домен содержит последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательности SEQ ID NO: 155 или содержит последовательность SEQ ID NO: 155. В одном варианте реализации костимулирующий сигнальный домен содержит последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности SEQ ID NO: 155. В одном варианте реализации костимулирующий сигнальный домен содержит SEQ ID NO: 155.

В любом из указанных выше или связанных аспектов первичный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых аспектах первичный сигнальный домен содержит последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную последовательности SEQ ID NO: 156, или содержит последовательность SEQ ID NO: 156. В одном варианте реализации первичный

сигнальный домен содержит последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности SEQ ID NO: 156. В одном варианте реализации первичный сигнальный домен содержит SEQ ID NO: 156.

#### **D. Типичные химерные антигенные рецепторы**

В некоторых вариантах реализации CAR содержит scFv против MUC16, который связывает полипептид MUC16; трансмембранный домен, полученный из полипептида, выбранного из группы, состоящей из альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD3ε, CD3ζ, CD4, CD5, CD8α, CD9, CD16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD152, CD154 и PD1; и один или более внутриклеточных костимулирующих сигнальных доменов из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM и ZAP70; и первичный сигнальный домен из TCRζ, FcRγ, FcRβ, CD3γ, CD3δ, CD3ε, CD3ζ, CD22, CD79a, CD79b и CD66d.

В некоторых вариантах реализации CAR содержит scFv против MUC16, который связывает полипептид MUC16; шарнирный домен, выбранный из группы, состоящей из шарнира IgG1/CH2/CH3, шарнира IgG4/CH2/CH3 и шарнира CD8α; трансмембранный домен, полученный из полипептида, выбранного из группы, состоящей из альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD3ε, CD3ζ, CD4, CD5, CD8α, CD9, CD16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD152, CD154 и PD1; и один или более внутриклеточных костимулирующих сигнальных доменов из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM и ZAP70; и первичный сигнальный домен из TCRζ, FcRγ, FcRβ, CD3γ, CD3δ, CD3ε, CD3ζ, CD22, CD79a, CD79b и CD66d.

В некоторых вариантах реализации CAR содержит scFv против MUC16, который связывает полипептид MUC16; шарнирный домен, выбранный из группы, состоящей из шарнира IgG1/CH2/CH3, шарнира IgG4/CH2/CH3 и шарнира CD8α; трансмембранный

домен, полученный из полипептида, выбранного из группы, состоящей из альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD3ε, CD3ζ, CD4, CD5, CD8α, CD9, CD16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD152, CD154 и PD1; короткий олиго- или полипептидный линкер длиной предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот, который связывает TM-домен с внутриклеточным сигнальным доменом CAR; и один или более внутриклеточных костимулирующих сигнальных доменов из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM и ZAP70; и первичный сигнальный домен из TCRζ, FcRγ, FcRβ, CD3γ, CD3δ, CD3ε, CD3ζ, CD22, CD79a, CD79b и CD66d.

В некоторых вариантах реализации CAR содержит scFv против MUC16, который связывает полипептид MUC16; шарнирный домен, содержащий полипептид CD8α; трансмембранный домен CD8α, необязательно содержащий полипептидный линкер, состоящий из от приблизительно 3 до приблизительно 10 аминокислот; внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен CD137; и первичный сигнальный домен CD3ζ.

В некоторых вариантах реализации CAR содержит scFv против MUC16, который связывается в пределах SEQ ID NO: 39 или 151; трансмембранный домен, полученный из полипептида, выбранного из группы, состоящей из альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD3ε, CD3ζ, CD4, CD5, CD8α, CD9, CD16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD152, CD154 и PD1; и один или более внутриклеточных костимулирующих сигнальных доменов из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM и ZAP70; и первичный сигнальный домен из TCRζ, FcRγ, FcRβ, CD3γ, CD3δ, CD3ε, CD3ζ, CD22, CD79a, CD79b и CD66d.

В некоторых вариантах реализации CAR содержит scFv против MUC16, который связывается в SEQ ID NO: 39 или 151; шарнирный домен, выбранный из группы,

состоящей из шарнира IgG1/CH2/CH3, шарнира IgG4/CH2/CH3 и шарнира CD8 $\alpha$ ; трансмембранный домен, полученный из полипептида, выбранного из группы, состоящей из альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD3 $\epsilon$ , CD3 $\zeta$ , CD4, CD5, CD8 $\alpha$ , CD9, CD16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD152, CD154 и PD1; и один или более внутриклеточных костимулирующих сигнальных доменов из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM и ZAP70; и первичный сигнальный домен из TCR $\zeta$ , FcR $\gamma$ , FcR $\beta$ , CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$ , CD3 $\zeta$ , CD22, CD79a, CD79b и CD66d.

В некоторых вариантах реализации CAR содержит scFv против MUC16, который связывается в SEQ ID NO: 39 или 151; шарнирный домен, выбранный из группы, состоящей из шарнира IgG1/CH2/CH3, шарнира IgG4/CH2/CH3 и шарнира CD8 $\alpha$ ; трансмембранный домен, полученный из полипептида, выбранного из группы, состоящей из альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD3 $\epsilon$ , CD3 $\zeta$ , CD4, CD5, CD8 $\alpha$ , CD9, CD16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD152, CD154 и PD1; необязательно короткий олиго- или полипептидный линкер, длина которого предпочтительно составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот, который связывает ТМ-домен с внутриклеточным сигнальным доменом CAR; и один или более внутриклеточных костимулирующих сигнальных доменов из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM и ZAP70; и первичный сигнальный домен из TCR $\zeta$ , FcR $\gamma$ , FcR $\beta$ , CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$ , CD3 $\zeta$ , CD22, CD79a, CD79b и CD66d.

В некоторых вариантах реализации CAR содержит scFv против MUC16, который связывается в пределах SEQ ID NO: 39 или SEQ ID NO: 151; шарнирный домен, содержащий полипептид CD8 $\alpha$ ; трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , необязательно содержащий полипептидный линкер от приблизительно 3 до приблизительно 10

аминокислот, такой как LYC; внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен CD137; и первичный сигнальный домен CD3 $\zeta$ .

В некоторых вариантах реализации CAR содержит scFv против MUC16, содержащий CDR легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 1 — 3, и CDR тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 4 — 6; шарнирный домен, содержащий полипептид CD8 $\alpha$ ; трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , необязательно содержащий полипептидный линкер, состоящий из от приблизительно 3 до приблизительно 10 аминокислот; внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен CD137; и первичный сигнальный домен CD3 $\zeta$ .

В некоторых вариантах реализации CAR содержит scFv против MUC16, содержащий (a) CDR легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 41 — 43, и CDR тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 44 — 46; (b) CDR легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 53 — 55, и CDR тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 56 — 58; (c) CDR легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 65 — 67, и CDR тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 68 — 70; (d) CDR легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 77 - 79, и CDR тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 80 - 82; (e) CDR легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 89 — 91, и CDR тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 92 — 94; (f) CDR легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 101 — 103, и CDR тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 104 — 106; (g) CDR легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 113 — 115, и CDR тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 116 — 118; (h) CDR легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 127 — 129, и CDR тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 130 — 132; или (i) CDR легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 139 — 141, и CDR тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 142 — 144; шарнирный домен, содержащий полипептид CD8 $\alpha$ ; трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , необязательно содержащий полипептидный линкер, состоящий из от приблизительно 3 до приблизительно 10 аминокислот, такой как LYC; внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен CD137; и первичный сигнальный домен CD3 $\zeta$ .

В некоторых вариантах реализации сигнальный полипептид CD8 $\alpha$ , CAR содержит scFv против MUC16, содержащий CDR легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 1 - 3, и CDR тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 4 - 6; шарнирный домен, содержащий полипептид CD8 $\alpha$ ; трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , необязательно

содержащий полипептидный линкер, состоящий из от приблизительно 3 до приблизительно 10 аминокислот, такой как LYC; внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен CD137; и первичный сигнальный домен CD3 $\zeta$ .

В некоторых вариантах реализации сигнальный полипептид CD8 $\alpha$ , CAR содержит scFv против MUC16, содержащий (a) CDR легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 41 — 43, и CDR тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 44 — 46; (b) CDR легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 53 — 55, и CDR тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 56 — 58; (c) CDR легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 65 — 67, и CDR тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 68 — 70; (d) CDR легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 77 - 79, и CDR тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 80 - 82; (e) CDR легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 89 — 91, и CDR тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 92 — 94; (f) CDR легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 101 — 103, и CDR тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 104 — 106; (g) CDR легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 113 — 115, и CDR тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 116 — 118; (h) CDR легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 127 — 129, и CDR тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 130 — 132; или (i) CDR легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 139 — 141, и CDR тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 142 — 144; и шарнирный домен, содержащий полипептид CD8 $\alpha$ ; трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , необязательно содержащий полипептидный линкер, состоящий из от приблизительно 3 до приблизительно 10 аминокислот, такой как LYC; внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен CD137; и первичный сигнальный домен CD3 $\zeta$ .

В некоторых вариантах реализации CAR содержит scFv против MUC16, содержащий переменную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 7, и переменную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 8; шарнирный домен, содержащий полипептид CD8 $\alpha$ ; трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , необязательно содержащий полипептидный линкер, состоящий из от приблизительно 3 до приблизительно 10 аминокислот, такой как LYC; внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен CD137; и первичный сигнальный домен CD3 $\zeta$ .

В некоторых вариантах реализации CAR содержит scFv против MUC16, содержащий (a) переменную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 47, и переменную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 48; (b)

вариабельную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 59, и вариабельную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 60; (c) вариабельную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 71, и вариабельную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 72; (d) вариабельную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 83, и вариабельную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 84; (e) вариабельную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 95, и вариабельную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 96; (f) вариабельную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 107, и вариабельную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 108; (g) вариабельную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 119, и вариабельную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 120; (h) вариабельную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 133, и вариабельную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 134; или (i) вариабельную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 145, и вариабельную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 146; и шарнирный домен, содержащий полипептид CD8 $\alpha$ ; трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , необязательно содержащий полипептидный линкер, состоящий из от приблизительно 3 до приблизительно 10 аминокислот, такой как LYC; внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен CD137; и первичный сигнальный домен CD3 $\zeta$ .

В некоторых вариантах реализации сигнальный полипептид CD8 $\alpha$ , CAR содержит scFv против MUC16, содержащий вариабельную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 7, и вариабельную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 8; шарнирный домен, содержащий полипептид CD8 $\alpha$ ; трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , необязательно содержащий полипептидный линкер, состоящий из от приблизительно 3 до приблизительно 10 аминокислот, такой как LYC; внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен CD137; и первичный сигнальный домен CD3 $\zeta$ .

В некоторых вариантах реализации сигнальный полипептид CD8 $\alpha$ , CAR содержит scFv против MUC16, содержащий (a) вариабельную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 47, и вариабельную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 48; (b) вариабельную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 59, и вариабельную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 60; (c)

вариабельную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 71, и вариабельную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 72; (d) вариабельную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 83, и вариабельную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 84; (e) вариабельную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 95, и вариабельную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 96; (f) вариабельную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 107, и вариабельную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 108; (g) вариабельную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 119, и вариабельную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 120; (h) вариабельную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 133, и вариабельную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 134; или (i) вариабельную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 145, и вариабельную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 146; и трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , необязательно содержащий полипептидный линкер от приблизительно 3 до приблизительно 10 аминокислот, такой как LYC; внутриклеточный костимулирующий сигнальный домен CD137; и первичный сигнальный домен CD3 $\zeta$ .

В некоторых вариантах реализации CAR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах реализации CAR содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах реализации CAR содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% последовательности SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах реализации CAR содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательности SEQ ID NO: 9.

В некоторых вариантах реализации CAR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах реализации CAR содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах реализации CAR содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% последовательности SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах

реализации CAR содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательности SEQ ID NO: 49.

В некоторых вариантах реализации CAR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 51. В некоторых вариантах реализации CAR содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO: 51. В некоторых вариантах реализации CAR содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% последовательности SEQ ID NO: 51. В некоторых вариантах реализации CAR содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательности SEQ ID NO: 51.

В некоторых вариантах реализации CAR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах реализации CAR содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах реализации CAR содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% последовательности SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах реализации CAR содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательности SEQ ID NO: 61.

В некоторых вариантах реализации CAR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах реализации CAR содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах реализации CAR содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% последовательности SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах реализации CAR содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательности SEQ ID NO: 63.



меньшей мере на 95% последовательности SEQ ID NO: 87. В некоторых вариантах реализации CAR содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательности SEQ ID NO: 87.

В некоторых вариантах реализации CAR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 97. В некоторых вариантах реализации CAR содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO: 97. В некоторых вариантах реализации CAR содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% последовательности SEQ ID NO: 97. В некоторых вариантах реализации CAR содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательности SEQ ID NO: 97.

В некоторых вариантах реализации CAR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 99. В некоторых вариантах реализации CAR содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO: 99. В некоторых вариантах реализации CAR содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% последовательности SEQ ID NO: 99. В некоторых вариантах реализации CAR содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательности SEQ ID NO: 99.

В некоторых вариантах реализации CAR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 109. В некоторых вариантах реализации CAR содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO: 109. В некоторых вариантах реализации CAR содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% последовательности SEQ ID NO: 109. В некоторых вариантах реализации CAR содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательности SEQ ID NO: 109.











меньшей мере на 95% последовательности SEQ ID NO: 98. В некоторых вариантах реализации CAR содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательности SEQ ID NO: 98.

В некоторых вариантах реализации CAR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 100. В некоторых вариантах реализации CAR содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO: 100. В некоторых вариантах реализации CAR содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% последовательности SEQ ID NO: 100. В некоторых вариантах реализации CAR содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательности SEQ ID NO: 100.

В некоторых вариантах реализации CAR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 110. В некоторых вариантах реализации CAR содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO: 110. В некоторых вариантах реализации CAR содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% последовательности SEQ ID NO: 110. В некоторых вариантах реализации CAR содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательности SEQ ID NO: 110.

В некоторых вариантах реализации CAR содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 112. В некоторых вариантах реализации CAR содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO: 112. В некоторых вариантах реализации CAR содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% последовательности SEQ ID NO: 112. В некоторых вариантах реализации CAR содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательности SEQ ID NO: 112.





Более того, конструкция CAR, предложенная в настоящей заявке, позволяет улучшенное размножение, длительную персистенцию и приемлемые цитотоксические свойства Т-клеток, экспрессирующих указанные CAR, по сравнению с немодифицированными Т-клетками или Т-клетками, модифицированными для экспрессии других CAR.

#### **Е. Полипептиды**

В соответствии с настоящим изобретением предложены, помимо прочего, полипептиды CAR и их фрагменты, клетки и композиции, содержащие их, и векторы, которые экспрессируют полипептиды. В некоторых вариантах реализации предложен полипептид, содержащий один или более CAR, представленных в SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах реализации предложен полипептид, содержащий один или более CAR, представленных в SEQ ID NO: 11.

Термины «полипептид», «фрагмент полипептида», «пептид» и «белок» используют взаимозаменяемо, если не указано иное, и в соответствии с общепринятым значением, т. е. в отношении последовательности аминокислот. Полипептиды не ограничены определенной длиной, например, они могут содержать полноразмерную последовательность белка или фрагмент полноразмерного белка и могут содержать посттрансляционные модификации полипептида, например, гликозилирования, ацетилирования, фосфорилирования и т. п., а также другие модификации, известные в данной области техники, как встречающиеся в природе, так и не встречающиеся в природе. В различных вариантах реализации полипептиды CAR, предложенные в настоящей заявке, содержат сигнальную (или лидерную) полипептидную последовательность на N-конце белка, которая котрансляционно или посттрансляционно направляет транспорт белка. Типичные примеры подходящих сигнальных полипептидных последовательностей, пригодных в CAR, описанных в настоящей заявке, включают, но не ограничены перечисленными: сигнальную полипептидную последовательность тяжелой цепи IgG1, сигнальную полипептидную последовательность рецептора 2 гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSFR2), сигнальную полипептидную последовательность Igk или сигнальную полипептидную последовательность CD8 $\alpha$ . Полипептиды можно получать с применением любой из множества хорошо известных рекомбинантных методик и/или методик синтеза. Полипептиды, предложенные в

настоящей заявке, в частности, включают CAR в соответствии с настоящим изобретением или последовательности, которые содержат делеции, добавления и/или замены одной или более аминокислот CAR, описанных в настоящей заявке.

Термины «выделенный пептид» или «выделенный полипептид» и т. п. в контексте настоящего документа относятся к выделению и/или очистке *in vitro* молекулы пептида или полипептида из клеточной среды, а также из ассоциации с другими компонентами клетки, т. е., они не связаны в значительной степени с веществами *in vivo*. Подобным образом, «выделенная клетка» относится к клетке, которая была получена из ткани или органа *in vivo* и по существу не содержит внеклеточного матрикса.

Полипептиды включают «варианты полипептида». Варианты полипептида могут отличаться от встречающегося в природе полипептида заменами, делециями, добавлениями и/или вставками одной или более аминокислот. Такие варианты могут встречаться в природе или могут быть получены синтетическим способом, например, путем модификации одной или более указанных выше полипептидных последовательностей. Например, в конкретных вариантах реализации может быть желательно улучшить аффинность связывания и/или другие биологические свойства CAR путем введения одной или более замен, делеций, добавлений и/или вставок в связывающий домен, шарнир, ТМ-домен, костимулирующий сигнальный домен или первичный сигнальный домен полипептида CAR. Предпочтительно полипептиды в соответствии с настоящим изобретением включают полипептиды, идентичные им по меньшей мере приблизительно на 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% по последовательности аминокислот.

Полипептиды включают «фрагменты полипептидов». Фрагменты полипептидов относятся к полипептиду, который может быть мономерным или мультимерным, который содержит аминоконцевую делецию, карбоксиконцевую делецию и/или внутреннюю делецию или замену во встречающемся в природе или полученном рекомбинантным путем полипептиде. В некоторых вариантах реализации фрагмент полипептида может содержать цепь аминокислот длиной от по меньшей мере 5 до приблизительно 500 аминокислот. Следует принимать во внимание, что в некоторых вариантах реализации длина фрагментов составляет по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100,

110, 150, 200, 250, 300, 350, 400 или 450 аминокислот. Особенно пригодные фрагменты полипептидов включают функциональные домены, в том числе антигенсвязывающие домены или фрагменты антител. В случае мышинового антитела против ВСМА пригодные фрагменты включают, но не ограничены перечисленными: область CDR, область CDR3 тяжелой или легкой цепи; переменную область тяжелой или легкой цепи; часть цепи или переменной области антитела, содержащую две CDR; и т. п.

Полипептид также может быть слит в одной рамке считывания или конъюгирован с линкером или другой последовательностью для простоты синтеза, очистки или идентификации полипептида (например, поли-His) или для усиления связывания полипептида с твердой подложкой.

Как указано выше, полипептиды в соответствии с настоящим изобретением можно изменять различными способами, включая замены, делеции, усечения и вставки аминокислот. Способы таких манипуляций общеизвестны из уровня техники. Например, варианты аминокислотных последовательностей референсного полипептида могут быть получены посредством мутаций в ДНК. Методы мутагенеза и изменений нуклеотидной последовательности хорошо известны из уровня техники. См., например, Kunkel (1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 82: 488-492), Kunkel *et al.*, (1987, *Methods in Enzymol*, 154: 367-382), патент США № 4873192, Watson, J. D. *et al.*, (*Molecular Biology of the Gene*, Fourth Edition, Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif., 1987) и источники, цитируемые в них. Рекомендации относительно подходящих аминокислотных замен, которые не влияют на биологическую активность представляющего интерес белка, можно найти в модели Dayhoff *et al.*, (1978) *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.).

В некоторых вариантах реализации вариант будет содержать консервативные замены. «Консервативная замена» представляет собой такую замену, при которой аминокислота заменена на другую аминокислоту, которая обладает сходными свойствами, так что специалист в области химии пептидов будет ожидать, что вторичная структура и гидропатическая природа полипептида будут практически неизменными. В структуру полинуклеотидов и полипептидов в соответствии с настоящим изобретением можно ввести модификации и все еще получить функциональную молекулу, которая кодирует вариант или производное полипептида с желаемыми характеристиками. Если необходимо изменить аминокислотную последовательность полипептида для создания

эквивалентного или даже улучшенного варианта полипептида в соответствии с настоящим изобретением, специалист в данной области техники, например, может изменить один или более кодонов кодирующей последовательности ДНК, например в соответствии с таблицей 1.

**Таблица 1. Кодоны аминокислот**

Аминокислоты	Однобуквенный код	Трехбуквенный код	Кодоны					
			GC A	GC C	GC G	GCU		
Аланин	A	Ala	GC A	GC C	GC G	GCU		
Цистеин	C	Cys	UG C	UGU				
Аспарагиновая кислота	D	Asp	GA C	GAU				
Глутаминовая кислота	E	Glu	GA A	GAG				
Фенилаланин	F	Phe	UU C	UUU				
Глицин	G	Gly	GG A	GG C	GG G	GGU		
Гистидин	H	His	CA C	CAU				
Изолейцин	I	Iso	AU A	AU C	AUU			
Лизин	K	Lys	AA A	AAG				
Лейцин	L	Leu	UU A	UU G	CU A	CU C	CU G	CU U
Метионин	M	Met	AUG					
Аспарагин	N	Asn	AA C	AAU				
Пролин	P	Pro	CC A	CC C	CC G	CCU		
Глутамин	Q	Gln	CA A	CAG				
Аргинин	R	Arg	AG A	AG G	CG A	CG C	CG G	CG U
Серин	S	Ser	AG C	AG U	UC A	UC C	UC G	UC U
Треонин	T	Thr	AC A	AC C	AC G	ACU		
Валин	V	Val	GU A	GU C	GU G	GUU		
Триптофан	W	Trp	UGG					

Тирозин	Y	Tyr	UA C	UAU
---------	---	-----	---------	-----

Руководство по определению того, какие аминокислотные остатки можно заменить, вставить или удалить без прекращения биологической активности, можно найти с применением компьютерных программ, хорошо известных из уровня техники, таких как программное обеспечение DNASTAR™. Предпочтительно изменения аминокислот в вариантах белков, описанных в настоящей заявке, представляют собой консервативные изменения аминокислот, т. е. замены аналогичным образом заряженных или незаряженных аминокислот. Консервативное изменение аминокислоты предусматривает замену одной из семейства аминокислот с родственными боковыми цепями. Встречающиеся в природе аминокислоты обычно делят на четыре семейства: кислотные (аспартат, глутамат), основные (лизин, аргинин, гистидин), неполярные (аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан) и незаряженные полярные (глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин) аминокислоты. Фенилаланин, триптофан и тирозин иногда классифицируют совместно как ароматические аминокислоты. В пептиде или белке подходящие консервативные замены аминокислот известны специалистам в данной области техники и обычно могут быть выполнены без изменения биологической активности полученной в результате этого молекулы. Специалистам в данной области техники понятно, что, как правило, одиночные замены аминокислот в несущественных областях полипептида по существу не изменяют биологическую активность (см., например, *Watson et al. Molecular Biology of the Gene*, 4th Edition, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p.224). Типичные консервативные замены описаны в предварительной заявке на патент США № 61/241647, описание которой включено в настоящую заявку посредством ссылки.

При осуществлении таких изменений можно учитывать гидропатический индекс аминокислот. Важность гидропатического индекса аминокислот в придании белку биологической функции взаимодействия, в целом, понятно в данной области техники (Kyte and Doolittle, 1982, включен в настоящую заявку посредством ссылки). Каждой аминокислоте присвоен гидропатический индекс на основании ее характеристик гидрофобности и заряда (Kyte and Doolittle, 1982). Эти значения представляют собой: изолейцин (+4,5); валин (+4,2); лейцин (+3,8); фенилаланин (+2,8); цистеин/цистеин (+2,5); метионин (+1,9); аланин (+1,8); глицин (-0,4); треонин (-0,7); серин (-0,8);

триптофан (-0,9); тирозин (-1,3); пролин (-1,6); гистидин (-3,2); глутамат (-3,5); глутамин (-3,5); аспарат (-3,5); аспарагин (-3,5); лизин (-3,9) и аргинин (-4,5).

Из уровня техники известно, что некоторые аминокислоты могут быть заменены другими аминокислотами, имеющими аналогичный гидропатический индекс или балл, и полученный в результате этого белок все еще будет обладать аналогичной биологической активностью, т. е. можно все еще получить белок с эквивалентной биологической функцией. При осуществлении таких изменений замена аминокислот, гидропатические индексы которых находятся в пределах  $\pm 2$ , является предпочтительной, особенно предпочтительны таковые в пределах  $\pm 1$ , еще более предпочтительны таковые в пределах  $\pm 0,5$ . Также в данной области техники понятно, что замену подобных аминокислот можно эффективно осуществить на основании гидрофильности.

Как подробно описано в патенте США № 4554101, аминокислотным остаткам были присвоены следующие значения гидрофильности: аргинин (+3,0); лизин (+3,0); аспарат (+3,0 $\pm$  1); глутамат (+3,0  $\pm$  1); серин (+0,3); аспарагин (+0,2); глутамин (+0,2); глицин (0); треонин (-0,4); пролин (-0,5  $\pm$  1); аланин (-0,5); гистидин (-0,5); цистеин (-1,0); метионин (-1,3); валин (-1,5); лейцин (-1,8); изолейцин (-1,8); тирозин (-2,3); фенилаланин (-2,5); триптофан (-3,4). Следует понимать, что аминокислота может быть заменена другой, имеющей аналогичное значение гидрофильности, и все еще будет получен биологически эквивалентный и, в частности, иммунологически эквивалентный белок. В таких изменениях замена аминокислот, значения гидрофильности которых находятся в пределах  $\pm 2$ , является предпочтительной, особенно предпочтительны значения в пределах  $\pm 1$ , а еще более предпочтительны значения в пределах  $\pm 0,5$ .

Как указано выше, аминокислотные замены могут быть основаны на относительном сходстве заместителей боковых цепей аминокислот, например, их гидрофобности, гидрофильности, заряде, размере и т. п.

Варианты полипептидов дополнительно включают гликозилированные формы, агрегированные конъюгаты с другими молекулами и ковалентные конъюгаты с неродственными химическими фрагментами (например, пегилированными молекулами). Ковалентные варианты могут быть получены путем связывания

функциональных групп с группами, которые находятся в аминокислотной цепи или на N- или C-концевом остатке, как известно из уровня техники. Варианты также включают аллельные варианты, видовые варианты и мутины. Усечения или делеции областей, которые не влияют на функциональную активность белков, также являются вариантами.

В некоторых вариантах реализации, где требуется экспрессия двух или более полипептидов, полинуклеотидные последовательности, кодирующие их, могут быть разделены последовательностью IRES, как обсуждается в других местах данного документа. В другом варианте реализации два или более полипептидов могут экспрессироваться в виде слитого белка, который содержит одну или более саморасщепляющихся полипептидных последовательностей.

Полипептиды в соответствии с настоящим изобретением включают слитые полипептиды. В некоторых вариантах реализации предложены слитые полипептиды и полинуклеотиды, кодирующие слитые полипептиды, например CAR. Слитые полипептиды и слитые белки относятся к полипептиду, содержащему по меньшей мере два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять, или более полипептидных сегментов. Слитые полипептиды обычно связаны С-концом с N-концом, хотя они также могут быть связаны С-концом с С-концом, N-концом с N-концом или N-концом с С-концом. Полипептиды в составе слитого белка могут быть расположены в любом порядке или в определенном порядке. Слитые полипептиды или слитые белки также могут включать консервативно модифицированные варианты, полиморфные варианты, аллели, мутанты, подпоследовательности и межвидовые гомологи, при условии, что необходимая транскрипционная активность слитого полипептида сохраняется. Слитые полипептиды могут быть получены с помощью способов химического синтеза или химической связи между двумя фрагментами или, как правило, могут быть получены с применением других стандартных методик. Лигированные последовательности ДНК, содержащие слитый полипептид, функционально связаны с подходящими элементами контроля транскрипции или трансляции, как обсуждается в других местах данного документа.

В одном варианте реализации слитый полипептид содержит последовательность, которая способствует экспрессии белка (энхансер экспрессии) с более высокими выходами, чем у нативного рекомбинантного белка. Другие партнеры по слиянию

могут быть выбраны для повышения растворимости белка или для обеспечения нацеливания белка на требуемые внутриклеточные компартменты или для облегчения переноса слитого белка через клеточную мембрану.

Слитые полипептиды могут дополнительно содержать сигнал расщепления полипептида между каждым из полипептидных доменов, описанных в данном документе. Кроме того, полипептидный сайт можно поместить в любую последовательность линкерного пептида. Примеры сигналов расщепления полипептидов включают сайты распознавания для расщепления полипептидов, такие как сайты расщепления протеазами, сайты расщепления нуклеазами (например, редкие сайты распознавания для рестриктаз, сайты распознавания для саморасщепляющегося рибозима) и саморасщепляющиеся вирусные олигопептиды (см. deFelipe and Ryan, 2004. *Traffic*, 5(8); 616-26).

Подходящие сайты расщепления протеазами и саморасщепляющиеся пептиды известны специалисту в данной области техники (см., например, в Ryan *et al.*, 1997. *J. Gener. Virol.* 78, 699-722; Scymczak *et al.* (2004) *Nature Biotech.* 5, 589-594). Типичные сайты расщепления протеазами включают, но не ограничены сайтами расщепления протеазами N1a потивируса (например, протеазой вируса гравировки табака), протеазами HC потивируса, протеазами P1 (P35) потивируса, протеазами N1a бимовируса, кодируемыми РНК-2 протеазами бимовируса, протеазами L афтоввируса, протеазами 2A энтеровируса, протеазами 2A риновируса, протеазами 3C пикорнавируса, протеазами 24K комовируса, протеазами 24K неповируса, 3С-подобной протеазой RTSV (сферического вируса риса тунгро), 3С-подобной протеазой PYVF (вируса желтой пятнистости пастернака), гепарина, тромбина, фактора Ха и энтерокиназы. Вследствие высокой строгости расщепления сайты расщепления протеазой TEV (вируса гравировки табака) являются предпочтительными в одном варианте реализации, например, EXXYXQ(G/S) (SEQ ID NO: 36), например, ENLYFQG (SEQ ID NO: 37) и ENLYFQS (SEQ ID NO: 38), где X представляет собой любую аминокислоту (расщепление посредством TEV происходит между Q и G или Q и S).

В конкретных вариантах реализации полипептидный сигнал расщепления представляет собой вирусный саморасщепляющийся пептид.

В некоторых вариантах реализации саморасщепляющиеся пептиды включают те полипептидные последовательности, которые получены из пептидов 2А афтовируса, потивируса и кардиовируса, FMDV (вируса ящура), вируса ринита лошадей А, вируса *Thosea asigna* и тешовируса свиней.

В некоторых вариантах реализации сайт саморасщепляющегося полипептида содержит сайт, последовательность или домен 2А или подобные 2А (Donnelly *et al.*, 2001. *J. Gen. Virol.* 82:1027-1041). Типичные примеры сайтов 2А представлены в таблице 2.

**ТАБЛИЦА 2**

SEQ ID NO: 26	LLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 27	TLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 28	LLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 29	NFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 30	QLLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 31	APVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 32	VTELLYRMKRAETYCPRPLLAHPTEARHKQKIVAPV KQT
SEQ ID NO: 33	LNFDLLKLAGDVESNPGP
SEQ ID NO: 34	LLAHPTEARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNP GP
SEQ ID NO: 35	EARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP

В предпочтительных вариантах реализации полипептид, предложенный в настоящей заявке, содержит полипептид CAR.

## **Г. Полинуклеотиды**

В некоторых вариантах реализации предложен полинуклеотид, кодирующий один или более полипептидов CAR, например, SEQ ID NO: 10 и 12. Используемые в данном документе термины «полинуклеотид» или «нуклеиновая кислота» относятся к пре-матричной РНК (пре-мРНК), матричной РНК (мРНК), РНК, геномной РНК (гРНК), плюс-цепи РНК (РНК(+)), минус-цепи РНК (РНК(-)), геномной ДНК (гДНК), амплифицированной ПЦР ДНК, комплементарной ДНК (кДНК), синтетической ДНК или рекомбинантной ДНК. Полинуклеотиды включают одно- и двухцепочечные полинуклеотиды. Полинуклеотиды относятся к полимерной форме нуклеотидов, имеющей длину по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 100, по меньшей мере 200, по меньшей мере 300, по

меньшей мере 400, по меньшей мере 500, по меньшей мере 1000, по меньшей мере 5000, по меньшей мере 10000 или по меньшей мере 15000 или более нуклеотидов, либо рибонуклеотидов, либо дезоксирибонуклеотидов, или к модифицированной форме любого из указанных типов нуклеотидов, а также любой промежуточной длины. Нетрудно понять, что «промежуточная длина» в данном контексте означает любую длину между указанными значениями, например, 6, 7, 8, 9 и т. д., 101, 102, 103 и т. д.; 151, 152, 153 и т. д.; 201, 202, 203 и т. д. Предпочтительно полинуклеотиды в соответствии с настоящим изобретением включают полинуклеотиды или варианты, идентичные по меньшей мере приблизительно на 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% любой из референсных последовательностей, описанных в данном документе (см., например, Перечень последовательностей), как правило, если вариант сохраняет по меньшей мере одну биологическую активность референсной последовательности. В различных типичных вариантах реализации настоящего изобретения предложены, отчасти, полинуклеотиды, содержащие векторы экспрессии, вирусные векторы и плазмиды для переноса, а также композиции и клетки, содержащие их.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложены полинуклеотиды, которые кодируют по меньшей мере приблизительно 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 1000, 1250, 1500, 1750 или 2000 или более смежных аминокислотных остатков полипептида в соответствии с настоящим изобретением, а также все промежуточные длины. Нетрудно понять, что «промежуточные длины» в данном контексте означают любую длину между указанными значениями, например, 6, 7, 8, 9 и т. д., 101, 102, 103 и т. д.; 151, 152, 153 и т. д.; 201, 202, 203 и т. д.

В контексте настоящего документа термины «полинуклеотидный вариант» и «вариант», и т. п., относятся к полинуклеотидам, демонстрирующим значительную идентичность последовательности референсной полинуклеотидной последовательности или полинуклеотидам, которые гибридизуются с референсной последовательностью в строгих условиях, которые определены ниже. Эти термины включают полинуклеотиды, в которых один или более нуклеотидов были добавлены, или удалены, или заменены нуклеотидами, отличными от таковых в референсном полинуклеотиде. В связи с этим в данной области техники хорошо известно, что определенные изменения или

модификации, включающие мутации, добавления, делеции и замены, могут быть введены в референсный полинуклеотид, при этом измененный или модифицированный полинуклеотид будет сохранять биологическую функцию или активность референсного полинуклеотида. Термин «полинуклеотидный фрагмент» может относиться к полинуклеотиду длиной по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700 или более нуклеотидов, который кодирует полипептидный вариант, который сохраняет по меньшей мере 100%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 10%, или по меньшей мере 5% активности встречающегося в природе полипептида.

Формулировки «идентичность последовательностей» или, например, содержащие «последовательность, на 50% идентичную», в контексте настоящего документа относятся к той степени, в которой последовательности идентичны по нуклеотидам или по аминокислотам в пределах окна сравнения. Таким образом, «процент идентичности последовательностей» можно рассчитать путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей в пределах окна сравнения, определения количества положений, в которых в обеих последовательностях присутствует идентичное основание нуклеиновой кислоты (например, A, T, C, G, I) или идентичный аминокислотный остаток (например, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys и Met), с получением количества совпадающих положений, деления количества совпадающих положений на общее количество положений в окне сравнения (т. е. размер окна), и умножения результата на 100, с получением процента идентичности последовательностей. Включены нуклеотиды и полипептиды, идентичные по меньшей мере приблизительно на 50%, 55%, 60%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 86%, 97%, 98%, 99% или 100% любой из референсных последовательностей, описанных в настоящем документе, как правило, при этом вариант полипептида сохраняет по меньшей мере одну биологическую активность референсного полипептида.

Термины, используемые для описания отношений последовательностей между двумя или более полинуклеотидами или полипептидами, включают «референсную последовательность», «окно сравнения», «идентичность последовательностей», «процент идентичности последовательностей» и «по существу идентичность». Длина «референсной последовательности» составляет по меньшей мере 12, но часто 15 - 18 и часто по меньшей мере 25 мономерных звеньев, включая нуклеотиды и аминокислотные остатки. Поскольку каждый из двух полинуклеотидов может содержать (1) последовательность (т. е. только часть полной полинуклеотидной последовательности), схожую в двух полинуклеотидах, и (2) последовательность, которая отличается в двух полинуклеотидах, сравнения последовательностей между двумя (или более) полинуклеотидами обычно осуществляют путем сравнения последовательностей этих двух полинуклеотидов в пределах «окна сравнения» для идентификации и сравнения локальных областей сходства последовательностей. «Окно сравнения» относится к концептуальному сегменту, состоящему из по меньшей мере 6 смежных положений, обычно от приблизительно 50 до приблизительно 100, чаще от приблизительно 100 до приблизительно 150, в котором последовательность сравнивают с референсной последовательностью с таким же количеством смежных положений после оптимального выравнивания двух указанных последовательностей. Окно сравнения может содержать добавления или делеции (т. е. гэпы) в количестве приблизительно 20% или менее по сравнению с референсной последовательностью (которая не содержит добавлений или делеций) для оптимального выравнивания двух указанных последовательностей. Оптимальное выравнивание последовательностей для выравнивания окна сравнения можно проводить с помощью компьютеризированных реализаций алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программного обеспечения для генетики Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, Висконсин, США) или путем проверки и наилучшего выравнивания (т. е. в результате которого достигается наивысший процент гомологии в пределах окна сравнения), полученного любым из различных выбранных методов. Также можно упомянуть семейство программ BLAST, как, например, описано в источнике Altschul et al., 1997, Nucl. Acids Res. 25:3389. Подробное обсуждение анализа последовательностей можно найти в Unit 19.3, Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, глава 15.

В некоторых вариантах реализации CAR против MUC16 кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах реализации CAR против MUC16 кодируется нуклеотидной последовательностью, идентичной по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах реализации CAR против MUC16 кодируется нуклеотидной последовательностью, идентичной по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательности SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах реализации CAR против MUC16, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, кодируется нуклеотидной последовательностью, идентичной по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах реализации CAR против MUC16 кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах реализации CAR против MUC16 кодируется нуклеотидной последовательностью, идентичной по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах реализации CAR против MUC16 кодируется нуклеотидной последовательностью, идентичной по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательности SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах реализации CAR против MUC16, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, кодируется нуклеотидной последовательностью, идентичной по меньшей мере на 90% последовательности SEQ ID NO: 12.

В некоторых вариантах реализации в данном документе описана нуклеотидная последовательность, кодирующая CAR против MUC16, содержащий последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 49, 50, 51, 52, 61, 62, 63, 64, 73, 74, 75, 76, 85, 86, 87, 88, 97, 98, 99, 100, 109, 110, 111, 112, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 135, 136, 137, 138, 147, 148, 149 или 150. В некоторых вариантах реализации в данном документе описана нуклеотидная последовательность, кодирующая CAR против MUC16, идентичная по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% любой из последовательностей SEQ ID NO: 49, 50, 51, 52, 61, 62, 63, 64, 73, 74, 75, 76, 85, 86, 87, 88, 97, 98, 99, 100, 109, 110, 111, 112, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 135, 136, 137, 138, 147, 148, 149 или 150.

В контексте настоящего документа термин «выделенный полинуклеотид» относится к полинуклеотиду, который был очищен от последовательностей, которые фланкируют его в естественном состоянии, например, фрагменту ДНК, который был удален из последовательностей, которые обычно примыкают к указанному фрагменту. Термин «выделенный полинуклеотид» также относится к комплементарной ДНК (кДНК), рекомбинантной ДНК или другому полинуклеотиду, который не существует в природе и который был получен человеком. В конкретных вариантах реализации выделенный полинуклеотид представляет собой синтетический полинуклеотид, полусинтетический полинуклеотид или полинуклеотид, полученный или происходящий из рекомбинантного источника.

В различных вариантах реализации полинуклеотид содержит мРНК, кодирующую полипептид, предложенный в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации мРНК содержит кэп, один или более нуклеотидов и поли(А)-хвост.

В конкретных вариантах реализации полинуклеотиды могут быть кодон-оптимизированы. В контексте настоящего документа термин «кодон-оптимизированный» относится к замене кодонов в полинуклеотиде, кодирующем полипептид, с целью повышения экспрессии, стабильности и/или активности полипептида. Факторы, влияющие на оптимизацию кодонов, включают, не ограничиваясь перечисленными, один или более из следующих: (i) вариацию предпочтения кодонов между двумя или более организмами или генами или синтетически сконструированными таблицами предпочтения, (ii) вариацию степени предпочтения кодонов в организме, гене, или наборе генов, (iii) систематическую вариацию кодонов, включая контекст, (iv) вариацию кодонов в соответствии с их декодирующими тРНК, (v) вариацию кодонов в соответствии с % GC, либо в целом, либо в одном положении триплета, (vi) вариацию степени сходства с референсной последовательностью, например, встречающейся в природе последовательностью, (vii) вариацию порогового значения частоты кодонов, (viii) структурные свойства мРНК, транскрибированных с последовательности ДНК, (ix) известную информацию о функции последовательностей ДНК, на которых должно основываться конструирование набора кодонных замен, (x) систематическую вариацию наборов кодонов для каждой аминокислоты, и/или (xi) одиночное удаление ложных сайтов инициации трансляции.

Термины, которые описывают ориентацию полинуклеотидов, включают: 5' (обычно конец полинуклеотида, имеющий свободную фосфатную группу) и 3' (обычно конец полинуклеотида, имеющий свободную гидроксильную (ОН) группу). Полинуклеотидные последовательности могут быть аннотированы в направлении от 5' к 3' или в направлении от 3' к 5'. Для ДНК и мРНК цепь с направлением от 5' к 3' называют «смысловой», «положительной» или «кодирующей» цепью, потому что ее последовательность идентична последовательности пре-матричной (пре-мРНК) [за исключением урацила (U) в РНК вместо тимина (Т) в ДНК]. Для ДНК и мРНК комплементарную цепь с направлением от 3' к 5', которая представляет собой цепь, транскрибируемую РНК-полимеразой, называют «матричной», «антисмысловой», «отрицательной» или «некодирующей» цепью. В контексте настоящего документа термин «обратная ориентация» относится к последовательности в направлении от 5' к 3', записанной в направлении от 3' к 5', или последовательности в направлении от 3' к 5', записанной в направлении от 5' к 3'.

Термины «комплементарный» и «комплементарность» относятся к полинуклеотидам (т. е. последовательности нуклеотидов), связанным по правилам спаривания оснований. Например, комплементарная цепь последовательности ДНК 5' А G T C A T G 3' представляет собой 3' T C A G T A C 5'. Последнюю последовательность часто записывают как обратную комплементарную с 5'-концом слева и 3'-концом справа, 5' C A T G A C T 3'. Говорят, что последовательность, которая одинакова со своим обратным комплементом, представляет собой палиндромную последовательность. Комплементарность может быть «частичной», при которой только некоторые из оснований нуклеиновых кислот спариваются в соответствии с правилами спаривания оснований. Или может быть «полная» или «тотальная» комплементарность между нуклеиновыми кислотами.

Более того, специалистам в данной области техники будет ясно, что в результате вырожденности генетического кода существует множество нуклеотидных последовательностей, которые кодируют полипептид или его фрагмент или вариант, описанные в настоящем документе. Некоторые из этих полинуклеотидов обладают минимальной гомологией с нуклеотидной последовательностью любого нативного гена. Тем не менее, полинуклеотиды, которые отличаются вследствие различий в использовании кодонов, особенно предложены в соответствии с настоящим

изобретением, например, полинуклеотиды, которые оптимизированы для выбора кодонов человека и/или приматов. Кроме того, можно также использовать аллели генов, содержащих полинуклеотидные последовательности, предложенные в настоящем документе. Аллели представляют собой эндогенные гены, изменяемые в результате одной или более мутаций, таких как делеции, добавления и/или замены нуклеотидов.

Термин «кассета нуклеиновой кислоты» или «кассета экспрессии» в контексте настоящего документа относится к генетическим последовательностям внутри вектора, которые могут экспрессировать РНК, а затем белок. Кассета нуклеиновой кислоты содержит представляющий интерес ген, например, представляющий интерес полинуклеотид. Кассета нуклеиновой кислоты содержит одну или более последовательностей контроля экспрессии, например, промотор, энхансер, последовательность поли(А) и представляющий интерес ген, например, представляющий интерес полинуклеотид. Кассета нуклеиновой кислоты позиционно и последовательно ориентирована в векторе таким образом, что нуклеиновая кислота в кассете может быть транскрибирована в РНК и при необходимости транслирована в белок или полипептид, может подвергаться соответствующим посттрансляционным модификациям, необходимым для активности в трансформированной клетке, и транслоцироваться в соответствующий компартмент для биологической активности путем нацеливания на соответствующие внутриклеточные компартменты или секреции во внеклеточные компартменты. В некоторых вариантах реализации 3'- и 5'-концы кассеты адаптированы для легкой вставки в вектор, например, она содержит сайты рестрикционных эндонуклеаз на каждом конце. В некоторых вариантах реализации кассета нуклеиновой кислоты содержит последовательность химерного антигенного рецептора. Кассета может быть извлечена и вставлена в плазмиду или вирусный вектор в виде единого целого.

В некоторых вариантах реализации полинуклеотиды включают по меньшей мере один представляющий интерес полинуклеотид. Используемый в данном документе термин «представляющий интерес полинуклеотид» относится к полинуклеотиду, кодирующему полипептид (т. е. представляющий интерес полипептид), вставленный в вектор экспрессии, который необходимо экспрессировать. Вектор может содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 представляющих интерес полинуклеотидов. В некоторых

вариантах реализации представляющий интерес полинуклеотид кодирует полипептид, который оказывает терапевтическое действие при лечении или предотвращении заболевания или нарушения. Представляющие интерес полинуклеотиды и кодируемые ими полипептиды включают как полинуклеотиды, которые кодируют полипептиды дикого типа, так и их функциональные варианты и фрагменты. В конкретных вариантах реализации функциональный вариант идентичен по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% соответствующей последовательности референсного полинуклеотида или полипептида дикого типа. В некоторых вариантах реализации функциональный вариант или фрагмент проявляет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% биологической активности соответствующего полипептида дикого типа.

Полинуклеотиды, предложенные в настоящем описании, независимо от длины самой кодирующей последовательности, могут быть объединены с другими последовательностями ДНК, такими как промоторы и/или энхансеры, нетранслируемые области (НТО), сигнальные последовательности, последовательности Козак, сигналы полиаденилирования, дополнительные сайты рестриктаз, сайты множественного клонирования, участки внутренней посадки рибосомы (IRES), сайты распознавания рекомбиназами (например, сайты LoxP, FRT и Att), стоп-кодона, сигналы терминации транскрипции и полинуклеотиды, кодирующие саморасщепляющиеся полипептиды, эпитопные метки, как описано в других местах настоящего документа или как известно из уровня техники, таким образом, что их общая длина может значительно изменяться. Следовательно, предложено, что может быть использован фрагмент полинуклеотида практически любой длины, при этом общая длина предпочтительно ограничивается легкостью получения и применения в предполагаемом протоколе рекомбинантной ДНК.

В некоторых вариантах реализации в полинуклеотиде или клетке, несущей полинуклеотид, используется суицидальный ген, включая индуцибельный суицидальный ген, для снижения риска прямой токсичности и/или неконтролируемой пролиферации. В некоторых вариантах реализации суицидальный ген не является иммуногенным для хозяина, несущего полинуклеотид или клетку. Отдельным примером суицидального гена, который может быть использован, является каспаза-9,

каспаза-8 или цитозиндеаминаза. Каспаза-9 может быть активирована с применением специфического химического индуктора димеризации (CID).

В некоторых вариантах реализации векторы содержат сегменты генов, которые делают иммунные эффекторные клетки в соответствии с настоящим изобретением, например Т-клетки, восприимчивыми к отрицательной селекции *in vivo*. Под «отрицательной селекцией» подразумевают, что введенная клетка может быть устранена в результате изменения состояния индивида *in vivo*. Отрицательно селективируемый фенотип может быть результатом вставки гена, который придает чувствительность к введенному средству, например соединению. Отрицательно селективируемые гены известны из уровня техники и включают, среди прочего, следующие: ген тимидинкиназы вируса простого герпеса I типа (HSV-I TK) (Wigler et al., Cell 11:223, 1977), который придает чувствительность к ганцикловиру; ген клеточной гипоксантинфосфорибозилтрансферазы (HPRT), ген клеточной аденинфосфорибозилтрансферазы (APRT) и ген бактериальной цитозиндезаминазы (Mullen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:33 (1992)).

В некоторых вариантах реализации генетически модифицированные иммунные эффекторные клетки, такие как Т-клетки, содержат полинуклеотид, дополнительно содержащий маркер положительной селекции, который обеспечивает возможность селекции клеток отрицательно селективируемого фенотипа *in vitro*. Положительно селективируемый маркер может представлять собой ген, который при введении в клетку-хозяина экспрессирует доминантный фенотип, позволяющий положительную селекцию клеток, несущих указанный ген. Гены этого типа известны из уровня техники и включают, среди прочего, ген фосфотрансферазы гигромицина-В (hph), который придает устойчивость к гигромицину В, ген аминогликозидфосфотрансферазы (neo или aph) из Tn5, который кодирует устойчивость к антибиотику G418, ген дигидрофолатредуктазы (DHFR), ген аденозиндезаминазы (ADA) и ген множественной лекарственной устойчивости (MDR).

В некоторых вариантах реализации положительно селективируемый маркер и отрицательно селективируемый элемент связаны таким образом, что утрата отрицательно селективируемого элемента обязательно также сопровождается утратой положительно селективируемого маркера. В некоторых вариантах реализации положительный и отрицательный селективируемые маркеры слиты таким образом, что утрата одного

обязательно приводит к утрате другого. Примером слитого полинуклеотида, который дает в качестве продукта экспрессии полипептид, который придает требуемые позволяющие как положительную, так и отрицательную селекцию свойства, описанные выше, является слитый ген гигромицинофосфотрансферазы и тимидинкиназы (НуТК). Экспрессия этого гена приводит к получению полипептида, который придает устойчивость к гигромицину В для положительной селекции *in vitro* и чувствительность к ганцикловиру для отрицательной селекции *in vivo*. См. Lupton S. D., et al, Mol. and Cell. Biology 11:3374-3378, 1991. В некоторых вариантах реализации полинуклеотида, кодирующие CAR, находятся в ретровирусных векторах, содержащих слитый ген, в частности, в тех, которые придают устойчивость к гигромицину В для положительной селекции *in vitro*, и чувствительность к ганцикловиру для отрицательной селекции *in vivo*, например, в ретровирусном векторе НуТК, описанном в Lupton, S. D. et al. (1991), выше. См. также публикации PCT US91/08442 и PCT/US94/05601, авторы S. D. Lupton, в которых описано применение бифункциональных селектируемых слитых генов, полученных в результате слияния доминантных положительных селектируемых маркеров с отрицательными селектируемыми маркерами.

В некоторых вариантах реализации положительные селектируемые маркеры получены из генов, выбранных из группы, состоящей из *hph*, *neo* и *gpt*, а отрицательные селектируемые маркеры получены из генов, выбранных из группы, состоящей из цитозиндезаминазы, ТК HSV-I, ТК VZV, HPRT, APRT и *gpt*. В некоторых вариантах реализации маркеры представляют собой бифункциональные селектируемые слитые гены, в которых положительно селектируемый маркер получен из *hph* или *neo*, и отрицательно селектируемый маркер получен из цитозиндезаминазы, или гена ТК, или селектируемого маркера индуцируемых суицидальных генов

## **G. Векторы**

Полинуклеотиды могут быть получены, подвергнуты манипуляциям и/или экспрессированы с применением любой из ряда хорошо зарекомендовавших себя методик, известных и доступных в данной области техники. Для экспрессии необходимого полипептида нуклеотидную последовательность, кодирующую этот полипептид, можно вставить в соответствующий вектор.

Термин «вектор» используется в настоящем документе для обозначения молекулы нуклеиновой кислоты, способной переносить или транспортировать другую молекулу нуклеиновой кислоты. Перенесенная нуклеиновая кислота обычно связана с молекулой нуклеиновой кислоты вектора, например, вставлена в нее. Вектор может включать последовательности, которые управляют автономной репликацией в клетке, или может включать последовательности, достаточные для обеспечения интеграции в ДНК клетки-хозяина.

Типичные векторы включают, не ограничиваясь перечисленными, автономно реплицирующиеся последовательности, мРНК, плазмиды (например ДНК-плазмиды или РНК-плазмиды), транспозоны, фагмиды, космиды, искусственные хромосомы, такие как искусственная хромосома дрожжей (YAC), бактериальная искусственная хромосома (BAC) или искусственная хромосома, происходящая из P1 (PAC), бактериофаги, такие как фаг лямбда или фаг M13, и вирусы животных. Примеры категорий вирусов животных, пригодных в качестве векторов, включают, не ограничиваясь перечисленными, ретровирус (включая лентивирус), аденовирус, аденоассоциированный вирус, вирус герпеса (например, вирус простого герпеса), поксвирус, бакуловирус, вирус папилломы и паповавирус (например, SV40). Примеры векторов экспрессии представляют собой векторы pCIneo (Promega) для экспрессии в клетках млекопитающих; pLenti4/V5-DEST™, pLenti6/V5-DEST™ и pLenti6.2/V5-GW/lacZ (Invitrogen) для опосредованного лентивирусами переноса генов и экспрессии в клетках млекопитающих. В некоторых вариантах реализации кодирующие последовательности химерных белков, описанных в настоящем документе, могут быть лигированы в такие векторы экспрессии для экспрессии указанного химерного белка в клетках млекопитающих.

В некоторых вариантах реализации вектор представляет собой эписомный вектор или вектор, который поддерживается внехромосомно. В контексте настоящего документа термин «эписомный» относится к вектору, который способен реплицироваться без интеграции в хромосомную ДНК хозяина и без постепенной потери из делящейся клетки-хозяина, что также означает, что указанный вектор реплицируется внехромосомно или эписомально. Вектор сконструирован таким образом, чтобы он содержал последовательность, кодирующую точку начала репликации ДНК или «ori» из лимфотропного герпеевируса или гамма-герпеевируса, аденовируса, SV40, вируса

папилломы крупного рогатого скота или дрожжей, в частности точку начала репликации лимфотропного герпесвируса или гамма-герпесвируса, соответствующую oriP EBV. В конкретном аспекте лимфотропный герпесвирус может представлять собой вирус Эпштейна-Барр (EBV), герпесвирус саркомы Капоши (KSHV), герпесвирус саймири (HS) или вирус болезни Марека (MDV). Вирус Эпштейна-Барр (EBV) и герпесвирус саркомы Капоши (KSHV) также являются примерами гамма-герпесвируса. Как правило, клетка-хозяин содержит белок-трансактиватор репликации вируса, который активирует репликацию.

«Контрольные элементы» или «регуляторные последовательности», присутствующие в векторе экспрессии, представляют собой нетранслируемые области вектора — точку начала репликации, кассеты селекции, промоторы, энхансеры, сигналы инициации трансляции (последовательность Шайна-Дальгарно или последовательность Козак), интроны, последовательность полиаденилирования, 5'- и 3'-нетранслируемые области, — которые взаимодействуют с клеточными белками хозяина для осуществления транскрипции и трансляции. Такие элементы могут варьироваться по силе и специфичности. В зависимости от используемых векторной системы и хозяина можно использовать любое количество подходящих элементов транскрипции и трансляции, включая универсальные промоторы и индуцибельные промоторы.

В некоторых вариантах реализации векторы включают, не ограничиваясь перечисленными, векторы экспрессии и вирусные векторы, и они будут включать экзогенные, эндогенные или гетерологичные контрольные последовательности, такие как промоторы и/или энхансеры. «Эндогенная» контрольная последовательность представляет собой последовательность, которая в природе связана с данным геном в геноме. «Экзогенная» контрольная последовательность представляет собой последовательность, которую размещают непосредственно рядом с геном с помощью генетической манипуляции (т. е. молекулярно-биологических методик), так что транскрипция этого гена управляется связанным энхансером/промотором. «Гетерологичная» контрольная последовательность представляет собой экзогенную последовательность, которая происходит от вида, отличного от вида, к которому относится клетка, подвергаемая генетической манипуляции.

В контексте настоящего документа термин «промотор» относится к сайту распознавания полинуклеотида (ДНК или РНК), с которым связывается РНК-

полимераза. РНК-полимераза инициирует и осуществляет транскрипцию полинуклеотидов, функционально связанных с промотором. В некоторых вариантах реализации промоторы, функционирующие в клетках млекопитающих, содержат область, богатую АТ, расположенную примерно на расстоянии 25 - 30 оснований против хода транскрипции от сайта, где инициируется транскрипция, и/или другую последовательность, расположенную на расстоянии 70 - 80 оснований против хода транскрипции от начала транскрипции - область CNCAAT, где N может представлять собой любой нуклеотид.

Термин «энхансер» относится к сегменту ДНК, который содержит последовательности, способные обеспечивать усиленную транскрипцию, и в некоторых случаях может функционировать независимо от его ориентации относительно другой контрольной последовательности. Энхансер может функционировать совместно или аддитивно с промоторами и/или другими энхансерными элементами. Термин «промотор/энхансер» относится к сегменту ДНК, который содержит последовательности, способные обеспечивать как промоторные, так и энхансерные функции.

Термин «функционально связанный» относится к размещению в непосредственной близости, при котором описанные компоненты находятся в отношении, позволяющем им функционировать их предполагаемым образом. В одном варианте реализации данный термин относится к функциональной связи между последовательностью контроля экспрессии нуклеиновой кислоты (такой как промотор и/или энхансер) и второй полинуклеотидной последовательностью, например, представляющим интерес полинуклеотидом, где последовательность контроля экспрессии управляет транскрипцией нуклеиновой кислоты, соответствующей второй последовательности.

В контексте настоящего документа термин «последовательность конститутивного контроля экспрессии» относится к промотору, энхансеру или промотору/энхансеру, который постоянно или непрерывно обеспечивает транскрипцию функционально связанной последовательности. Последовательность конститутивного контроля экспрессии может представлять собой «универсальный» промотор, энхансер или промотор/энхансер, который обеспечивает возможность экспрессии в широком спектре типов клеток и тканей, или «клеточноспецифический», «специфический для типа клеток», «специфический для линии клеток» или «тканеспецифический» промотор,

энхансер или промотор/энхансер, который обеспечивает возможность экспрессии в ограниченном ряде типов клеток и тканей, соответственно.

Типичные универсальные последовательности контроля экспрессии, подходящие для применения в конкретных вариантах реализации настоящего изобретения, включают, но не ограничены перечисленными: немедленно-ранний промотор цитомегаловируса (CMV), промотор вируса обезьян 40 (SV40) (например, ранний или поздний), промотор LTR вируса лейкоза мышей Молони (MoMLV), LTR вируса саркомы Рауса (RSV), промотор вируса простого герпеса (HSV) (тимидинкиназы), промоторы H5, P7.5 и P11 вируса осповакцины, промотор фактора элонгации 1-альфа (EF1a), фактора раннего ростового ответа 1 (EGR1), ферритина H (FerH), ферритина L (FerL), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH), фактора инициации трансляции эукариот 4A1 (EIF4A1), белка теплового шока 5 70 кДа (HSPA5), представителя 1 семейства белков теплового шока 90 кДа бета (HSP90B1), белка теплового шока 70 кДа (HSP70),  $\beta$ -кинезина ( $\beta$ -KIN), локуса 26 ROSA человека (Irions *et al.*, *Nature Biotechnology* 25, 1477 - 1482 (2007)), промотора убиквитина С (UBC), промотора фосфоглицераткиназы-1 (PGK), энхансера цитомегаловируса/промотора  $\beta$ -актина кур (CAG), промотора  $\beta$ -актина и промотора MND с энхансером вируса миелопролиферативной саркомы, с делецией участка, опосредующего отрицательную регуляцию, с сайтом связывания праймера, замещенным на последовательность из dl587rev (Challita *et al.*, *J Virol.* 69(2):748-55 (1995)).

В некоторых вариантах реализации вектор содержит промотор MND. В некоторых вариантах реализации вектор содержит промотор EF1a, содержащий первый интрон гена EF1a человека. В некоторых вариантах реализации вектор содержит промотор EF1a, в котором отсутствует первый интрон гена EF1a человека.

В конкретном варианте реализации может быть желательно экспрессировать полинуклеотид, содержащий CAR из промотора, специфичного для Т-клеток.

В контексте настоящего документа термин «условная экспрессия» может относиться к любому типу условной экспрессии, включая, не ограничиваясь перечисленным, индуцибельную экспрессию; репрессируемую экспрессию; экспрессию в клетках или тканях, имеющих определенное физиологическое, биологическое или патологическое состояние, и т. д. Это определение не подразумевает исключения специфической для

типа клеток или тканеспецифической экспрессии. В некоторых вариантах реализации предложена условная экспрессия представляющего интерес полинуклеотида, например, экспрессию контролируют, подвергая клетку, ткань, организм и т. д. обработке или условию, которые вызывают экспрессию полинуклеотида или вызывают повышение или снижение экспрессии полинуклеотида, кодируемого представляющим интерес полинуклеотидом.

Типичные примеры индуцибельных промоторов/систем включают, не ограничиваясь перечисленными, индуцируемые стероидами промоторы, такие как промоторы для генов, кодирующих глюкокортикоидные или эстрогеновые рецепторы (индуцируемые введением соответствующего гормона), промотор металлотионеина (индуцируемый введением различных тяжелых металлов), промотор MX-1 (индуцируемый интерфероном), мифепристон-регулируемую систему «GenSwitch» (Sirin *et al.*, 2003, *Gene*, 323:67), индуцируемый куматом переключатель генов (WO 2002/088346), тетрациклин-зависимые регуляторные системы, и т. д.

Условная экспрессия также может быть достигнута путем применения сайт-специфической ДНК-рекомбиназы. В соответствии с некоторыми вариантами реализации настоящего изобретения вектор содержит по меньшей мере один (как правило, два) сайт(-а) для рекомбинации, опосредованной сайт-специфической рекомбиназой. В контексте данного документа термины «рекомбиназа» или «сайт-специфическая рекомбиназа» включают эксцизионные или интегративные белки, ферменты, кофакторы или ассоциированные белки, которые участвуют в реакциях рекомбинации с участием одного или более сайтов рекомбинации (например, двух, трех, четырех, пяти, семи, десяти, двенадцати, пятнадцати, двадцати, тридцати, пятидесяти и т. д.), которые могут представлять собой белки дикого типа (см. Landy, *Current Opinion in Biotechnology* 3:699-707 (1993)), или мутанты, производные (например, слитые белки, содержащие последовательности белка рекомбинации или их фрагменты), фрагменты и их варианты. Типичные примеры подходящих рекомбиназ включают, но не ограничены перечисленными: Cre, Int, IHF, Xis, Flp, Fis, Hin, Gin, ФС31, Cin, Tn3-резолвазу, TndX, XerC, XerD, TnpX, Hjc, Gin, SpCCE1 и ParA.

Векторы могут содержать один или более сайтов рекомбинации для любой из широкого спектра сайт-специфических рекомбиназ. Следует понимать, что сайт-мишень для сайт-специфической рекомбиназы является дополнением к любому сайту

(сайтам), необходимому для интеграции вектора, например, ретровирусного вектора или лентивирусного вектора. Используемые в данном документе термины «последовательность рекомбинации», «сайт рекомбинации» или «сайт сайт-специфической рекомбинации» относятся к конкретной последовательности нуклеиновой кислоты, которую распознает и с которой связывается рекомбиназа.

Например, одним сайтом рекомбинации для рекомбиназы Cre является loxP, который представляет собой последовательность из 34 пар оснований, содержащую два инвертированных повтора из 13 пар оснований (служащих в качестве сайтов связывания рекомбиназы), фланкирующих коровую последовательность из 8 пар оснований (см. фиг. 1 в Sauer, B., *Current Opinion in Biotechnology* 5:521-527 (1994)). Другие типичные сайты loxP включают, без ограничения, lox511 (Hoess *et al.*, 1996; Bethke and Sauer, 1997), lox5171 (Lee and Saito, 1998), lox2272 (Lee and Saito, 1998), m2 (Langer *et al.*, 2002), lox71 (Albert *et al.*, 1995) и lox66 (Albert *et al.*, 1995).

Подходящие сайты распознавания для рекомбиназы FLP включают, но не ограничены перечисленными: FRT (McLeod, *et al.*, 1996), F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub> (Schlake and Bode, 1994), F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub> (Schlake and Bode, 1994), FRT(LE) (Senecoff *et al.*, 1988), FRT(RE) (Senecoff *et al.*, 1988).

Другими примерами последовательностей распознавания являются последовательности attB, attP, attL и attR, которые распознаются интегразой, представляющей собой фермент рекомбиназу  $\lambda$ , например, phi-c31. SSR  $\phi$ C31 опосредует рекомбинацию только между гетеротипическими сайтами attB (длина 34 п. о.) и attP (длина 39 п. о.) (Groth *et al.*, 2000). Как attB, так и attP, названия которых происходят от сайтов присоединения (attachment) интегразы фага в бактериальном (B) и фаговом (P) геномах, соответственно, содержат несовершенные инвертированные повторы, которые, вероятно, связываются гомодимерами  $\phi$ C31 (Groth *et al.*, 2000). Сайты продукта, attL и attR, фактически инертны к дальнейшей опосредованной  $\phi$ C31 рекомбинации (Belteki *et al.*, 2003), что делает реакцию необратимой. Для катализа вставок было обнаружено, что ДНК, несущая attB, легче вставляется в геномный сайт attP, чем несущая сайт attP - в геномный сайт attB (Thyagarajan *et al.*, 2001; Belteki *et al.*, 2003). Таким образом, в типичных стратегиях посредством гомологичной рекомбинации несущий attP «сайт докинга» помещают в определенный локус, а затем объединяют с несущей attB поступающей последовательностью для вставки.

В контексте настоящего документа термин «участок внутренней посадки рибосомы» или «IRES» относится к элементу, который способствует прямой внутренней посадке рибосомы на инициаторный кодон, такой как ATG, цистрона (область, кодирующая белок), тем самым приводя к кэп-независимой трансляции гена. См., например, Jackson *et al.*, 1990. *Trends Biochem Sci* 15(12):477-83) и Jackson and Kaminski. 1995. *RNA* 1(10):985-1000. В некоторых вариантах реализации векторы включают один или более представляющих интерес полинуклеотидов, которые кодируют один или более полипептидов. В некоторых вариантах реализации для достижения эффективной трансляции каждого из множества полипептидов полинуклеотидные последовательности могут быть разделены одной или более последовательностями IRES или полинуклеотидными последовательностями, кодирующими саморасщепляющиеся полипептиды.

В контексте настоящего документа термин «последовательность Козак» относится к короткой нуклеотидной последовательности, которая значительно облегчает начальное связывание мРНК с малой субъединицей рибосомы и увеличивает трансляцию. Консенсусная последовательность Козак представляет собой (GCC)RCCATGG, где R представляет собой пурин (A или G) (Kozak, 1986. *Cell*. 44(2):283-92, и Kozak, 1987. *Nucleic Acids Res.* 15(20):8125-48). В некоторых вариантах реализации векторы содержат полинуклеотиды, которые содержат консенсусную последовательность Козак и которые кодируют требуемый полипептид, например, CAR.

### ***1. Вирусные векторы***

В некоторых вариантах реализации клетку (например, иммунную эффекторную клетку) трансдуцируют вирусным вектором, например лентивирусным вектором, кодирующим CAR. Например, иммунная эффекторная клетка трансдуцируется вектором, кодирующим CAR, который содержит антитело против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают полипептид MUC16, с внутриклеточным сигнальным доменом CD3 $\zeta$ , CD28, 4-1BB, Oх40 или любыми их комбинациями. Таким образом, эти трансдуцированные клетки могут вызывать CAR-опосредованный цитотоксический ответ.

Типичные примеры векторных систем на основе вирусов, подходящих для применения в конкретных вариантах реализации, предложенных в настоящей заявке,

включают, не ограничиваясь перечисленными, векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV), ретровируса, вируса простого герпеса, аденовируса и вируса осповакцины.

Векторы на основе аденовирусов способны очень эффективно трансдуцировать многие типы клеток и не требуют деления клеток. С помощью таких векторов получали высокий титр и высокие уровни экспрессии. Этот вектор может быть получен в больших количествах в относительно простой системе. Большинство векторов на основе аденовируса сконструированы таким образом, что трансген замещает гены Ad E1a, E1b и/или E3; впоследствии неспособный к репликации вектор размножают в клетках человека 293, которые транс-активно предоставляют функцию удаленного гена. Векторы Ad могут трансдуцировать различные типы тканей *in vivo*, в том числе неделящиеся дифференцированные клетки, такие как клетки, обнаруживаемые в печени, почке и мышцах. Типичные векторы Ad обладают большой емкостью.

При получении и размножении современных аденовирусных векторов, которые неспособны к репликации, может использоваться уникальная линия вспомогательных клеток, обозначенная 293, которая была получена из клеток эмбриональной почки человека путем трансформации фрагментами ДНК Ad5 и конститутивно экспрессирует белки E1 (Graham et al., 1977). Поскольку область E3 необязательна в геноме аденовируса (Jones & Shenk, 1978), современные векторы на основе аденовируса, с помощью клеток 293, несут чужеродную ДНК либо в E1, D3, либо в обеих областях (Graham & Prevec, 1991). Аденовирусные векторы применяли для экспрессии генов в эукариотах (Levrero et al., 1991; Gomez-Foix et al., 1992) и в разработке вакцин (Grunhaus & Horwitz, 1992; Graham & Prevec, 1992). Исследования введения рекомбинантного аденовируса в различные ткани включают инстилляцию трахеи (Rosenfeld et al., 1991; Rosenfeld et al., 1992), мышечную инъекцию (Ragot et al., 1993), периферические внутривенные инъекции (Herz & Gerard, 1993) и стереотаксическую инокуляцию в головной мозг (Le Gal La Salle et al., 1993). Пример применения вектора Ad в клиническом испытании включал терапию полинуклеотидом для противоопухолевой иммунизации путем внутримышечной инъекции (Sternan et al., Hum. Gene Ther. 7:1083-9 (1998)).

В некоторых вариантах реализации один или более полинуклеотидов, кодирующих полицистронную мРНК, кодирующую CAR против MUC16, вводят в иммунную эффекторную клетку, например Т-клетку, путем трансдукции клетки рекомбинантным аденоассоциированным вирусом (rAAV), содержащим один или более полинуклеотидов.

AAV представляет собой небольшой (~26 нм) неспособный к репликации, как правило эписомный, безоболочечный вирус. AAV может инфицировать как делящиеся, так и не делящиеся клетки и может встраивать свой геном в геном клетки-хозяина. Рекомбинантный AAV (rAAV) обычно состоит как минимум из трансгена и его регуляторных последовательностей и 5'- и 3'-инвертированных концевых повторов (ITR) AAV. Последовательности ITR имеют длину приблизительно 145 п. о. В некоторых вариантах реализации rAAV содержит ITR и последовательности капсида, выделенные из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 или AAV10.

В некоторых вариантах реализации применяют химерный rAAV, при этом последовательности ITR выделяют из одного серотипа AAV, а последовательности капсида выделяют из другого серотипа AAV. Например, rAAV с последовательностями ITR, полученными из AAV2, и последовательностями капсида, полученными из AAV6, называют AAV2/AAV6. В конкретных вариантах реализации вектор на основе rAAV может содержать ITR из AAV2 и капсидные белки из любого из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 или AAV10. В некоторых вариантах реализации rAAV содержит последовательности ITR, полученные из AAV2, и последовательности капсида, полученные из AAV6. В некоторых вариантах реализации rAAV содержит последовательности ITR, полученные из AAV2, и последовательности капсида, полученные из AAV2.

В некоторых вариантах реализации по отношению к капсидам AAV можно применять способы конструирования и селекции, чтобы они с большей долей вероятности трансдуцировали представляющие интерес клетки.

Конструирование векторов на основе rAAV, их получение и очистка были описаны, например, в патентах США №№ 9169494; 9169492; 9012224; 8889641; 8809058; и

8784799, описание каждого из которых в полном объеме включено в настоящую заявку посредством ссылки.

В различных вариантах реализации один или более полинуклеотидов, кодирующих CAR, вводят в иммунную эффекторную клетку путем трансдукции клетки вирусом простого герпеса, например HSV-1, HSV-2, содержащим указанные один или более полинуклеотидов. В некоторых вариантах реализации один или более полинуклеотидов, кодирующих полицистронную мРНК, кодирующую CAR, вводят в иммунную эффекторную клетку путем трансдукции клетки вирусом простого герпеса, например HSV-1, HSV-2, содержащим указанные один или более полинуклеотидов.

Зрелый вирион HSV состоит из содержащего оболочку икосаэдрического капсида с вирусным геномом, состоящим из линейной двухцепочечной молекулы ДНК размером 152 т. п. н. В одном варианте реализации вирусный вектор на основе HSV лишен одного или более важных или неважных генов HSV. В одном варианте реализации вирусный вектор на основе HSV неспособен к репликации. Большинство неспособных к репликации векторов HSV имеют делецию одного или более немедленно-ранних, ранних или поздних генов HSV для предотвращения репликации. Например, вектор HSV может быть лишен немедленно-раннего гена, выбранного из группы, состоящей из ICP4, ICP22, ICP27, ICP47 и их комбинации. Преимущества вектора на основе HSV заключаются в его способности входить в латентный период, что может привести к длительной экспрессии ДНК, и в его большом геноме вирусной ДНК, который может вмещать экзогенные ДНК-вставки размером до 25 т. п. н. Векторы на основе HSV описаны, например, в патенте США №№ 5837532, 5846782 и 5804413 и в международных заявках на патенты WO 91/02788, WO 96/04394, WO 98/15637 и WO 99/06583, каждая из которых в полном объеме включена в настоящую заявку посредством ссылки.

Ретровирусы являются распространенным инструментом для доставки генов (Miller, 2000, *Nature*. 357: 455—460). В конкретных вариантах реализации ретровирус применяют для доставки полинуклеотида, кодирующего химерный антигенный рецептор (CAR), в клетку. Используемый в данном документе термин «ретровирус» относится к РНК-вирусу, который обратнo транскрибирует свою геномную РНК в линейную двухцепочечную копию ДНК, а затем ковалентно интегрирует свою

геномную ДНК в геном хозяина. После интеграции вируса в геном хозяина его называют «провирусом». Провирус служит в качестве матрицы для РНК-полимеразы II и направляет экспрессию молекул РНК, которые кодируют структурные белки и ферменты, необходимые для получения новых вирусных частиц.

Типичные ретровирусы, подходящие для применения в конкретных вариантах реализации, включают, но не ограничены перечисленными: вирус лейкоза мышей Молони (M-MuLV), вирус саркомы мышей Молони (MoMSV), вирус саркомы мышей Харви (HaMuSV), вирус опухоли молочной железы мышей (MuMTV), вирус лейкоза гиббонов (GaLV), вирус лейкоза кошачьих (FLV), спумавирус, вирус лейкоза мышей Френда, вирус стволовых клеток мышей (MSCV) и вирус саркомы Рауса (RSV) и лентивирус.

Используемый в данном документе термин «лентивирус» относится к группе (или роду) сложных ретровирусов. Типичные лентивирусы включают, но не ограничены перечисленными: ВИЧ (вирус иммунодефицита человека; в том числе ВИЧ 1 типа и ВИЧ 2 типа); вирус Висна-Маеди (VMV); вирус артрита-энцефалита коз (CAEV); вируса инфекционной анемии лошадей (EIAV); вирус иммунодефицита кошачьих (FIV); вирус иммунодефицита крупного рогатого скота (BIV) и вирус иммунодефицита обезьян (SIV). В одном варианте реализации предпочтительны остовы векторов на основе ВИЧ (т. е. цис-действующие элементы последовательности ВИЧ). В некоторых вариантах реализации лентивирус применяют для доставки полинуклеотида, содержащего CAR, в клетку.

Ретровирусные векторы и, в частности, лентивирусные векторы можно применять при осуществлении на практике конкретных вариантов реализации настоящего изобретения. Соответственно, подразумевают, что в объем термина «ретровирус» или «ретровирусный вектор», используемого в данном документе, входит «лентивирус» и «лентивирусные векторы», соответственно.

Как будет очевидно специалисту в данной области техники, термин «вирусный вектор» широко используется для обозначения либо молекулы нуклеиновой кислоты (например, плазмиды для переноса), которая содержит полученные из вируса элементы нуклеиновой кислоты, которые обычно облегчают перенос молекулы нуклеиновой кислоты или интеграцию в геном клетки, либо вирусной частицы, которая опосредует

перенос нуклеиновой кислоты. Вирусные частицы, как правило, будут одержать различные компоненты вируса и иногда также компоненты клетки-хозяина в дополнение к нуклеиновой(-ым) кислоте(-ам).

Термин «вирусный вектор» может относиться либо к вирусу, либо к вирусной частице, способной переносить нуклеиновую кислоту в клетку, либо к самой перенесенной нуклеиновой кислоте. Вирусные векторы и плазмиды для переноса содержат структурные и/или функциональные генетические элементы, которые в основном получены из вируса. Термин «ретровирусный вектор» относится к вирусному вектору или плазмиде, содержащим структурные и функциональные генетические элементы или их части, которые в основном получены из ретровируса. Термин «лентивирусный вектор» относится к вирусному вектору или плазмиде, содержащим структурные и функциональные генетические элементы или их части, в том числе LTR, которые в основном получены из лентивируса. Термин «гибридный вектор» относится к вектору, LTR или другой нуклеиновой кислоте, содержащей как ретровирусные, например лентивирусные, так и нелентивирусные последовательности вируса. В одном варианте реализации гибридный вектор относится к вектору или плазмиде для переноса, содержащей ретровирусные, например лентивирусные, последовательности для обратной транскрипции, репликации, интеграции и/или упаковки.

В некоторых вариантах реализации термины «лентивирусный вектор», «лентивирусный вектор экспрессии» могут быть использованы для обозначения лентивирусных плазмид для переноса и/или инфекционных лентивирусных частиц. Если в данном документе упоминаются такие элементы, как сайты клонирования, промоторы, регуляторные элементы, гетерологичные нуклеиновые кислоты и т. д., то следует понимать, что последовательности этих элементов присутствуют в форме РНК в лентивирусных частицах и присутствуют в форме ДНК в плаزمиде ДНК.

На каждом конце провируса находятся структуры, называемые «длинными концевыми повторами» или «LTR». Термин «длинный концевой повтор (LTR)» относится к доменам из пар оснований, расположенным на концах ретровирусных ДНК, которые в природном контексте последовательности являются прямыми повторами и содержат области U3, R и U5. LTR обычно осуществляют функции, важнейшие для экспрессии ретровирусных генов (например, промоторную функцию, функцию инициации и полиаденилирования транскриптов генов) и репликации вируса. LTR содержит

множество регуляторных сигналов, включая элементы транскрипционного контроля, сигналы полиаденилирования и последовательности, необходимые для репликации и интеграции вирусного генома. Вирусную LTR разделяют на три области, называемые U3, R и U5. Область U3 содержит энхансерные и промоторные элементы. Область U5 представляет собой последовательность между сайтом связывания праймера и областью R и содержит последовательность полиаденилирования. Область R (повтор) фланкирована областями U3 и U5. LTR состоит из областей U3, R и U5 и присутствует как на 5'-, так и на 3'-концах вирусного генома. К 5'-LTR прилегают последовательности, необходимые для обратной транскрипции генома (сайт связывания праймера тРНК) и для эффективной упаковки вирусной РНК в частицы (сайт Psi).

Используемый в данном документе термин «сигнал упаковки» или «последовательность упаковки» относится к последовательностям, расположенным в пределах ретровирусного генома, которые необходимы для вставки вирусной РНК в вирусный капсид или частицу, см., например, Clever *et al.*, 1995. J. of Virology, Vol. 69, No. 4; pp. 2101–2109. В некоторых ретровирусных векторах используется минимальный сигнал упаковки (также называемый последовательностью пси [Ψ]), необходимый для инкапсулирования вирусного генома. Таким образом, используемые в данном документе термины «последовательность упаковки», «сигнал упаковки», «пси» и «Ψ» используются в отношении некодирующей последовательности, необходимой для инкапсулирования ретровирусных цепей РНК в процессе образования вирусных частиц.

В различных вариантах реализации векторы содержат модифицированные 5'-LTR и/или 3'-LTR. Любой или оба LTR могут содержать одну или более модификаций, включая, но не ограничиваясь перечисленными: одну или более делеций, вставок или замен. Модификации 3'-LTR часто вводят для повышения безопасности лентивирусных или ретровирусных систем, делая вирусы неспособными к репликации. Используемый в данном документе термин «неспособный к репликации» относится к вирусу, который не способен к полной эффективной репликации, так что инфекционные вирионы не продуцируются (например, потомство лентивирусов, неспособное к репликации). Термин «репликационно-компетентный» относится к вирусу дикого типа или мутантному вирусу, который способен реплицироваться, так что в результате

репликации вируса могут образовываться инфекционные вирионы (например, репликационно-компетентное потомство лентивирусов).

«Самоинактивирующиеся» (SIN) векторы относятся к неспособным к репликации векторам, например, ретровирусным или лентивирусным векторам, в которых правая (3') область энхансера-промотора LTR, известная как область U3, была модифицирована (например, путем делеции или замены) для предотвращения транскрипции вируса после первого раунда репликации вируса. Это связано с тем, что правую (3') область U3 LTR используют в качестве матрицы для левой (5') области U3 LTR во время репликации вируса, и, следовательно, вирусный транскрипт не может быть получен без энхансера-промотора U3. В дополнительном варианте реализации настоящего изобретения 3'-LTR модифицируют таким образом, что область U5 заменяют, например, идеальной поли(А)-последовательностью. Следует отметить, что модификации LTR, такие как модификации 3'-LTR, 5'-LTR или как 3'-, так и 5'-LTR, также включены в настоящее изобретение.

Дополнительное повышение безопасности обеспечивается путем замены области U3 5'-LTR гетерологичным промотором для управления транскрипцией вирусного генома в процессе получения вирусных частиц. Примеры гетерологичных промоторов, которые можно применять, включают, например, вирусные промоторы вируса обезьян 40 (SV40) (например, ранний или поздний), цитомегаловируса (CMV) (например, немедленно-ранний), вируса лейкоза мышей Молони (MoMLV), вируса саркомы Рауса (RSV) и вируса простого герпеса (HSV) (тимидинкиназы). Типичные промоторы способны вызывать высокие уровни транскрипции Tat-независимым образом. Эта замена снижает вероятность рекомбинации с образованием репликационно-компетентного вируса, поскольку в системе продукции вируса отсутствует полноразмерная последовательность U3. В некоторых вариантах реализации гетерологичный промотор имеет дополнительные преимущества, позволяя контролировать способ транскрипции вирусного генома. Например, гетерологичный промотор может быть индуцируемым, так что транскрипция всего вирусного генома или его части будет происходить только в присутствии индуцирующих факторов. Индуцирующие факторы включают, но не ограничены перечисленными: одно или более химических соединений или физиологические условия, таких как температура или pH, при которых культивируют клетки-хозяева.

В некоторых вариантах реализации вирусные векторы содержат элемент TAR. Термин «TAR» относится к генетическому элементу «ответа на трансактивацию», расположенному в R-области лентивирусных (например, ВИЧ) LTR. Этот элемент взаимодействует с лентивирусным генетическим элементом трансактиватора (tat) для усиления репликации вируса. Однако этот элемент не требуется в вариантах реализации, в которых область U3 5'-LTR заменена гетерологичным промотором.

Термин «область R» относится к области в пределах ретровирусных LTR, начинающейся в начале экзонирующей группы (т. е. в области начала транскрипции) и заканчивающейся непосредственно перед началом поли(А)-тракта. Область R также определена как фланкированная областями U3 и U5. Область R играет роль во время обратной транскрипции в обеспечении переноса растущей ДНК с одного конца генома на другой.

Используемый в данном документе термин «элемент FLAP» или «сРРТ/FLAP» относится к нуклеиновой кислоте, последовательность которой содержит центральный полипуриновый тракт и центральные последовательности терминации (сРРТ и CTS) ретровируса, например, ВИЧ-1 или ВИЧ-2. Подходящие элементы FLAP описаны в патенте США № 6682907 и в Zennou, *et al.*, 2000, *Cell*, 101:173. Во время обратной транскрипции ВИЧ-1 центральная инициация плюс-цепи ДНК в центральном полипуриновом тракте (сРРТ) и центральная терминация в центральной последовательности терминации (CTS) приводят к образованию трехцепочечной структуры ДНК: центрального флэпа ДНК ВИЧ-1. Не ограничиваясь какой-либо теорией, флэп ДНК может действовать как цис-действующая детерминанта ядерного импорта лентивирусного генома и/или может повышать титр вируса. В конкретных вариантах реализации остовы ретровирусных или лентивирусных векторов содержат один или более элементов FLAP против хода транскрипции или по ходу транскрипции от представляющих интерес гетерологичных генов в векторах. Например, в конкретных вариантах реализации плазмиды для переноса содержат элемент FLAP. В одном варианте реализации вектор в соответствии с настоящим изобретением содержит элемент FLAP, выделенный из ВИЧ-1. В другом варианте реализации лентивирусный вектор содержит элемент FLAP с одной или более мутациями в элементах сРРТ и/или CTS. В еще одном варианте реализации лентивирусный вектор содержит либо элемент

сРРТ, либо элемент СТС. В еще одном варианте реализации лентивирусный вектор не содержит элемент сРРТ или СТС.

В некоторых вариантах реализации ретровирусные или лентивирусные векторы для переноса содержат один или более элементов экспорта. Термин «элемент экспорта» относится к цис-действующему посттранскрипционному регуляторному элементу, который регулирует транспорт транскрипта РНК из ядра в цитоплазму клетки. Примеры элементов экспорта РНК включают, но не ограничены перечисленными: элемент ответа на *rev* (RRE) вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) (см., например, Cullen *et al.*, 1991. *J. Virol.* 65: 1053; и Cullen *et al.*, 1991. *Cell* 58: 423) и посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита В (HPRE). Как правило, элемент экспорта РНК помещен в 3'-НТО гена и может быть вставлен в виде одной или нескольких копий.

В некоторых вариантах реализации экспрессию гетерологичных последовательностей в вирусных векторах повышают путем включения в векторы посттранскрипционных регуляторных элементов, эффективных сайтов полиаденилирования и необязательно сигналов терминации транскрипции. Ряд посттранскрипционных регуляторных элементов может повысить экспрессию гетерологичной нуклеиновой кислоты в белке, например, посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE; Zufferey *et al.*, 1999, *J. Virol.*, 73:2886); посттранскрипционный регуляторный элемент, присутствующий в вирусе гепатита В (HPRE) (Huang *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 5:3864); и т. п. (Liu *et al.*, 1995, *Genes Dev.*, 9:1766). В некоторых вариантах реализации векторы содержат посттранскрипционный регуляторный элемент, такой как WPRE или HPRE

В некоторых вариантах реализации в векторах отсутствует или не содержится посттранскрипционный регуляторный элемент (PTE), такой как WPRE или HPRE, поскольку в некоторых случаях эти элементы повышают риск трансформации клеток и/или существенно или значительно не увеличивают количество транскрипта мРНК или не повышают стабильность мРНК. Следовательно, в некоторых вариантах реализации в векторах отсутствует или не содержится PTE. В некоторых вариантах реализации в векторах отсутствует или не содержится WPRE или HPRE в качестве дополнительной меры безопасности.

Элементы, управляющие эффективной терминацией и полиаденилированием гетерологичных транскриптов нуклеиновых кислот, повышают экспрессию гетерологичных генов. Сигналы терминации транскрипции обычно находятся по ходу транскрипции от сигнала полиаденилирования. В конкретных вариантах реализации векторы содержат последовательность полиаденилирования с 3'-стороны от полинуклеотида, кодирующего полипептид, подлежащий экспрессии. Термин «полиА-сайт» или «полиА-последовательность» в контексте настоящего документа означает последовательность ДНК, которая управляет как терминацией, так и полиаденилированием транскрипта растущей цепи РНК с помощью РНК-полимеразы II. Последовательности полиаденилирования могут способствовать стабильности мРНК путем добавления поли(А)-хвоста к 3'-концу кодирующей последовательности и, таким образом, способствовать повышению эффективности трансляции. Эффективное полиаденилирование рекомбинантного транскрипта желательно, поскольку транскрипты без поли(А)-хвоста нестабильны и быстро разрушаются. Расщепление и полиаденилирование управляется поли(А)-последовательностью в РНК. Коровая поли(А)-последовательность для пре-мРНК млекопитающих содержит два элемента распознавания, фланкирующие сайт расщепления и полиаденилирования. Как правило, почти инвариантный гексамер AAUAAA состоит из 20 - 50 нуклеотидов, расположенных против хода транскрипции от более вариабельного элемента, богатого остатками U или GU. Расщепление растущей цепи транскрипта происходит между этими двумя элементами и связано с добавлением до 250 аденозинов к 5'-продукту расщепления. Типичные примеры поли(А)-сигналов, которые можно применять в векторе в соответствии с настоящим изобретением, включают идеальную поли(А)-последовательность (например, AATAAA, ATTAAA, AGTAAA), поли(А)-последовательность бычьего гормона роста (BGHrA), поли(А)-последовательность β-глобина кролика (rβgrA) или другую подходящую гетерологичную или эндогенную поли(А)-последовательность, известную из уровня техники.

В некоторых вариантах реализации ретровирусный или лентивирусный вектор дополнительно содержит один или более инсуляторных элементов. Инсуляторные элементы могут способствовать защите экспрессируемых лентивирусом последовательностей, например терапевтических полипептидов, от эффектов сайта интеграции, которые могут быть опосредованы цис-действующими элементами, присутствующими в геномной ДНК, и приводить к нарушению регуляции экспрессии

перенесенных последовательностей (т. е. эффекту положения; см., например, Burgess-Beusse et al., 2002, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 99:16433; and Zhan et al., 2001, Hum. Genet., 109:471). В некоторых вариантах реализации векторы для переноса содержат один или более инсуляторных элементов в 3'-LTR, и при интеграции провируса в геном хозяина провирус содержит один или более инсуляторов как в 5'-LTR, так и в 3'-LTR, благодаря дублированию 3'-LTR. Подходящие инсуляторы для применения в настоящем изобретении включают, но не ограничены перечисленными: инсулятор  $\beta$ -глобина курицы (см. Chung et al., 1993. Cell 74:505; Chung et al., 1997. PNAS 94:575; и Bell et al., 1999. Cell 98:387, включенную в данный документ посредством ссылки). Примеры инсуляторных элементов включают, но не ограничены перечисленными: инсулятор из локуса  $\beta$ -глобина, такой как куриный HS4.

В некоторых вариантах реализации большинство или все из последовательностей остова вирусного вектора получены из лентивируса, например, ВИЧ-1. Тем не менее, следует понимать, что можно использовать или комбинировать множество различных источников ретровирусных и/или лентивирусных последовательностей, и можно размещать множество замен и изменений в некоторых лентивирусных последовательностях без ухудшения способности вектора для переноса выполнять функции, описанные в настоящей заявке. Более того, из уровня техники известен ряд лентивирусных векторов, см. Naldini *et al.*, (1996a, 1996b и 1998); Zufferey *et al.*, (1997); Dull *et al.*, 1998, патенты США №№ 6013516 и 5994136, многие из которых могут быть приспособлены для получения вирусного вектора или плазмиды для переноса.

В некоторых вариантах реализации векторы содержат промотор, функционально связанный с полинуклеотидом, кодирующим полипептид CAR. Векторы могут иметь один или более LTR, где любой LTR содержит одну или более модификаций, таких как замена, добавление или делеция одного или более нуклеотидов. Векторы могут дополнительно содержать один или более вспомогательных элементов для повышения эффективности трансдукции (например, cPPT/FLAP), упаковки вируса (например, сигнал упаковки пси ( $\Psi$ ), RRE) и/или других элементов, которые повышают экспрессию терапевтических генов (например, последовательности поли(A)), и могут необязательно содержать WPRE или HPRE.

В различных вариантах реализации вектор представляет собой интегрирующий вирусный вектор.

В различных других вариантах реализации вектор представляет собой эписомный или неинтегрирующий вирусный вектор.

В различных вариантах реализации векторы, предложенные в настоящей заявке, содержат неинтегрирующий или неспособный к интеграции ретровирус. В одном варианте реализации «неспособный к интеграции» ретровирус или лентивирус относится к ретровирусу или лентивирусу, содержащим интегразу, которая не обладает способностью интегрировать вирусный геном в геном клеток-хозяев. В различных вариантах реализации белок интегразы мутируют для специфического снижения его интегразной активности. Неспособные к интеграции лентивирусные векторы получают путем модификации гена *pol*, кодирующего белок интегразу, в результате чего образуется мутантный ген *pol*, кодирующий интегразу, неспособную осуществлять интеграцию. Такие неспособные к интеграции вирусные векторы были описаны в заявке на патент WO 2006/010834, описание которой в полном объеме включено в настоящую заявку посредством ссылки.

Типичные мутации в гене *pol* ВИЧ-1, подходящие для снижения активности интегразы, включают, но не ограничены перечисленными: H12N, H12C, H16C, H16V, S81 R, D41A, K42A, H51A, Q53C, D55V, D64E, D64V, E69A, K71A, E85A, E87A, D116N, D116I, D116A, N120G, N120I, N120E, E152G, E152A, D35E, K156E, K156A, E157A, K159E, K159A, K160A, R166A, D167A, E170A, H171A, K173A, K186Q, K186T, K188T, E198A, R199c, R199T, R199A, D202A, K211A, Q214L, Q216L, Q221 L, W235F, W235E, K236S, K236A, K246A, G247W, D253A, R262A, R263A и K264H.

Типичные мутации в гене *pol* ВИЧ-1, подходящие для снижения активности интегразы, включают, но не ограничены перечисленными: D64E, D64V, E92K, D116N, D116I, D116A, N120G, N120I, N120E, E152G, E152A, D35E, K156E, K156A, E157A, K159E, K159A, W235F и W235E.

В конкретном варианте реализации интегразы содержит мутацию в одной или более аминокислотах, D64, D116 или E152. В одном варианте реализации интегразы содержит мутацию в аминокислотах D64, D116 и E152. В конкретном варианте реализации дефектная интегразы ВИЧ-1 содержит мутацию D64V.

«Клетка-хозяин» включает клетки, в которые ввели путем электропорации, трансфекции, инфекции или трансдукции *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro* рекомбинантный

вектор или полинуклеотид в соответствии с настоящим изобретением. Клетки-хозяева могут включать упаковывающие клетки, продуцирующие клетки и клетки, инфицированные вирусными векторами. В конкретных вариантах реализации клетки-хозяева, инфицированные вирусным вектором в соответствии с настоящим изобретением, вводят субъекту, нуждающемуся в терапии. В некоторых вариантах реализации термин «клетка-мишень» используется взаимозаменяемо с термином «клеткой-хозяин» и относится к трансфицированным, инфицированным или трансдуцированным клеткам требуемого типа клеток. В предпочтительных вариантах реализации клетка-мишень представляет собой Т-клетку.

Вирусные векторы, содержащие полинуклеотиды, предложенные в конкретных вариантах реализации, можно доставлять *in vivo* путем введения отдельному пациенту, как правило, путем системного введения (например, внутривенной, внутривенной, внутримышечной, подкожной или внутривенной инфузии) или местного применения, как описано ниже. В качестве альтернативы векторы могут доставляться в клетки *ex vivo*, такие как клетки, эксплантированные из организма отдельного пациента (например, мобилизованная периферическая кровь, лимфоциты, аспираты костного мозга, биоптат ткани и т. д.) или универсальные донорские гемопоэтические стволовые клетки с последующей реимплантацией клеток пациенту.

В одном варианте реализации вирусный вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий CAR, вводят непосредственно в организм для трансдукции клеток *in vivo*. Введение осуществляют любым из путей, обычно применяемых для приведения молекулы в окончательный контакт с клетками крови или ткани, включая, но не ограничиваясь перечисленными: инъекцию, инфузию, местное нанесение и электропорацию. Подходящие способы введения таких нуклеиновых кислот доступны и хорошо известны специалистам в данной области техники, и хотя для введения конкретной композиции можно применять более одного пути, конкретный путь часто может обеспечивать более быстросействующую и более эффективную реакцию, чем другой путь.

Для достижения приемлемого титра вируса часто требуется крупномасштабное получение вирусных частиц. Вирусные частицы получают путем трансфекции вектором для переноса линии упаковывающих клеток, которая содержит структурные

и/или вспомогательные гены вируса, например гены gag, pol, env, tat, rev, vif, vpr, vpx, vprx или nef или другие гены ретровируса.

Используемый в данном документе термин «упаковывающий вектор» относится к вектору экспрессии или вирусному вектору, в котором отсутствует сигнал упаковки и который содержит полинуклеотид, кодирующий один, два, три, четыре или более структурных и/или вспомогательных генов вируса. Как правило, упаковывающие векторы включены в упаковывающую клетку, и их вводят в клетку путем трансфекции, трансдукции или инфекции. Способы трансфекции, трансдукции или инфекции хорошо известны специалистам в данной области техники. Ретровирусный/лентивирусный вектор для переноса в соответствии с настоящим изобретением можно ввести в упаковывающую линию клеток путем трансфекции, трансдукции или инфекции с получением продуцирующей клетки или линии клеток. Упаковывающие векторы в соответствии с настоящим изобретением можно вводить в клетки или линии клеток человека с помощью стандартных способов, в том числе, например, трансфекции фосфатом кальция, липофекции или электропорации. В некоторых вариантах реализации упаковывающие векторы вводят в клетки вместе с доминантным селективируемым маркером, таким как неомицин, гигромицин, пурамицин, бластоцидин, зеоцин, тимидинкиназа, DHFR, Gln-синтетаза или ADA, с последующей селекцией в присутствии соответствующего лекарственного средства и выделением клонов. Ген селективируемого маркера может быть физически связан с генами, кодирующими упаковывающий вектор, например, посредством IRES или саморасщепляющихся пептидов вируса.

Белки оболочки (env) вируса определяют диапазон клеток-хозяев, которые в конечном итоге могут быть инфицированы и трансформированы рекомбинантными ретровирусами, полученными из линий клеток. В случае лентивирусов, таких как ВИЧ-1, ВИЧ-2, SIV, FIV и EIV, белки env включают gp41 и gp120. Предпочтительно белки env вируса, экспрессируемые упаковывающими клетками в соответствии с настоящим изобретением, кодируются отдельным вектором от такового для генов gag и pol вируса, как было описано ранее.

Типичные примеры полученных из ретровирусов генов env, которые можно использовать в настоящем изобретении, включают, но не ограничены перечисленными: оболочки MLV, оболочку 10A1, BAEV, FeLV-B, RD114, SSAV, Эбола, Сендай, FPV

(вирус чумы птиц) и оболочки вируса гриппа. Аналогичным образом, можно использовать гены, кодирующие оболочки из РНК-вирусов (например, семейства РНК-вирусов Picornaviridae, Calciviridae, Astroviridae, Togaviridae, Flaviviridae, Coronaviridae, Paramyxoviridae, Rhabdoviridae, Filoviridae, Orthomyxoviridae, Bunyaviridae, Arenaviridae, Reoviridae, Birnaviridae, Retroviridae), а также из ДНК-вирусов (семейства Hepadnaviridae, Circoviridae, Parvoviridae, Papovaviridae, Adenoviridae, Herpesviridae, Poxviridae и Iridoviridae). Типичные примеры включают FeLV, VEE, HFVW, WDSV, SFV, вирус бешенства, ALV, BIV, BLV, EBV, CAEV, SNV, ChTLV, STLV, MPMV, SMRV, RAV, FuSV, MH2, AEV, AMV, CT10 и EIAV.

В других вариантах реализации белки оболочки для псевдотипирования вируса в соответствии с настоящим изобретением включают, но не ограничены каким-либо из следующих вирусов: вирус гриппа А, такой как H1N1, H1N2, H3N2 и H5N1 (вирус птичьего гриппа), вирус гриппа В, вирус гриппа С, вирус гепатита А, вирус гепатита В, вирус гепатита С, вирус гепатита D, вирус гепатита Е, ротавирус, любой вирус группы вируса Норуолк, энтеральные аденовирусы, парвовирус, вирус лихорадки денге, вирус оспы обезьян, мононегавирусы, лиссавирус, такой как вирус бешенства, вирус лагосских летучих мышей, вирус Мокола, вирус Дювенхаге, вирус европейских летучих мышей 1 и 2 и вирус австралийских летучих мышей, эфемеровирус, везикуловирус, вирус везикулярного стоматита (VSV), герпесвирусы, такие как вирус простого герпеса типов 1 и 2, вирус ветряной оспы, цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Бар (EBV), вирусы герпеса человека (HHV), вирус герпеса человека типов 6 и 8, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирус папилломы, мышинный гаммагерпесвирус, аренавирусы, такие как вирус аргентинской геморрагической лихорадки, вирус геморрагической лихорадки Боливии, Сабия-ассоциированный вирус геморрагической лихорадки, вирус венесуэльской геморрагической лихорадки, вирус лихорадки Ласса, вирус Мачупо, вирус лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), буньявирусы, такие как вирус конго-крымской геморрагической лихорадки, хантавирус, вирус, вызывающий геморрагическую лихорадку с почечным синдромом, вирус лихорадки долины Рифт, Filoviridae (филовирус), включая геморрагическую лихорадку Эбола и геморрагическую лихорадку Марбурга, флавивирусы, включая вирус Кьясанурской лесной болезни, вирус геморрагической лихорадки Омска, вирус, вызывающий клещевой энцефалит, и парамиксовирусы, такие как вирус Хендра и вирус Нипах, большая оспа и малая оспа (натуральная оспа), альфа-вирусы, такие как вирус

венесуэльского энцефалита лошадей, вирус восточного энцефалита лошадей, вирус западного энцефалита лошадей, SARS-ассоциированный коронавирус (SARS-CoV), вирус Западного Нила, любой вирус, вызывающий энцефалит.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложены упаковывающие клетки, которые продуцируют рекомбинантный ретровирус, например лентивирус, псевдотипированный гликопротеином VSV-G.

Используемые в данном документе термины «псевдотип» или «псевдотипирование» относятся к вирусу, белки вирусной оболочки которого были замещены белками оболочки другого вируса, обладающего предпочтительными характеристиками. Например, ВИЧ может быть псевдотипирован белками оболочки G вируса везикулярного стоматита (VSV-G), которые позволяют ВИЧ инфицировать более широкий спектр клеток, поскольку белки оболочки ВИЧ (кодируемые геном env) обычно нацеливают вирус на CD4<sup>+</sup> презентующие клетки. В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения белки оболочки лентивируса псевдотипируют белками VSV-G. В одном варианте реализации в соответствии с настоящим изобретением предложены упаковывающие клетки, которые продуцируют рекомбинантный ретровирус, например лентивирус, псевдотипированный гликопротеином оболочки VSV-G.

Используемый в данном документе термин «упаковывающие линии клеток» используют в отношении линий клеток, которые не содержат сигнала упаковки, но стабильно или временно экспрессируют структурные белки вируса и ферменты репликации (например, gag, pol и env), которые необходимы для правильной упаковки вирусных частиц. Для получения упаковывающих клеток в соответствии с настоящим изобретением можно использовать любую подходящую линию клеток. Как правило, клетки представляют собой клетки млекопитающих. В конкретном варианте реализации клетки, применяемые для получения линии упаковывающих клеток, представляют собой клетки человека. Подходящие линии клеток, которые можно применять, включают, например, клетки CHO, клетки ВНК, клетки MDCK, клетки СЗН 10Т1/2, клетки FLY, клетки Psi-2, клетки BOSC 23, клетки PA317, клетки WENI, клетки COS, клетки BSC 1, клетки BSC 40, клетки BMT 10, клетки VERO, клетки W138, клетки MRC5, клетки A549, клетки HT1080, клетки 293, клетки 293Т, клетки В-50, клетки 3Т3, клетки NIH3Т3, клетки HepG2, клетки Saos-2, клетки Huh7, клетки HeLa,

клетки W163, клетки 211 и клетки 211A. В предпочтительных вариантах реализации упаковывающие клетки представляют собой клетки 293, клетки 293Т или клетки А549. В другом предпочтительном варианте реализации клетки представляют собой клетки А549.

Используемый в данном документе термин «линия клеток-продуцентов» относится к линии клеток, которая способна продуцировать рекомбинантные ретровирусные частицы, содержащей линию упаковывающих клеток и конструкцию вектора для переноса, содержащую сигнал упаковки. Получение инфекционных вирусных частиц и исходных растворов вирусов можно осуществлять с использованием обычных методик. Способы получения исходных растворов вируса известны из уровня техники и проиллюстрированы, например, в Y. Soneoka *et al.* (1995) *Nucl. Acids Res.* 23:628—633 и N. R. Landau *et al.* (1992) *J. Virol.* 66:5110-5113. Инфекционные частицы вируса можно собирать из упаковывающих клеток с применением обычных методик. Например, инфекционные частицы можно собирать путем лизиса клеток или сбора супернатанта культуры клеток, как известно из уровня техники. Необязательно собранные вирусные частицы можно очистить при необходимости. Подходящие методики очистки хорошо известны специалистам в данной области техники.

Доставка гена(-ов) или другой полинуклеотидной последовательности с использованием ретровирусного или лентивирусного вектора посредством вирусной инфекции, а не посредством трансфекции, называется «трансдукцией». В одном варианте реализации ретровирусными векторами трансдуцируют клетку посредством инфекции и интеграции провируса. В некоторых вариантах реализации клетка-мишень, например Т-клетка, является «трансдуцированной», если она содержит ген или другую полинуклеотидную последовательность, доставляемую в клетку путем инфицирования с применением вирусного или ретровирусного вектора. В конкретных вариантах реализации трансдуцированная клетка содержит один или более генов или других полинуклеотидных последовательностей, доставляемых ретровирусным или лентивирусным вектором, в своем клеточном геноме.

В конкретных вариантах реализации клетки-хозяева, трансдуцированные вирусным вектором в соответствии с настоящим изобретением, который экспрессирует один или более полипептидов, вводят субъекту для лечения и/или предотвращения заболевания. Другие способы, относящиеся к применению вирусных векторов в генной терапии,

которые можно применять в соответствии с некоторыми вариантами реализации настоящего изобретения, можно найти, например, в Kay, M. A. (1997) *Chest* 111(6 Supp.):138S-142S; Ferry, N. and Heard, J. M. (1998) *Hum. Gene Ther.* 9:1975—81; Shiratory, Y. *et al.* (1999) *Liver* 19:265—74; Oka, K. *et al.* (2000) *Curr. Opin. Lipidol.* 11:179—86; Thule, P. M. and Liu, J. M. (2000) *Gene Ther.* 7:1744-52; Yang, N. S. (1992) *Crit. Rev. Biotechnol.* 12:335-56; Alt, M. (1995) *J. Hepatol.* 23:746—58; Brody, S. L. and Crystal, R. G. (1994) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 716:90-101; Strayer, D. S. (1999) *Expert Opin. Investig. Drugs* 8:2159-2172; Smith-Arica, J. R. and Bartlett, J. S. (2001) *Curr. Cardiol. Rep.* 3:43-49; и Lee, H. C. *et al.* (2000) *Nature* 408:483-8.

#### **Н. Генетически модифицированные клетки.**

В некоторых вариантах реализации в соответствии с настоящим изобретением предложены клетки, генетически модифицированные для экспрессии CAR, предложенных в настоящей заявке. В некоторых вариантах реализации генетически модифицированные клетки предназначены для применения для лечения рака (например, рака, экспрессирующего MUC16). Используемый в данном документе термин «генетически сконструированный» или «генетически модифицированный» относится к добавлению дополнительного генетического материала в форме ДНК или РНК в общий генетический материал в клетке. Термины «генетически модифицированные клетки», «модифицированные клетки» и «перенацеленные клетки» используются взаимозаменяемо. Используемый в данном документе термин «генная терапия» относится к введению дополнительного генетического материала в форме ДНК или РНК в общий генетический материал в клетке, который восстанавливает, корректирует или модифицирует экспрессию гена, или вводится с целью экспрессии терапевтического полипептида, например CAR.

В некоторых вариантах реализации CAR, предложенные в настоящей заявке, вводят и экспрессируют в иммунных эффекторных клетках таким образом, чтобы перенацелить их специфичность на представляющий интерес целевой антиген, например полипептид MUC16. «Иммунная эффекторная клетка» представляет собой любую клетку иммунной системы, которая выполняет одну или более эффекторных функций (например, цитотоксическую активность уничтожения клеток, секрецию цитокинов, индукцию ADCC (антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность) и/или CDC (комплемент-зависимая цитотоксичность)).

Иммунные эффекторныe клетки в соответствии с настоящим изобретением могут быть аутологичными/аутогенными («собственными») или неаутологичными («чужеродными»), например, аллогенными, сингенными или ксеногенными). «Аутологичный» в контексте настоящего документа относится к клеткам от того же субъекта. «Аллогенный» в контексте настоящего документа относится к клеткам того же биологического вида, которые генетически отличаются от сравниваемой клетки. «Сингенный» в контексте настоящего документа относится к клеткам от другого субъекта, генетически идентичным со сравниваемой клеткой. «Ксеногенный» в контексте настоящего документа относится к клеткам биологического вида, отличного от сравниваемой клетки. В предпочтительных вариантах реализации клетки в соответствии с настоящим изобретением являются аллогенными.

Типичные иммунные эффекторныe клетки, применяемые с CAR, предложенными в настоящей заявке, включают Т-лимфоциты. Термины «Т-клетка» или «Т-лимфоцит» являются принятыми в данной области техники и подразумевают включение тимоцитов, незрелых Т-лимфоцитов, зрелых Т-лимфоцитов, покоящихся Т-лимфоцитов или активированных Т-лимфоцитов. Т-клетка может представлять собой хелперную Т-клетку (Th), например, Т-хелпера 1 (Th1) или Т-хелпера 2 (Th2). Т-клетка может представлять собой хелперную Т-клетку (HTL; CD4<sup>+</sup> Т-клетку), CD4<sup>+</sup> Т-клетку, цитотоксическую Т-клетку (CTL; CD8<sup>+</sup> Т-клетку), CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т-клетку, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> Т-клетку или любую другую субпопуляцию Т-клеток. Другие типичные популяции Т-клеток, подходящих для применения в конкретных вариантах реализации, включают необученные Т-клетки (TN), Т-клетки памяти, стволовые Т-клетки памяти (TSCM), Т-клетки центральной памяти (TCM), Т-клетки эффекторной памяти (TEM) и эффекторные Т-клетки (TEFF).

Как будет ясно специалисту в данной области техники, другие клетки также можно применять в качестве иммунных эффекторных клеток с CAR, описанными в настоящей заявке. В частности, иммунные эффекторные клетки также включают НК-клетки, NKT-клетки, нейтрофилы и макрофаги. Иммунные эффекторные клетки также включают предшественников эффекторных клеток, где такие клетки-предшественники могут быть индуцированы для дифференцировки в иммунные эффекторные клетки *in vivo* или *in vitro*. Таким образом, в некоторых вариантах реализации иммунная эффекторная клетка включает предшественников иммунных эффекторных клеток, таких как

гемопоэтические стволовые клетки (HSC), содержащиеся в популяции CD34+ клеток, полученных из пуповинной крови, костного мозга или мобилизованной периферической крови, которые при введении в организм субъекта дифференцируются в зрелые иммунные эффекторные клетки, или которые могут быть индуцированы *in vitro* для дифференцировки в зрелые иммунные эффекторные клетки.

В данном документе иммунные эффекторные клетки, генетически сконструированные таким образом, чтобы они содержали MUC16-специфический CAR, могут называться «MUC16-специфическими перенацеленными иммунными эффекторными клетками».

Термин «CD34+ клетка» в контексте настоящего документа относится к клетке, экспрессирующей белок CD34 на своей поверхности клетки. «CD34» в контексте настоящего документа относится к гликопротеину поверхности клетки (например, сиаломуциновому белку), который часто выполняет функцию фактора адгезии клеток и участвует во входе Т-клеток в лимфатические узлы. Популяция CD34+ клеток содержит гемопоэтические стволовые клетки (HSC), которые после введения пациенту дифференцируются и вносят вклад во все гемопоэтические линии, включая Т-клетки, НК-клетки, НКТ-клетки, нейтрофилы и клетки моноцитарно-макрофагальной линии.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложены способы получения иммунных эффекторных клеток, которые экспрессируют CAR, предложенный в настоящей заявке. В некоторых вариантах реализации указанный способ включает трансфекцию или трансдукцию иммунных эффекторных клеток, выделенных из индивида, таким образом, что иммунные эффекторные клетки экспрессируют один или более CAR, описанных в данном документе. В некоторых вариантах реализации иммунные эффекторные клетки выделяют из организма индивида и генетически модифицируют без проведения дополнительных манипуляций *in vitro*. Затем такие клетки могут быть непосредственно повторно введены индивиду. В дополнительных вариантах реализации иммунные эффекторные клетки сначала активируют и стимулируют к пролиферации *in vitro* перед генетической модификацией для экспрессии CAR. В этой связи иммунные эффекторные клетки могут быть культивированы до и/или после генетической модификации (т.е. трансдукции или трансфекции для экспрессии CAR, предложенных в настоящей заявке).

В некоторых вариантах реализации перед проведением манипуляции *in vitro* или генетической модификации иммунных эффекторных клеток, описанных в настоящем документе, источник клеток получают от субъекта. В некоторых вариантах реализации CAR-модифицированные иммунные эффекторные клетки включают Т-клетки. Т-клетки могут быть получены из ряда источников, включая, но не ограничиваясь перечисленными: мононуклеарные клетки периферической крови, костный мозг, ткань лимфатических узлов, пуповинную кровь, ткань тимуса, ткань из очага инфекции, асцит, плевральный выпот, ткань селезенки и опухоли. В некоторых вариантах реализации Т-клетки могут быть получены из единицы крови, собранной у субъекта, с применением любого количества методик, известных специалисту в данной области техники, таких как седиментация, например, разделение в фиколле (FICOLL™). В некоторых вариантах реализации клетки из циркулирующей крови индивида получают путем афереза. Продукт афереза обычно содержит лимфоциты, включая Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядросодержащие белые кровяные клетки, эритроциты и тромбоциты. В некоторых вариантах реализации клетки, собранные путем афереза, можно промыть для удаления фракции плазмы крови и для помещения клеток в подходящий буфер или среду для последующей обработки. Клетки можно промыть ФБР или другим подходящим раствором, в котором отсутствуют кальций, магний и большинство, если не все другие, двухвалентных катионов. Специалистам в данной области техники будет понятно, что этап промывки можно осуществлять способами, известными специалистам в данной области техники, например, с использованием полуавтоматической проточной центрифуги. Например, устройство для обработки клеток Cobe 2991, CytoMate Baxter или т. п. После промывки клетки можно ресуспендировать в различных биологически совместимых буферах или другом физиологическом растворе с буфером или без него. В некоторых вариантах реализации нежелательные компоненты образца афереза могут быть удалены непосредственно в ресуспендированной культуральной среде клетки.

В некоторых вариантах реализации Т-клетки выделяют из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) путем лизиса эритроцитов и обеднения моноцитами, например, путем центрифугирования в градиенте перколла (PERCOLL™). Затем можно выделить конкретную субпопуляцию Т-клеток, экспрессирующих один или более из следующих маркеров: CD3, CD28, CD4, CD8, CD45RA и CD45RO, с помощью методик положительной или отрицательной селекции. В одном варианте реализации затем

выделяют конкретную субпопуляцию Т-клеток, экспрессирующих CD3, CD28, CD4, CD8, CD45RA и CD45RO, с помощью методик положительной или отрицательной селекции. Например, обогащение популяции Т-клеток путем отрицательной селекции можно осуществить с помощью комбинации антител, нацеленных на маркеры на поверхности клетки, уникальные для подвергнутых отрицательной селекции клеток. Один способ для применения в соответствии с настоящим изобретением представляет собой сортировку и/или селекцию путем отрицательной магнитной иммуноадгезии или проточной цитометрии, в которых используется смесь моноклональных антител, нацеленных на маркеры поверхности клетки, присутствующие на клетках, подвергнутых отрицательной селекции. Например, для обогащения CD4<sup>+</sup> клетками путем отрицательной селекции смесь моноклональных антител обычно содержит антитела против CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR и CD8. Проточную цитометрию и сортировку клеток также можно применять для выделения представляющих интерес популяций клеток для применения в настоящем изобретении.

МКПК можно непосредственно генетически модифицировать для экспрессии CAR с применением способов, предложенных в настоящей заявке. В некоторых вариантах реализации после выделения МКПК дополнительно выделяют Т-лимфоциты и, в отдельных вариантах реализации, как цитотоксические, так и хелперные Т-лимфоциты могут быть отсортированы на субпопуляции необученных Т-клеток, Т-клеток памяти и эффекторных Т-клеток либо до, либо после генетической модификации и/или размножения.

CD8<sup>+</sup> клетки можно получить с помощью стандартных способов. В некоторых вариантах реализации CD8<sup>+</sup> клетки дополнительно сортируют на необученные клетки, клетки центральной памяти и эффекторные клетки путем идентификации антигенов поверхности клетки, которые ассоциированы с каждым из этих типов CD8<sup>+</sup> клеток.

В некоторых вариантах реализации необученные CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты характеризуются экспрессией фенотипических маркеров необученных Т-клеток, включая CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD127 и CD45RA.

В некоторых вариантах реализации Т-клетки памяти присутствуют как в CD62L<sup>+</sup>, так и в CD62L<sup>-</sup> субпопуляциях CD8<sup>+</sup> лимфоцитов периферической крови. МКПК сортируют на фракции CD62L<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> и CD62L<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> после окрашивания антителами против CD8 и

против CD62L. В некоторых вариантах реализации экспрессия фенотипических маркеров Т-клеток центральной памяти включает CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 и CD127, и они отрицательны по гранзиму В. В некоторых вариантах реализации Т-клетки центральной памяти представляют собой CD45RO<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> Т-клетки.

В некоторых вариантах реализации эффекторные Т-клетки отрицательны по CD62L, CCR7, CD28 и CD127 и положительны по гранзиму В и перфоруину.

В некоторых вариантах реализации CD4<sup>+</sup> Т-клетки дополнительно сортируют на субпопуляции. Например, CD4<sup>+</sup> Т-хелперные клетки можно сортировать на необученные клетки, клетки центральной памяти и эффекторные клетки путем идентификации популяций клеток, которые содержат антигены поверхности клетки. CD4<sup>+</sup> лимфоциты можно получать стандартными способами. В некоторых вариантах реализации необученные CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты представляют собой CD45RO<sup>-</sup>, CD45RA<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Т-клетки. В некоторых вариантах реализации CD4<sup>+</sup> клетки центральной памяти являются CD62L-положительными и CD45RO-положительными. В некоторых вариантах реализации эффекторные CD4<sup>+</sup> клетки являются CD62L- и CD45RO-отрицательными.

Иммунные эффекторные клетки, такие как Т-клетки, могут быть генетически модифицированы после выделения с помощью известных методов, или иммунные эффекторные клетки могут быть активированы и размножены (или дифференцированы в случае предшественников) *in vitro* перед проведением генетической модификации. В некоторых вариантах реализации иммунные эффекторные клетки, такие как Т-клетки, генетически модифицируют химерными антигенными рецепторами, предложенными в данном документе (например, трансдуцируют вирусным вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR), а затем активируют и размножают *in vitro*. В различных вариантах реализации Т-клетки могут быть активированы и размножены до или после проведения генетической модификации для экспрессии CAR с помощью способов, описанных, например, в патентах США №№ 6352694, 6534055, 6905680, 6692964, 5858358, 6887466, 6905681, 7144575; 7067318, 7172869, 7232566, 7175843, 5883223, 6905874, 6797514, 6867041, и публикации заявки на патент США № 20060121005.

Как правило, Т-клетки размножают путем контакта с поверхностью, к которой присоединено средство, которое стимулирует сигнал, ассоциированный с комплексом CD3 TCR, и лиганд, который стимулирует костимулирующую молекулу на поверхности Т-клеток. Популяции Т-клеток можно стимулировать путем контакта с антителом против CD3 или его антигенсвязывающим фрагментом или антителом против CD2, иммобилизованным на поверхности, или путем контакта с активатором протеинкиназы С (например, бриостатином) в сочетании с ионофором кальция. Также предложена костимуляция вспомогательных молекул на поверхности Т-клеток.

В некоторых вариантах реализации МКПК или выделенные Т-клетки приводят в контакт со стимулирующим средством и костимулирующим средством, таким как антитело против CD3 и антитело против CD28, как правило, присоединенными к грануле или другой поверхности, в культуральной среде с соответствующими цитокинами, такими как IL-2, IL-7 и/или IL-15. Для стимуляции пролиферации либо CD4<sup>+</sup> Т-клеток, либо CD8<sup>+</sup> Т-клеток используют антитело против CD3 и антитело против CD28. Примеры антител против CD28, которые можно применять, включают 9.3, B-T3, XR-CD28 (Diacione, Besancon, Франция), как и другие способы, широко известные из уровня техники (Berg et al., *Transplant Proc.* 30(8):3975-3977, 1998; Haanen et al., *J. Exp. Med.* 190(9): 13191328, 1999; Garland et al., *J. Immunol Meth.* 227( 1 -2):53-63, 1999). Антитела против CD3 и против CD28, присоединенные к одной и той же грануле, служат в качестве «суррогатной» антигенпрезентирующей клетки (АПК). В других вариантах реализации Т-клетки можно активировать и стимулировать к пролиферации с помощью питающих клеток и подходящих антител и цитокинов с применением способов, таких как описанные в US6040177; US5827642 и WO2012129514.

В некоторых вариантах реализации получают искусственные АПК (иАПК) путем конструирования клеток K562, U937, 721.221, T2 и C1R для управления стабильной экспрессией и секрецией ряда костимулирующих молекул и цитокинов. В конкретном варианте реализации иАПК K32 или U32 применяют для управления отображением одной или более стимулирующих молекул на основе антител на поверхности клетки иАПК. Экспрессия различных комбинаций генов на иАПК позволяет точно определить требования для активации Т-клеток человека, так что иАПК можно специально приспособить для оптимального размножения субпопуляций Т-клеток с конкретными

потребностями для роста и различными функциями. иАПК поддерживают рост *ex vivo* и длительное размножение функциональных CD8 Т-клеток человека без необходимости добавления экзогенных цитокинов, в отличие от применения природных АПК. Популяции Т-клеток могут быть размножены с помощью иАПК, экспрессирующих различные костимулирующие молекулы, включая, но не ограничиваясь перечисленными: CD137L (4-1BBL), CD134L (OX40L) и/или CD80 или CD86. Наконец, иАПК предоставляют эффективную платформу для размножения генетически модифицированных Т-клеток и для поддержания экспрессии CD28 на CD8 Т-клетках. иАПК, представленные в WO 03/057171 и US2003/0147869, настоящим в полном объеме включены в данную заявку посредством ссылки.

В некоторых вариантах реализации CD34<sup>+</sup> клетки трансдуцируют конструкцией нуклеиновой кислоты, предложенной в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации трансдуцированные CD34<sup>+</sup> клетки дифференцируются в зрелые иммунные эффекторные клетки *in vivo* после введения субъекту, как правило, субъекту, из организма которого указанные клетки были первоначально выделены. В некоторых вариантах реализации CD34<sup>+</sup> клетки могут быть стимулированы *in vitro* до контакта с CAR или после проведения генетической модификации CAR, описанными в настоящей заявке, одним или более из следующих цитокинов: лигандом Flt-3 (FLT3), фактором стволовых клеток (SCF), фактором роста и дифференцировки мегакариоцитов (TPO), IL-3 и IL-6, в соответствии со способами, описанными ранее (Asheuer *et al.*, 2004; Imren, *et al.*, 2004).

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложена популяция модифицированных иммунных эффекторных клеток для лечения рака, при этом указанные модифицированные иммунные эффекторные клетки содержат CAR, описанный в настоящей заявке. Например, популяцию модифицированных иммунных эффекторных клеток получают из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), полученных от пациента, у которого диагностирован рак, описанный в настоящем документе (аутологичные доноры). МКПК образуют гетерогенную популяцию Т-лимфоцитов, которые могут быть CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> или CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>.

МКПК также могут содержать другие цитотоксические лимфоциты, такие как НК-клетки или НКТ-клетки. Вектор экспрессии, несущий последовательность, кодирующую CAR, предложенный в настоящей заявке, может быть введен в

популяцию Т-клеток, NK-клеток или NKT-клеток донора-человека. Успешно трансдуцированные Т-клетки, которые несут вектор экспрессии, можно отсортировать с помощью проточной цитометрии для выделения CD3-положительных Т-клеток, а затем дополнительно размножить для увеличения количества этих экспрессирующих белок CAR Т-клеток в дополнение к активации клеток с применением антител против CD3 и/или против CD28 и IL-2 или любых других способов, известных из уровня техники, описанных в других местах настоящего документа. Стандартные процедуры применяют для криоконсервации Т-клеток, экспрессирующих белок CAR, для хранения и/или подготовки для применения у субъекта-человека. В одном варианте реализации трансдукцию, культивирование и/или размножение Т-клеток *in vitro* проводят в отсутствие продуктов, происходящих из животного, отличного от человека, таких как фетальная телячья сыворотка и фетальная бычья сыворотка. Поскольку генетически модифицируют гетерогенную популяцию МКПК, полученные трансдуцированные клетки представляют собой гетерогенную популяцию модифицированных клеток, содержащих нацеленный на MUC16 CAR, предложенный в настоящей заявке.

В некоторых вариантах реализации смесь, например, одного, двух, трех, четырех, пяти или более, разных векторов экспрессии можно применять для генетической модификации донорской популяции иммунных эффекторных клеток, где каждый вектор кодирует отличный от других белок химерного антигенного рецептора, предложенного в настоящей заявке. Полученные модифицированные иммунные эффекторные клетки образуют смешанную популяцию модифицированных клеток, при этом часть модифицированных клеток экспрессирует более одного различного белка CAR.

#### **I. Способы изготовления клеток.**

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложены способы изготовления клеток, генетически сконструированных для экспрессии CAR против MUC16, описанного в настоящей заявке. Клетки, изготовленные способами, предложенными в настоящей заявке, позволяют получить улучшенные композиции для адоптивной иммунотерапии. Без привязки к какой-либо конкретной теории полагают, что композиции клеток, изготовленные способами, предложенными в настоящей заявке, наделены лучшими свойствами, в том числе повышенной выживаемостью

клеток, размножением при относительном отсутствие дифференцировки и персистенцией *in vivo*.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложены способы изготовления Т-клеток, генетически сконструированных для экспрессии CAR против MUC16, описанного в настоящей заявке. В некоторых вариантах реализации способ изготовления Т-клеток включает приведение клеток в контакт с одним или более средствами, которые модулируют клеточный сигнальный путь PI3K. В некоторых вариантах реализации способ изготовления Т-клеток включает приведение клеток в контакт с одним или более средствами, которые модулируют клеточный сигнальный путь PI3K/Akt/mTOR. В некоторых вариантах реализации Т-клетки могут быть получены из любого источника и приведены в контакт со средством во время фаз активации и/или размножения в процессе изготовления. Полученные композиции Т-клеток обогащены перспективными для разработки Т-клетками, которые обладают способностью пролиферировать и экспрессировать один или более из следующих биомаркеров: CD62L, CCR7, CD28, CD27, CD122, CD127, CD197 и CD38. В некоторых вариантах реализации популяции клеток, содержащих Т-клетки, которые были обработаны одним или более ингибиторами PI3K, обогащены популяцией CD8+ Т-клеток, совместно экспрессирующих один или более или все из следующих биомаркеров: CD62L, CD127, CD197 и CD38.

В некоторых вариантах реализации изготавливают модифицированные Т-клетки, у которых сохраняются уровни пролиферации и снижена дифференцировка. В некоторых вариантах реализации Т-клетки изготавливают путем стимуляции Т-клеток для их активации и пролиферации в присутствии одного или более стимулирующих сигналов и средства, которое является ингибитором клеточного сигнального пути PI3K.

Для достижения достаточных терапевтических доз композиций на основе Т-клеток, Т-клетки часто подвергают одному или более раундам стимуляции, активации и/или размножения. Т-клетки могут быть активированы и размножены, как правило, с помощью способов, описанных, например, в патентах США №№ 6352694, 6534055, 6905680, 6692964, 5858358, 6887466, 6905681, 7144575, 7067318, 7172869; 7232566, 7175843, 5883223, 6905874, 6797514 и 6867041, каждый из которых в полном объеме включен в настоящую заявку посредством ссылки.

Т-клетки затем можно модифицировать для экспрессии CAR против MUC16. В некоторых вариантах реализации Т-клетки модифицируют путем трансдукции Т-клеток вирусным вектором, содержащим CAR против MUC16, предложенный в настоящей заявке. В некоторых вариантах реализации Т-клетки модифицируют перед стимуляцией и активацией в присутствии ингибитора клеточного сигнального пути PI3K. В некоторых вариантах реализации Т-клетки модифицируют после стимуляции и активации в присутствии ингибитора клеточного сигнального пути PI3K. В некоторых вариантах реализации Т-клетки модифицируют в течение 12 часов, 24 часов, 36 часов или 48 часов после стимуляции и активации в присутствии ингибитора клеточного сигнального пути PI3K.

После активации Т-клеток, указанные клетки культивируют для пролиферации. Т-клетки можно культивировать в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней, по меньшей мере 2 недель, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или 6 месяцев или более с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или более раундами размножения.

В некоторых вариантах реализации композиции на основе Т-клеток изготавливают в присутствии одного или более ингибиторов пути PI3K. Ингибиторы могут нацеливаться на одну или более активностей в указанном пути или на единственную активность. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией предполагают, что обработка или приведение Т-клеток в контакт с одним или более ингибиторами пути PI3K во время фаз стимуляции, активации и/или размножения в процессе изготовления преимущественно увеличивает количество молодых Т-клеток, тем самым позволяя получить лучшие терапевтические композиции на основе Т-клеток.

В некоторых вариантах реализации предложен способ повышения пролиферации Т-клеток, экспрессирующих сконструированный Т-клеточный рецептор. Такие способы могут включать, например, сбор источника Т-клеток от субъекта, стимуляцию и активацию Т-клеток в присутствии одного или более ингибиторов пути PI3K, модификацию Т-клеток для экспрессии CAR против MUC16 и размножение Т-клеток в культуре.

В некоторых вариантах реализации генетически модифицированные Т-клетки размножают путем контакта со средством, которое стимулирует сигнал,

ассоциированный с комплексом CD3 TCR, и лигандом, который стимулирует костимулирующую молекулу на поверхности Т-клеток.

В некоторых вариантах реализации МКПК или выделенные Т-клетки приводят в контакт со стимулирующим средством и костимулирующим средством, таким как растворимые антитела против CD3 и против CD28 или антитела, присоединенные к грануле или другой поверхности, в культуральной среде с подходящими цитокинами, такими как IL-2, IL-7 и/или IL-15.

В некоторых вариантах реализации МКПК или выделенные Т-клетки приводят в контакт со стимулирующим средством и костимулирующим средством, таким как растворимые антитела против CD3 и против CD28 или антитела, присоединенные к грануле или другой поверхности, в культуральной среде с подходящими цитокинами, такими как IL-2, IL-7 и/или IL-15 и/или ингибитор PI3K.

В некоторых вариантах реализации предложен способ получения популяций Т-клеток, обогащенных экспрессией одного или более из следующих биомаркеров: CD62L, CCR7, CD28, CD27, CD122, CD127, CD197 и CD38. В некоторых вариантах реализации молодые Т-клетки содержат один или более или все из следующих биологических маркеров: CD62L, CD127, CD197 и CD38. В одном варианте реализации предложены молодые Т-клетки, в которых отсутствует экспрессия CD57, CD244, CD160, PD-1, CTLA4, TIM3 и LAG3.

В некоторых вариантах реализации мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) применяют в качестве источника Т-клеток в способах получения Т-клеток, предложенных в настоящей заявке. МКПК образуют гетерогенную популяцию Т-лимфоцитов, которые могут представлять собой CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> или CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>, и могут включать другие мононуклеарные клетки, такие как моноциты, В-клетки, НК-клетки и НКТ-клетки. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид, кодирующий сконструированный TCR или CAR, предложенные в настоящей заявке, можно вводить в популяцию Т-клеток, НК-клеток или НКТ-клеток донора-человека. Успешно трансдуцированные Т-клетки, которые несут вектор экспрессии, можно отсортировать с помощью проточной цитометрии для выделения CD3-положительных Т-клеток, а затем дополнительно размножить для увеличения количества модифицированных Т-клеток в дополнение к активации клеток с использованием антител против CD3 и/или

антител против CD28 и IL-2, IL-7 и/или IL-15 или любых других способов, известных из уровня техники, описанных в других местах настоящей заявки.

Используемый в данном документе термин «ингибитор Р1ЗК» относится к нуклеиновой кислоте, пептиду, соединению или малой органической молекуле, которая связывается с Р1ЗК и ингибирует по меньшей мере одну активность Р1ЗК. Белки Р1ЗК можно разделить на три класса: Р1ЗК класса 1, Р1ЗК класса 2 и Р1ЗК класса 3. Р1ЗК класса 1 существуют в виде гетеродимеров, состоящих из одной из четырех каталитических субъединиц p110 (p110 $\alpha$ , p110 $\beta$ , p110 $\delta$  и p110 $\gamma$ ) и одного из двух семейств регуляторных субъединиц. Ингибитор Р1ЗК предпочтительно нацеливается на ингибиторы Р1ЗК класса 1. В одном варианте реализации ингибитор Р1ЗК будет демонстрировать селективность в отношении одной или более изоформ ингибиторов Р1ЗК класса 1 (т. е. селективность в отношении p110 $\alpha$ , p110 $\beta$ , p110 $\delta$  и p110 $\gamma$  или одного или более из p110 $\alpha$ , p110 $\beta$ , p110 $\delta$  и p110 $\gamma$ ). В другом аспекте ингибитор Р1ЗК не будет демонстрировать селективность к изоформам и будет считаться «пан-ингибитором Р1ЗК». В одном варианте реализации ингибитор Р1ЗК будет конкурировать за связывание с АТФ с каталитическим доменом Р1ЗК.

В некоторых вариантах реализации ингибитор Р1ЗК может, например, нацеливаться на Р1ЗК, а также на дополнительные белки в пути Р1ЗК-АКТ-mTOR. В некоторых вариантах реализации ингибитор Р1ЗК, который нацеливается как на mTOR, так и на Р1ЗК, могут называть либо ингибитором mTOR, либо ингибитором Р1ЗК. Ингибитор Р1ЗК, который нацелен только на Р1ЗК, могут называть селективным ингибитором Р1ЗК. В некоторых вариантах реализации под селективным ингибитором Р1ЗК можно понимать средство, у которого выявляют 50% ингибирующую концентрацию в отношении Р1ЗК, которая по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 100 раз, по меньшей мере в 1000 раз или более ниже, чем IC50 указанного ингибитора в отношении mTOR и/или других белков в указанном пути.

В некоторых вариантах реализации типичные ингибиторы Р1ЗК ингибируют Р1ЗК с IC50 (концентрацией, которая ингибирует 50% активности), составляющей приблизительно 200 нМ или менее, предпочтительно приблизительно 100 нМ или менее, еще более предпочтительно приблизительно 60 нМ или менее, приблизительно 25 нМ, приблизительно 10 нМ, приблизительно 5 нМ, приблизительно 1 нМ, 100 мкМ,

50 мкМ, 25 мкМ, 10 мкМ, 1 мкМ или менее. В одном варианте реализации ингибитор PI3K ингибирует PI3K с IC<sub>50</sub> от приблизительно 2 нМ до приблизительно 100 нМ, более предпочтительно от приблизительно 2 нМ до приблизительно 50 нМ, еще более предпочтительно от приблизительно 2 нМ до приблизительно 15 нМ.

Типичные примеры ингибиторов PI3K, подходящих для применения в способах изготовления Т-клеток, предложенных в конкретных вариантах реализации, включают, но не ограничены перечисленными: ВКМ120 (ингибитор PI3K класса 1, Novartis), XL147 (ингибитор PI3K класса 1, Exelixis), (пан-ингибитор PI3K, GlaxoSmithKline) и PX-866 (ингибитор PI3K класса 1; изоформы p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  и p110 $\gamma$ , Oncothyreon).

Другие типичные примеры селективных ингибиторов PI3K включают, но не ограничены перечисленными: BYL719, GSK2636771, TGX-221, AS25242, CAL-101, ZSTK474 и IPI-145. Дополнительные типичные примеры пан-ингибиторов PI3K включают, но не ограничены перечисленными: BEZ235, LY294002, GSK1059615, TG100713 и GDC-0941. В некоторых вариантах реализации ингибитор PI3K представляет собой ZSTK474.

В некоторых вариантах реализации предложен способ повышения пролиферации Т-клеток, экспрессирующих сконструированный Т-клеточный рецептор. Такие способы могут включать, например, сбор источника Т-клеток от субъекта, стимуляцию и активацию Т-клеток, модификацию Т-клеток для экспрессии CAR и размножение Т-клеток в культуре, где Т-клетки изготавливают в присутствии одного или более ингибиторов PI3K на любом одном или более этапах процесса изготовления.

Способы изготовления, предложенные в настоящей заявке, могут дополнительно включать криоконсервацию модифицированных Т-клеток для хранения и/или подготовки к применению у субъекта-человека. Т-клетки криоконсервируют таким образом, что клетки остаются жизнеспособными после размораживания. При необходимости криоконсервированные трансформированные иммунные эффекторские клетки можно размораживать, выращивать и размножать для получения большего количества таких клеток. Используемый в данном документе термин «криоконсервация» относится к сохранению клеток путем охлаждения до температуры ниже нуля, такой как (обычно) 77 К или  $-196^{\circ}\text{C}$  (температура кипения жидкого азота). Криопротекторные средства часто применяют при температурах ниже нуля для

предотвращения повреждения клеток в результате замораживания при низких температурах или нагревания до комнатной температуры. Криоконсервирующие средства и оптимальные скорости охлаждения могут защищать от повреждения клеток. Криопротекторные средства, которые можно применять, включают, но не ограничены перечисленными: диметилсульфоксид (ДМСО) (Lovelock and Bishop, *Nature*, 1959; 183: 1394-1395; Ashwood-Smith, *Nature*, 1961; 190: 1204-1205), глицерин, поливинилпирролидон (Rinfret, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1960; 85: 576) и полиэтиленгликоль (Sloviter and Ravdin, *Nature*, 1962; 196: 48). Предпочтительная скорость охлаждения составляет от 1° до 3°C/минуту. По меньшей мере через два часа Т-клетки достигали температуры -80°C и могли быть помещены непосредственно в жидкий азот (-196°C) на постоянное хранение, например, в сосуд для длительного криогенного хранения.

#### **Ж. Композиции и составы.**

В некоторых вариантах реализации в соответствии с настоящим изобретением предложены композиции, содержащие один или более полипептидов, полинуклеотидов, векторов, содержащих их, генетически модифицированных иммунных эффекторных клеток и т. д., предложенных в настоящей заявке. Композиции включают, но не ограничены фармацевтическими композициями. «Фармацевтическая композиция» относится к композиции, представленной в фармацевтически приемлемых или физиологически приемлемых растворах для введения в клетку или в организм животного, либо отдельно, либо в комбинации с одним или более других видов терапии. Также понятно, что при необходимости композиции в соответствии с настоящим изобретением также можно вводить в комбинации с другими средствами, такими как, например, цитокины, факторы роста, гормоны, малые молекулы, химиотерапевтические средства, пролекарства, лекарственные средства, антитела или другие различные фармацевтически активные средства. Практически нет никаких ограничений по другим компонентам, которые также могут быть включены в композиции, при условии, что дополнительные средства не оказывают отрицательного влияния на способность композиции осуществлять предполагаемую терапию.

Фраза «фармацевтически приемлемый» используется в настоящем документе для обозначения тех соединений, материалов, композиций и/или лекарственных форм, которые, в рамках объективного медицинского суждения, подходят для применения в

контакте с тканями людей и животных, не вызывая при этом чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или другой проблемы или осложнения, соразмерно разумному соотношению польза/риск.

Используемый в данном документе термин «фармацевтически или физиологически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество» включает, но не ограничен перечисленными: любой адъювант, носитель, вспомогательное вещество, вещество, способствующее скольжению, подсластитель, разбавитель, консервант, краситель/красящее вещество, усилитель вкуса, поверхностно-активное вещество, смачивающее средство, диспергирующее средство, суспендирующее средство, стабилизатор, средство для обеспечения изотоничности, растворитель, поверхностно-активное вещество или эмульгатор, которые были одобрены Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США как приемлемые для применения у людей или домашних животных. Типичные фармацевтически приемлемые носители включают, но не ограничены перечисленными: сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлозу и ее производные, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, этилцеллюлоза и ацетилцеллюлоза; трагакант; солод; желатин; тальк; масло какао, воски, животные и растительные жиры, парафины, силиконы, бентониты, кремниевую кислоту, оксид цинка; масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; гликоли, такие как пропиленгликоль; полиолы, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; агар; буферные средства, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; альгиновую кислоту; апирогенную воду; изотонический раствор; раствор Рингера; этиловый спирт; фосфатные буферные растворы; и любые другие совместимые вещества, используемые в фармацевтических составах.

В некоторых вариантах реализации композиция содержит некоторое количество экспрессирующих CAR иммунных эффекторных клеток, предложенных в настоящей заявке. В контексте настоящего документа термин «количество» относится к «количеству, эффективному» или «эффективному количеству» генетически модифицированной терапевтической клетки, например, Т-клетки, для достижения

благоприятного или необходимого профилактического или терапевтического результата, включая клинические результаты.

«Профилактически эффективное количество» относится к количеству генетически модифицированной терапевтической клетки, эффективному для достижения необходимого профилактического результата. Как правило, но необязательно, поскольку профилактическую дозу применяют у субъектов до развития заболевания или на ранней стадии заболевания, профилактически эффективное количество меньше, чем терапевтически эффективное количество.

«Терапевтически эффективное количество» генетически модифицированной терапевтической клетки может варьировать в зависимости от таких факторов, как патологическое состояние, возраст, пол и масса индивида, а также способность стволовых клеток и клеток-предшественников вызывать желаемый ответ у индивида. Терапевтически эффективное количество также представляет собой количество, в котором терапевтически благоприятные эффекты превосходят любые токсические или вредные эффекты вируса или трансдуцированных терапевтических клеток. Термин «терапевтически эффективное количество» включает количество, которое является эффективным для «лечения» субъекта (например, пациента). При указании терапевтического количества точное количество композиций в соответствии с настоящим изобретением, подлежащих введению, может быть определено врачом с учетом индивидуальных различий в возрасте, массе, размере опухоли, степени инфицирования или метастазирования и состоянии пациента (субъекта).

Как правило, можно утверждать, что фармацевтическую композицию, содержащую Т-клетки, описанные в настоящем документе, можно вводить в дозировке от  $10^2$  до  $10^{10}$  клеток/кг массы тела, предпочтительно от  $10^5$  до  $10^6$  клеток/кг массы тела, включая все целые значения в этих диапазонах. Количество клеток будет зависеть от конечного применения, для которого предназначена композиция, а также типа клеток, включенных в нее. Для применений, предложенных в настоящей заявке, клетки обычно находятся в объеме, составляющем литр или менее, и который может составлять 500 мл или менее, даже 250 мл или 100 мл, или менее. Следовательно, плотность требуемых клеток, как правило, превышает  $10^6$  клеток/мл и, как правило, составляет более  $10^7$  клеток/мл, как правило,  $10^8$  клеток/мл или более. Клинически значимое количество иммунных клеток может быть распределено на несколько инфузий, которые в

совокупности равны или превышают  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$  или  $10^{12}$  клеток. В некоторых аспектах настоящего изобретения, в частности, поскольку все введенные путем инфузии клетки будут перенацелены на конкретный целевой антиген (например, легкую цепь к или  $\lambda$ ), можно вводить меньшее количество клеток в диапазоне  $10^6$ /килограмм ( $10^6$  —  $10^{11}$  на пациента). Композиции с экспрессирующими CAR клетками могут быть введены несколько раз в дозировках, находящихся в этих диапазонах. Клетки могут быть аллогенными, сингенными, ксеногенными или аутологичными для пациента, получающего терапию. При необходимости лечение может также включать введение митогенов (например, РНА) или лимфокинов, цитокинов и/или хемокинов (например, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12, TNF-альфа, IL-18 и TNF-бета, GM-CSF, IL-4, IL-13, Flt3-L, RANTES, MIP1 $\alpha$  и т. д.), описанных в настоящей заявке, для усиления индукции иммунного ответа.

Как правило, композиции, содержащие клетки, активированные и размноженные, как описано в настоящей заявке, можно применять для лечения и предотвращения заболеваний, которые возникают у индивидов с ослабленным иммунитетом. В частности, композиции, содержащие CAR-модифицированные Т-клетки, предложенные в настоящей заявке, применяют для лечения видов рака, экспрессирующих MUC16. CAR-модифицированные Т-клетки в соответствии с настоящим изобретением можно вводить либо отдельно, либо в виде фармацевтической композиции в комбинации с носителями, разбавителями, вспомогательными веществами и/или с другими компонентами, такими как IL-2 или другие цитокины или популяции клеток. В некоторых вариантах реализации фармацевтические композиции, предложенные в настоящей заявке, содержат некоторое количество генетически модифицированных Т-клеток в комбинации с одним или более фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, разбавителями или вспомогательными веществами.

Фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением, содержащие популяцию экспрессирующих CAR иммунных эффекторных клеток, таких как Т-клетки, могут содержать буферы, такие как нейтральный забуференный солевой раствор, фосфатно-солевой буферный раствор и т. п.; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатирующие средства, такие как ЭДТА или

глутатион; адъюванты (например, гидроксид алюминия); и консерванты. В некоторых вариантах реализации композиции представлены в форме для парентерального введения, например, внутрисосудистого (внутривенного или внутриаириального), внутриврюшинного или внутримышечного введения.

Жидкие фармацевтические композиции, независимо от того, являются ли они растворами, суспензиями или другой подобной формой, могут содержать одно или более из следующего: стерильные разбавители, такие как вода для инъекций, солевой раствор, предпочтительно физиологический раствор, раствор Рингера, изотонический раствор хлорида натрия, нелетучие масла, такие как синтетические моно- или диглицериды, которые могут служить растворителем или суспендирующей средой, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие растворители; антибактериальные средства, такие как бензиловый спирт или метилпарабен; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие средства, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и средства для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Препарат для парентерального введения может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или многодозовые флаконы, изготовленные из стекла или пластика. Инъекционная фармацевтическая композиция предпочтительно является стерильной.

В некоторых вариантах реализации композиции Т-клеток, предложенные в настоящем описании, представлены в фармацевтически приемлемой среде для культивирования клеток. Такие композиции являются подходящими для введения людям. В некоторых вариантах реализации фармацевтически приемлемая среда для культивирования клеток представляет собой бессывороточную среду.

Бессывороточная среда имеет несколько преимуществ по сравнению со средой, содержащей сыворотку, среди которых упрощенный и более точно определенный состав, сниженная степень загрязнения, устранение потенциального источника инфекционных агентов и более низкая стоимость. В некоторых вариантах реализации бессывороточная среда не содержит компонентов животного происхождения и необязательно может не содержать белок. Необязательно среда может содержать биофармацевтически приемлемые рекомбинантные белки. Среда, «не содержащая компонентов животного происхождения», относится к среде, в которой компоненты

получены из источников, отличных от животных. Рекомбинантные белки заменяют нативные белки животных в среде, не содержащей компонентов животного происхождения, и питательные вещества получены из синтетических, растительных или микробиологических источников. Среда, «не содержащая белков», напротив, определена как по существу не содержащая белков.

Типичные примеры бессывороточных сред, применяемых в конкретных композициях, включают, но не ограничены перечисленными: QBSF-60 (Quality Biological, Inc.), StemPro-34 (Life Technologies) и X-VIVO 10.

В некоторых вариантах реализации композиции, содержащие иммунные эффекторныe клетки, предложенные в настоящем описании, представлены в растворе, содержащем PlasmaLyte A.

В некоторых вариантах реализации композиции, содержащие иммунные эффекторныe клетки, предложенные в настоящем описании, представлены в растворе, содержащем среду для криоконсервации. Например, среду для криоконсервации с криоконсервирующими средствами можно применять для поддержания высокого результата жизнеспособности клеток после размораживания. Типичные примеры сред для криоконсервации, применяемых в конкретных композициях, включают, но не ограничены перечисленными: CryoStor CS10, CryoStor CS5 и CryoStor CS2.

В некоторых вариантах реализации композиции, содержащие иммунные эффекторныe клетки, предложенные в настоящем описании, представлены в растворе, содержащем PlasmaLyte A и CryoStor CS10 в соотношении 50:50.

#### **К. Наборы.**

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложен набор, содержащий популяцию иммунных эффекторных клеток, экспрессирующих CAR против MUC16, или фармацевтическую композицию на их основе. В некоторых вариантах реализации набор содержит инструкции по введению популяции иммунных эффекторных клеток или фармацевтической композиции на их основе субъекту, нуждающемуся в этом. В некоторых вариантах реализации у субъекта, нуждающегося в этом, имеются раковые клетки, экспрессирующие MUC16.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложен набор, содержащий популяцию иммунных эффекторных клеток, экспрессирующих CAR против MUC16, или фармацевтическую композицию на их основе, и инструкции по введению клеток или композиции субъекту, нуждающемуся в этом, который получил или получал ингибитор иммунной контрольной точки. В некоторых вариантах реализации в соответствии с настоящим изобретением предложен набор, содержащий популяцию иммунных эффекторных клеток, экспрессирующих CAR против MUC16 или фармацевтическую композицию на их основе, и инструкции по введению клеток или композиции субъекту, нуждающемуся в этом, который получил или получал ниволумаб, пембролизумаб, атезолизумаб или цемиплимаб.

В некоторых вариантах реализации в соответствии с настоящим изобретением предложен набор, содержащий популяцию иммунных эффекторных клеток, экспрессирующих CAR против MUC16, или фармацевтический состав на их основе, и инструкции по введению клеток или композиции субъекту, нуждающемуся в этом, который получил или получал биспецифическое антитело, содержащее первый связывающий домен, специфический в отношении опухоль-ассоциированного антигена, и второй связывающий домен, специфический в отношении CD3. В некоторых вариантах реализации в соответствии с настоящим изобретением предложен набор, содержащий популяцию иммунных эффекторных клеток, экспрессирующих CAR против MUC16, или фармацевтический состав на их основе, и инструкции по введению клеток или композиции субъекту, нуждающемуся в этом, который получил или получал биспецифическое антитело, содержащее первый связывающий домен, специфический в отношении опухоль-ассоциированного антигена, и второй связывающий домен, специфический в отношении CD28.

#### **L. Терапевтические способы.**

Генетически модифицированные иммунные эффекторные клетки, экспрессирующие CAR, предложенный в настоящей заявке, обеспечивают улучшенные способы адоптивной иммунотерапии для применения для предотвращения, лечения и уменьшения выраженности раковых заболеваний, или для предотвращения, лечения или уменьшения выраженности по меньшей мере одного симптома, связанного с раком.

В некоторых вариантах реализации генетически модифицированные иммунные эффекторские клетки, предложенные в настоящей заявке, обеспечивают улучшенные способы адоптивной иммунотерапии для применения для повышения цитотоксичности в раковых клетках у субъекта или для применения для уменьшения количества раковых клеток у субъекта.

В некоторых вариантах реализации специфичность первичной иммунной эффекторской клетки перенацеливается на клетки, экспрессирующие конкретный антиген, например MUC16, путем генетической модификации первичной иммунной эффекторской клетки с помощью CAR против MUC16, как предложено в настоящей заявке. В некоторых вариантах реализации вирусный вектор применяют для генетической модификации иммунной эффекторской клетки с помощью конкретного полинуклеотида, кодирующего CAR против MUC16.

В некоторых вариантах реализации предложен тип клеточной терапии, при котором Т-клетки генетически модифицируют для экспрессии CAR против MUC16, нацеленного на экспрессирующие MUC16 раковые клетки, и указанные Т-клетки вводят путем инфузии реципиенту, нуждающемуся в этом. Клетка, введенная путем инфузии, способна уничтожать клетки, вызывающие заболевание, у реципиента. В отличие от видов антителотерапии, при видах Т-клеточной терапии Т-клетки способны реплицироваться *in vivo*, что приводит к длительной персистенции, которая может обеспечивать устойчивую противораковую терапию.

В некоторых вариантах реализации Т-клетки, которые экспрессируют CAR против MUC16, претерпевают сильную экспансию Т-клеток *in vivo* и могут сохраняться в течение длительного периода времени. В некоторых вариантах реализации Т-клетки, которые экспрессируют CAR против MUC16, развиваются в специфические Т-клетки памяти или стволовые Т-клетки памяти, которые могут быть реактивированы для ингибирования любого дополнительного образования или роста опухоли.

В конкретных вариантах реализации предложены типичные примеры состояний, которые можно лечить, предотвращать или снижать их выраженность с применением иммунных эффекторских клеток, которые экспрессируют CAR против MUC16. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложены способы лечения рака, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, иммунных

эффекторных клеток, экспрессирующих CAR против MUC16, или композиции, содержащей их. В некоторых вариантах реализации рак выбран из рака яичника, рака эндометрия, рака шейки матки, рака фаллопиевой трубы, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, мезотелиомы, внутривенной холангиокарциномы массивного типа, аденокарциномы шейки матки и аденокарциномы желудочного тракта.

В некоторых вариантах реализации предложены способы, включающие введение терапевтически эффективного количества иммунных эффекторных клеток, которые экспрессируют CAR против MUC16, или композиции, содержащей их, пациенту, нуждающемуся в этом, отдельно или в комбинации с одним или более терапевтическими средствами. В некоторых вариантах реализации клетки применяют при лечении пациентов с риском развития состояния, ассоциированного с раковыми клетками. Таким образом, в конкретных вариантах реализации предложены способы лечения, или предотвращения, или снижения выраженности по меньшей мере одного симптома рака, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества модифицированных Т-клеток, которые экспрессируют CAR против MUC16.

В контексте настоящего документа термины «индивид» и «субъект» часто используются взаимозаменяемо и относятся к любому животному, у которого проявляется симптом заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению векторами для генной терапии, методами клеточной терапии и способами, предложенными в других местах настоящей заявки. В некоторых вариантах реализации субъект включает любое животное, у которого проявляются симптомы заболевания, нарушения или состояния, связанного с раком, которое можно лечить векторами для генной терапии, методами клеточной терапии и способами, предложенными в других местах настоящей заявки. Подходящие субъекты (например, пациенты) включают лабораторных животных (таких как мышь, крыса, кролик или морская свинка), сельскохозяйственных животных и домашних животных или питомцев (таких как кошка или собака). В объем данного термина входят приматы, отличные от человека, и предпочтительно пациенты-люди. Типичные субъекты включают пациентов-людей, у которых имеется рак, у которых был диагностирован рак, или которые подвержены риску развития рака или имеют рак.

В контексте настоящего документа термин «пациент» относится к субъекту, у которого было диагностировано определенное заболевание, нарушение или состояние, подлежащее лечению векторами для генной терапии, методами клеточной терапии и способами, описанными в других местах настоящего документа.

В контексте настоящего документа термин «лечение» или «лечить» включает любой благоприятный или желательный эффект в отношении симптомов или патологии заболевания или патологического состояния и может включать даже минимальное уменьшение одного или более измеримых маркеров заболевания или состояния, лечение которого осуществляют. Лечение может предусматривать необязательно либо уменьшение заболевания или состояния, либо задержку прогрессирования заболевания или состояния. «Лечение» необязательно указывает на полное устранение или излечение заболевания или состояния или связанных с ними симптомов.

В контексте настоящего документа термин «предотвращать» и подобные термины, такие как «предотвращенный», «предотвращение» и т. д., указывают на подход для предотвращения, подавления или снижения вероятности возникновения или рецидива заболевания или состояния. Он также относится к задержке начала или рецидива заболевания или состояния или задержке возникновения или рецидива симптомов заболевания или состояния. В контексте настоящего документа «предотвращение» и подобные термины также включает уменьшение интенсивности, эффекта, симптомов и/или нагрузки заболевания или состояния до начала или рецидива заболевания или состояния.

В контексте настоящего документа фраза «снижение выраженности по меньшей мере одного симптома» относится к снижению одного или более симптомов заболевания или состояния, от которых лечат субъекта. В некоторых вариантах реализации заболевание или состояние, подлежащие лечению, представляют собой рак, при этом один или более симптомов, выраженность которых снижают, включают, но не ограничены перечисленными: слабость, утомляемость, одышку, легкое образование синяков и кровотечение, частые инфекции, увеличенные лимфатические узлы, вздутый или болезненный живот (из-за увеличенных органов брюшной полости), боль в костях или суставах, переломы, незапланированную потерю веса, плохой аппетит, ночную потливость, постоянную легкую лихорадку и пониженное мочеиспускание (из-за нарушения функции почек).

«Увеличение», или «способствование», или «повышение», или «расширение» в общем относится к способности композиции, предложенной в настоящем документе, например, генетически модифицированных Т-клеток, которые экспрессируют CAR против MUC16, производить, вызывать или обуславливать больший физиологический ответ (т. е. последующие эффекты) по сравнению с ответом, вызываемым либо средой-носителем, либо контрольной молекулой/композицией. Поддающийся измерению физиологический ответ может включать повышение размножения, активации, персистенции и/или повышение способности Т-клеток к уничтожению раковых клеток, среди прочего, очевидного из знаний в данной области техники и описания в настоящем документе. «Повышенное» или «увеличенное» количество, как правило, представляет собой «статистически значимое» количество и может включать повышение в 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 или более раз (например, 500, 1000 раз) (включая все целые числа и десятичные значения между указанными числами и более 1, например, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8 и т. д.) относительно ответа, полученного с помощью носителя или контрольной композиции.

«Снижение», или «понижение», или «уменьшение», или «сокращение», или «ослабление» в целом относится к способности композиции, предложенной в настоящем документе, производить, вызывать или обуславливать меньший физиологический ответ (т. е. последующие эффекты) по сравнению с ответом, вызываемым либо носителем, либо контрольной молекулой/композицией. «Сниженное» или «уменьшенное» количество, как правило, представляет собой «статистически значимое» количество и может включать снижение в 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 или более раз (например, 500, 1000 раз) (включая все целые числа и десятичные значения между указанными числами и более 1, например, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8 и т. д.) относительно ответа (референсного ответа), вызванного носителем, контрольной композицией, или ответа в определенной линии клеток.

«Поддерживать», или «сохранять», или «поддержание», или «отсутствие изменений», или «по существу отсутствие снижения» в целом относится к способности композиции, предложенной в настоящем документе, производить, вызывать или обуславливать схожий физиологический ответ (т. е. последующие эффекты) в клетке по сравнению с ответом, вызываемым средой-носителем, контрольной молекулой/композицией, либо

ответом в определенной линии клеток. Сравнимый ответ — это ответ, который не имеет существенного или измеримого отличия от референсного ответа.

В некоторых вариантах реализации способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта включает введение эффективного количества, например, терапевтически эффективного количества композиции, содержащей генетически модифицированные иммунные эффекторные клетки, предложенные в настоящем документе. Количество и частота введения будут определяться такими факторами, как состояние пациента, а также тип и степень тяжести заболевания пациента, хотя подходящие дозы могут быть определены в клинических исследованиях.

В некоторых вариантах реализации количество иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток, которые экспрессируют CAR против MUC16, в композиции, которую вводят субъекту, составляет по меньшей мере  $0,1 \times 10^5$  клеток, по меньшей мере  $0,5 \times 10^5$  клеток, по меньшей мере  $1 \times 10^5$  клеток, по меньшей мере  $5 \times 10^5$  клеток, по меньшей мере  $1 \times 10^6$  клеток, по меньшей мере  $0,5 \times 10^7$  клеток, по меньшей мере  $1 \times 10^7$  клеток, по меньшей мере  $0,5 \times 10^8$  клеток, по меньшей мере  $1 \times 10^8$  клеток, по меньшей мере  $0,5 \times 10^9$  клеток, по меньшей мере  $1 \times 10^9$  клеток, по меньшей мере  $2 \times 10^9$  клеток, по меньшей мере  $3 \times 10^9$  клеток, по меньшей мере  $4 \times 10^9$  клеток, по меньшей мере  $5 \times 10^9$  клеток или по меньшей мере  $1 \times 10^{10}$  клеток.

В некоторых вариантах реализации субъекту вводят от приблизительно  $1 \times 10^7$  Т-клеток до приблизительно  $1 \times 10^9$  Т-клеток, от приблизительно  $2 \times 10^7$  Т-клеток до приблизительно  $0,9 \times 10^9$  Т-клеток, от приблизительно  $3 \times 10^7$  Т-клеток до приблизительно  $0,8 \times 10^9$  Т-клеток, от приблизительно  $4 \times 10^7$  Т-клеток до приблизительно  $0,7 \times 10^9$  Т-клеток, от приблизительно  $5 \times 10^7$  Т-клеток до приблизительно  $0,6 \times 10^9$  Т-клеток или от приблизительно  $5 \times 10^7$  Т-клеток до приблизительно  $0,5 \times 10^9$  Т-клеток.

В некоторых вариантах реализации количество иммунных эффекторных клеток, например Т-клеток, которые экспрессируют CAR против MUC16, в композиции, которую вводят субъекту, составляет по меньшей мере  $0,1 \times 10^4$  клеток/кг массы тела, по меньшей мере  $0,5 \times 10^4$  клеток/кг массы тела, по меньшей мере  $1 \times 10^4$  клеток/кг массы тела, по меньшей мере  $5 \times 10^4$  клеток/кг массы тела, по меньшей мере  $1 \times 10^5$  клеток/кг массы тела, по меньшей мере  $0,5 \times 10^6$  клеток/кг массы тела, по меньшей

мере  $1 \times 10^6$  клеток/кг массы тела, по меньшей мере  $0,5 \times 10^7$  клеток/кг массы тела, по меньшей мере  $1 \times 10^7$  клеток/кг массы тела, по меньшей мере  $0,5 \times 10^8$  клеток/кг массы тела, по меньшей мере  $1 \times 10^8$  клеток/кг массы тела, по меньшей мере  $2 \times 10^8$  клеток/кг массы тела, по меньшей мере  $3 \times 10^8$  клеток/кг массы тела, по меньшей мере  $4 \times 10^8$  клеток/кг массы тела, по меньшей мере  $5 \times 10^8$  клеток/кг массы тела или по меньшей мере  $1 \times 10^9$  клеток/кг массы тела.

В некоторых вариантах реализации субъекту вводят от приблизительно  $1 \times 10^6$  Т-клеток/кг массы тела до приблизительно  $1 \times 10^8$  Т-клеток/кг массы тела, от приблизительно  $2 \times 10^6$  Т-клеток/кг массы тела до приблизительно  $0,9 \times 10^8$  Т-клеток/кг массы тела, от приблизительно  $3 \times 10^6$  Т-клеток/кг массы тела до приблизительно  $0,8 \times 10^8$  Т-клеток/кг массы тела, от приблизительно  $4 \times 10^6$  Т-клеток/кг массы тела до приблизительно  $0,7 \times 10^8$  Т-клеток/кг массы тела, от приблизительно  $5 \times 10^6$  Т-клеток/кг массы тела до приблизительно  $0,6 \times 10^8$  Т-клеток/кг массы тела или от приблизительно  $5 \times 10^6$  Т-клеток/кг массы тела до приблизительно  $0,5 \times 10^8$  Т-клеток/кг массы тела.

Специалисту в данной области техники будет ясно, что для осуществления требуемой терапии может потребоваться несколько введений композиций, предложенных в настоящей заявке. Например, композиция может быть введена 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или более раз в течение 1 недели, 2 недель, 3 недель, 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев, 6 месяцев, 1 года, 2 лет, 5 лет, 10 лет или более.

В некоторых вариантах реализации может быть желательным введение субъекту активированных иммунных эффекторных клеток, а затем повторное взятие крови (или выполнение афереза), активация полученных из нее иммунных эффекторных клеток и повторная инфузия пациенту этих активированных и размноженных иммунных эффекторных клеток. Этот процесс может проводиться несколько раз каждые несколько недель. В некоторых вариантах реализации иммунные эффекторные клетки могут быть активированы из образцов крови объемом от 10 куб. см до 400 куб. см. В некоторых вариантах реализации иммунные эффекторные клетки активируют из образцов крови объемом 20 куб. см, 30 куб. см, 40 куб. см, 50 куб. см, 60 куб. см, 70 куб. см, 80 куб. см, 90 куб. см, 100 куб. см, 150 куб. см, 200 куб. см, 250 куб. см, 300 куб. см, 350 куб. см или 400 куб. см, или более. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, полагают, что этот протокол многократного взятия

крови/многократной повторной инфузии можно использовать для удаления некоторых популяций иммунных эффекторных клеток.

Введение композиций, предложенных в настоящей заявке, можно осуществить любым удобным способом, в том числе путем ингаляции аэрозоля, инъекции, проглатывания, переливания крови, имплантации или трансплантации. В некоторых вариантах реализации композиции вводят парентерально. Фразы «парентеральное введение» и «введение парентерально» в контексте настоящего документа относятся к способам введения, отличным от энтерального и местного введения, обычно путем инъекции, и включают, не ограничиваясь перечисленными, внутрисосудистую, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, интракапсулярную, интраорбитальную, внутриопухолевую, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную и внутригрудинную инъекцию и инфузию. В некоторых вариантах реализации композиции, предложенные в настоящем описании, вводят субъекту путем инъекции непосредственно в опухоль, лимфатический узел или очаг инфекции.

В некоторых вариантах реализации нуждающемуся в этом субъекту вводят эффективное количество композиции для повышения клеточного иммунного ответа на экспрессирующие MUC16 клетки или опухоль у субъекта. Иммунный ответ может включать клеточные иммунные ответы, опосредованные цитотоксическими Т-клетками, способными уничтожать инфицированные клетки, ответы регуляторных Т-клеток и хелперных Т-клеток. Также могут быть индуцированы гуморальные иммунные ответы, опосредованные преимущественно хелперными Т-клетками, способными активировать В-клетки, что приводит к продуцированию антител. Для анализа типа иммунных ответов, индуцированных композициями, может быть использован ряд методик, которые хорошо описаны в данной области техники, например, *Current Protocols in Immunology*, Edited by: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober (2001) John Wiley & Sons, NY, N.Y.

В некоторых вариантах реализации предложен способ лечения субъекта, у которого диагностирован рак, включающий взятие иммунных эффекторных клеток у субъекта, генетическую модификацию указанных иммунных эффекторных клеток вектором,

содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR против MUC16, с получением таким образом популяции модифицированных иммунных эффекторных клеток, и введение указанной популяции модифицированных иммунных эффекторных клеток тому же субъекту. В некоторых вариантах реализации иммунные эффекторные клетки включают Т-клетки.

В некоторых вариантах реализации предложены способы стимуляции опосредованного иммунными эффекторными клетками иммунного модуляторного ответа на популяции целевых клеток у субъекта, включающие этапы введения субъекту популяции иммунных эффекторных клеток, экспрессирующей конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR против MUC16.

Способы введения композиций клеток, предложенных в конкретных вариантах реализации, включают любой способ, который эффективен для повторного введения генетически модифицированных *ex vivo* иммунных эффекторных клеток, которые либо непосредственно экспрессируют CAR против MUC16 в организме субъекта, либо при повторном введении генетически модифицированных предшественников иммунных эффекторных клеток субъекту они дифференцируются в зрелые иммунные эффекторные клетки, которые экспрессируют CAR. Один способ включает трансдукцию Т-клеток периферической крови *ex vivo* конструкцией нуклеиновой кислоты, предложенной в настоящем документе, и возвращение трансдуцированных клеток субъекту.

### ***1. Комбинированное лечение.***

В некоторых вариантах реализации композиции, предложенные в настоящей заявке, содержат эффективное количество экспрессирующих CAR иммунных эффекторных клеток в комбинации, например, с одним или более терапевтическими средствами (комбинированная терапия). В объем используемого в данном документе термина «комбинированная терапия» входит последовательное введение каждого средства или видов терапии согласно схеме, которая будет обеспечивать благоприятные эффекты комбинации, и совместное введение этих средств или видов терапии по существу одновременно, например, в одной капсуле, содержащей фиксированное соотношение этих активных средств, или в нескольких отдельных капсулах для каждого средства. Комбинированная терапия также включает комбинации, в которых отдельные

элементы можно вводить в разные моменты времени и/или разными путями, но которые действуют в комбинации для обеспечения благоприятного эффекта посредством совместного действия или фармакокинетического и фармакодинамического эффекта каждого средства, или подходы к лечению опухоли путем комбинированной терапии.

Таким образом, экспрессирующие CAR композиции иммунных эффекторных клеток могут быть введены в комбинации с другими известными видами противоракового лечения, такими как лучевая терапия, химиотерапия, трансплантация, иммунотерапия, гормональная терапия, фотодинамическая терапия и т. д. Композиции также могут быть введены в комбинации с антибиотиками. Такие терапевтические средства могут быть приняты в данной области техники в качестве стандартного средства лечения конкретного патологического состояния, как описано в настоящем документе, такого как конкретный рак. Типичные предложенные терапевтические средства включают цитокины, факторы роста, стероиды, НПВП (нестероидные противовоспалительные препараты), БМАРП (болезнь-модифицирующие антиревматические препараты), противовоспалительные средства, химиотерапевтические средства, радиотерапевтические средства, терапевтические антитела, онколитические вирусы или другие активные и вспомогательные средства.

В некоторых вариантах реализации композиции, содержащие экспрессирующие CAR иммунные эффекторные клетки, описанные в настоящем документе, можно вводить в сочетании с любым количеством химиотерапевтических средств. Типичные примеры химиотерапевтических средств включают алкилирующие средства, такие как тиотепа и циклофосфамид (Цитоксан, CYTOXAN™); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метилмеламины, включая альтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентифосфорамид и триметилломеламин резьюм; азотистый иприт, такой как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, гидрохлорид оксида мехлорэтамина, мелфалан, новэмбихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урамустин; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорзотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин; антибиотики, такие как аклациномицины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, калихеамицин, карабицин, карминомицин, карзинофилин,

хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин, эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиروмицин, пурамицин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; аналоги пуринов, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, энцитабин, флоксуридин, 5-FU; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпителиостанол, мепителиостан, тестолактон; средства, угнетающие функции надпочечников, такие как аминоклутетимид, митотан, трилостан; средство восполнения фолиевой кислоты, такое как фолиевая кислота; ацеглатон; гликозид альдофосфамида; аминоклевулиновую кислоту; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; элформитин; ацетат эллиптиния; этоглюцид; нитрат галлия; гидроксимочевину; лентинан; лонидамин; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; подофиллиновую кислоту; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK®; разоксан; сизофиран; спирогерманий; теназоновую кислоту; триазиквон; 2,2',2''-трихлортриэтиламин; уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронит; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид («Ara-C»); циклофосфамид; тиотепа; таксоиды, например паклитаксел (Таксол®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Принстон, Нью-Джерси) и доксетаксел (Таксотер®, Rhne-Poulenc Roger, Антони, Франция); хлорамбуцил; гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; платину; этопозид (VP-16); ифосфамид; митомицин С; митоксантрон; винкристин; винорелбин; навельбин; новантрон; тенипозид; дауномицин; аминоптерин; кселода; ибандронат; СРТ-11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифформетиломитин (DMFO); производные ретиноевой кислоты, такие как Таргретин™ (бексаротен), Панретин™ (алитретиноин); Онтак™ (дифтитокс денилейкина); эсперамицины; капецитабин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из указанных выше веществ. Также в объем данного определения входят антигормональные средства, которые действуют для регуляции или ингибирования действия гормона на виды рака, такие как антиэстрогены, в том числе, например, тамоксифен, ралоксифен, ингибирующие ароматазу 4(5)-имидазолы,

4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и торемифен (Фарестон); и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гозерелин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из указанных выше веществ.

Ряд других терапевтических средств можно применять в сочетании с композициями, описанными в данном документе. В некоторых вариантах реализации композицию, содержащую экспрессирующие CAR иммунные эффекторные клетки, вводят с противовоспалительным средством. Противовоспалительные средства или лекарственные средства включают, но не ограничены перечисленными: стероиды и глюкокортикоиды (включая бетаметазон, будесонид, дексаметазон, ацетат гидрокортизона, гидрокортизон, метилпреднизолон, преднизолон, преднизон, триамцинолон), нестероидные противовоспалительные лекарственные средства (НПВП), включая аспирин, ибупрофен, напроксен, метотрексат, сульфасалазин, лефлуномид, лекарственные средства против TNF, циклофосфамид и микофенолат.

Другие типичные НПВП выбраны из группы, состоящей из ибупрофена, напроксена, напроксена натрия, ингибиторов Cox-2, таких как Виокс (VIOXX®, рофекоксиб) и Целебрекс® (целекоксиб), и салилатов. Типичные анальгетики выбраны из группы, состоящей из ацетаминофена, оксикодона, трамадола гидрохлорида пропороксифена. Типичные глюкокортикоиды выбраны из группы, состоящей из кортизона, дексаметазона, гидрокортизона, метилпреднизолона, преднизолона или преднизона. Типичные модификаторы биологического ответа включают молекулы, направленные против маркеров поверхности клетки (например, CD4, CD5 и т. д.), ингибиторы цитокинов, такие как антагонисты TNF (например, этанерцепт (Энбрел®), адалимумаб (Хумира®) и инфликсимаб (Ремикейд®), ингибиторы хемокинов и ингибиторы молекул адгезии. Модификаторы биологического ответа включают моноклональные антитела, а также рекомбинантные формы молекул. Типичные БМАРП включают азатиоприн, циклофосфамид, циклоспорин, метотрексат, пеницилламин, лефлуномид, сульфасалазин, гидроксихлорохин, золото (перорально (ауранофин) и внутримышечно) и миноциклин.

Типичные примеры терапевтических антител, подходящих для комбинирования с CAR-модифицированными Т-клетками, предложенными в настоящей заявке, включают, но не ограничены перечисленными: бавитуксимаб, бевацизумаб (авастин), биватузумаб,

блинатумомаб, конатумумаб, даратумумаб, дулиготумаб, дацетузумаб, далотузумаб, элотузумаб (HuLuc63), гемтузумаб, ибритумомаб, индатуксимаб, инотузумаб, лорвотузумаб, лукатумумаб, милатузумаб, моксетумомаб, окаратузумаб, офатумумаб, ритуксимаб, силтуксимаб, тепротумумаб и ублитуксимаб.

В некоторых вариантах реализации композиции, описанные в настоящей заявке, вводят в сочетании с цитокином. Под термином «цитокин», используемым в настоящем документе, подразумевают общий термин для белков, высвобождаемых одной популяцией клеток, которые действуют на другую клетку как межклеточные медиаторы. Примерами таких цитокинов являются лимфокины, монокины и обычные полипептидные гормоны. В объем термина «цитокин» входят гормоны роста, такие как гормон роста человека, N-метионил-гормон роста человека и гормон роста крупного рогатого скота; паратиреоидный гормон; тироксин; инсулин; проинсулин; релаксин; прорелаксин; гликопротеиновые гормоны, такие как фолликулостимулирующий гормон (FSH), тиреотропный гормон (TSH) и лютеинизирующий гормон (LH); фактор роста печени; фактор роста фибробластов; пролактин; плацентарный лактоген; фактор некроза опухоли альфа и бета; ингибирующее вещество Мюллера; пептид, ассоциированный с гонадотропином мыши; ингибин; активин; фактор роста эндотелия сосудов; интегрин; тромбопоэтин (TPO); факторы роста нервов, такие как NGF-бета; фактор роста тромбоцитов; трансформирующие факторы роста (TGF), такие как TGF-альфа и TGF-бета; инсулин-подобный фактор роста I и -II; эритропоэтин (EPO); остеоиндуктивные факторы; интерфероны, такие как интерферон-альфа, бета и -гамма; колониестимулирующие факторы (CSF), такие как макрофагальный CSF (M-CSF); гранулоцитарно-макрофагальный CSF (GM-CSF); и гранулоцитарный CSF (G-CSF); интерлейкины (IL), такие как IL-1, IL-1 альфа, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-15, IL-21, фактор некроза опухоли, такой как TNF-альфа или TNF-бета; и другие полипептидные факторы, включая LIF и лиганд kit (KL). В одном варианте реализации термин цитокин включает «маскированные» цитокины, в том числе, но не ограничиваясь перечисленным: маскированный IL-2. Используемый в данном документе термин «цитокин» включает белки из природных источников или из культуры рекомбинантных клеток и биологически активные эквиваленты цитокинов с нативной последовательностью.

В некоторых вариантах реализации композиции, описанные в настоящей заявке, вводят в комбинации с ингибитором иммунной контрольной точки.

Используемый в данном документе термин «иммунная контрольная точка» относится к костимулирующим и ингибирующим сигналам, которые регулируют амплитуду и качество распознавания антигена Т-клеточным рецептором. В некоторых вариантах реализации иммунная контрольная точка представляет собой ингибирующий сигнал. В некоторых вариантах реализации ингибирующий сигнал представляет собой взаимодействие между PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах реализации ингибирующий сигнал представляет собой взаимодействие между CTLA-4 и CD80 или CD86 для вытеснения связывания CD28. В некоторых вариантах реализации ингибирующий сигнал представляет собой взаимодействие между молекулами LAG3 и МНС II класса. В некоторых вариантах реализации ингибирующий сигнал представляет собой взаимодействие между TIM3 и галектином 9. В некоторых вариантах реализации ингибирующий сигнал представляет собой взаимодействие между OX40 и OX40L.

Активация Т-клеток и эффекторные функции сбалансированы костимулирующими и ингибирующими сигналами, называемыми «контрольными точками иммунного ответа». Ингибирующие лиганды и рецепторы, которые регулируют эффекторные функции Т-клеток, экспрессируются на повышенном уровне на опухолевых клетках. Затем агонисты костимулирующих рецепторов или антагонисты ингибирующих сигналов приводят к амплификации антиген-специфических Т-клеточных ответов. В отличие от терапевтических антител, которые непосредственно нацеливаются на опухолевые клетки, ингибитор иммунной контрольной точки усиливает эндогенную противоопухолевую активность. В некоторых вариантах реализации ингибиторы иммунных контрольных точек, подходящие для применения в способах, описанных в данном документе, представляют собой антагонист ингибирующих сигналов, например, антитело, которое нацеливается, например, на PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3, B7-H3, B7-H4 или TIM3. Обзор этих лигандов и рецепторов приведен в Pardoll, D., Nature. 12: 252-264, 2012. В некоторых вариантах реализации ингибитор иммунной контрольной точки нацеливается на молекулу, выбранную из группы, состоящей из PD-1, PD-L1, PD-L2, CLTA4, GITR, ICOS, ICOSL, B7H3, B7H4, TIM3, LAG3, OX40, CD27, CD70, CD47 и CD137.

Используемый в данном документе термин «ингибитор иммунной контрольной точки» относится к молекуле, которая полностью или частично снижает, ингибирует, препятствует или модулирует один или более белков контрольной точки. В некоторых вариантах реализации ингибитор иммунной контрольной точки предотвращает ингибирующие сигналы, связанные с иммунной контрольной точкой. В некоторых вариантах реализации ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой антитело или его фрагмент, которые нарушают ингибирующую передачу сигнала, связанную с иммунной контрольной точкой. В некоторых вариантах реализации ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой малую молекулу, которая нарушает ингибирующую передачу сигнала. В некоторых вариантах реализации ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой антитело, его фрагмент или имитатор антитела, которые предотвращают взаимодействие между белками-блокаторами контрольных точек, например, антитело или его фрагмент, которые предотвращают взаимодействие между PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах реализации ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой антитело или его фрагмент, которые предотвращают взаимодействие между CTLA-4 и CD80 или CD86. В некоторых вариантах реализации ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой антитело или его фрагмент, которые предотвращают взаимодействие между LAG3 и его лигандами или TIM-3 и его лигандами. В некоторых вариантах реализации ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой антитело или его фрагмент, которые предотвращают взаимодействие между OX40 и его лигандами. Блокатор контрольных точек может также находиться в виде растворимой формы самих молекул (или их вариантов), например, слитого растворимого белка PD-L1 или PD-L1.

В настоящей заявке описаны способы лечения субъекта, пораженного такими заболеваниями, как рак, при этом указанные способы включают введение субъекту популяции иммунных эффекторных клеток, генетически модифицированных для экспрессии CAR против MUC16 и ингибитора иммунной контрольной точки. В некоторых вариантах реализации ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой антитело или его антигенсвязывающую часть, которые нарушают или ингибируют передачу сигнала от ингибиторного иммунорегулятора. В некоторых вариантах реализации ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой

малую молекулу, которая нарушает или ингибирует передачу сигнала от ингибиторного иммунорегулятора.

В некоторых вариантах реализации ингибиторный иммунорегулятор (ингибитор иммунной контрольной точки) представляет собой компонент сигнального пути PD-1/PD-L1. Соответственно, в некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложены способы иммунотерапии субъекта, пораженного раком, при этом указанные способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающей части, которые нарушают взаимодействие между рецептором PD-1 и его лигандом PD-L1. Антитела, известные из уровня техники, которые связываются с PD-1 и нарушают взаимодействие между PD-1 и его лигандом PD-L1 и стимулируют противоопухолевый иммунный ответ, подходят для применения в способах, описанных в настоящей заявке. В некоторых вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающая часть специфически связываются с PD-1. Например, антитела, которые нацелены на PD-1, включают, например, ниволумаб (BMS-936558, Bristol-Myers Squibb), пембролизумаб (ламбролизумаб, MK03475, Merck) и цемиплимаб (REGN-2810, Regeneron). Другие антитела, подходящие для применения в способах, описанных в настоящем документе, представляют собой антитела против PD-1, описанные в патенте США № 8008449, включенном в настоящую заявку посредством ссылки. В некоторых вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающая часть специфически связываются с PD-L1 и ингибируют его взаимодействие с PD-1, тем самым повышая иммунную активность. Антитела, известные из уровня техники, которые связываются с PD-L1 и нарушают взаимодействие между PD-1 и PD-L1 и стимулируют противоопухолевый иммунный ответ, подходят для применения в способах, описанных в настоящей заявке. Например, антитела, которые нацеливаются на PD-L1, BMS-936559 (Bristol-Myers Squibb) и MPDL3280A (Genetech). Другие подходящие антитела, которые нацеливаются на PD-L1, описаны в патенте США № 7943743. Специалисту в данной области техники будет понятно, что любое антитело, которое связывается с PD-1 или PD-L1, нарушает взаимодействие PD-1/PD-L1 и стимулирует противоопухолевый иммунный ответ, подходит для применения в способах, описанных в настоящей заявке.

Следует понимать, что антитела, нацеленные на иммунные контрольные точки, подходящие для применения в способах, описанных в настоящей заявке, не ограничены

описанными выше антителами. Более того, специалисту в данной области техники будет понятно, что антагонисты или антитела также могут нацеливаться на другие мишени иммунных контрольных точек в способах, описанных в настоящей заявке, при условии, что нацеливание приводит к стимуляции противоопухолевого иммунного ответа, что отражается, например, в повышении пролиферации Т-клеток, усилении активации Т-клеток и/или повышении продукции цитокинов (например, IFN-g, IL-2).

В некоторых вариантах реализации композиции, описанные в настоящей заявке, вводят в комбинации с биспецифическим антителом, специфическим к опухоль-ассоциированному антигену (ТАА), и стимулирующей молекулой. В некоторых вариантах реализации биспецифическое антитело специфично к ТАА и CD3. В некоторых вариантах реализации биспецифическое антитело специфично к ТАА и CD28.

Используемые в настоящей заявке термины «опухоль-ассоциированный антиген» и «ТАА» относятся к опухолеспецифическим антигенам (т. е. антигенам, обнаруживаемым только на раковых клетках) и антигенам, экспрессируемым на повышенном уровне на раковых или опухолевых клетках по сравнению со здоровыми клетками. Неограничивающие примеры опухоль-ассоциированного антигена включают AFP, ALK, белки BAGE,  $\beta$ -катенин, bcr-abl, BRCA1, BORIS, CA9, карбоангидразу IX, каспазу-8, CCR5, CD40, CDK4, CEA, CTLA4, циклин-B1, CYP1B1, ErbB3, ErbB4, ETV6-AML, Fra-1, FOLR1, белки GAGE (например, GAGE-1, -2), GD2, GloboH, глипикан-3, GM3, gp100, Her2, HLA/B-raf, HLA/k-ras, HLA/MAGE-A3, hTERT, LMP2, MART-1, ML-IAP, Muc1, Muc2, Muc3, Muc4, Muc5, Muc16, MUM1, NA17, NY-BR1, NY-BR62, NY-BR85, OX40, p15, p53, PAP, PAX3, PAX5, PCTA-1, PRLR, белки RAGE, Ras, RGS5, Rho, SART-1, SART-3, Steap-1, Steap-2, сурвивин, TGF- $\beta$ , TMPRSS2, Tn, TRP-1, TRP-2, тирозиназу, уроплакин-3, рецептор фолиевой кислоты альфа (FR $\alpha$ ), интегрин  $\alpha\beta$ 6, антиген созревания В-клеток (BCMA), B7-H3 (CD276), B7-H6, карбоангидразу IX (CAIX), CCR1, CD16, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD37, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD133, CD135 (также известный как fms-подобная тирозинкиназа 3; FLT3), CD138, CD171, карциноэмбриональный антиген (CEA), клаудин-6 (CLDN6), подобную лектину С-типа молекулу 1 (CLL-1), белок подгруппы 1 CD2 (CS-1), хондроитинсульфат-протеогликан 4 (CSPG4), антиген 1, ассоциированный с Т-клеточной лимфомой кожи (CTAGE1), рецептор эпидермального

фактора роста (EGFR), вариант III рецептора эпидермального фактора роста (EGFRvIII), эпителиальный гликопротеин 2 (EGP2), эпителиальный гликопротеин 40 (EGP40), молекулу адгезии эпителиальных клеток (EPCAM), рецептор 2 эфрина типа А (EPHA2), белок активации фибробластов (FAP), белок 5, подобный Fc-рецептору (FCRL5), фетальный рецептор ацетилхолинэстеразы (AchR), ганглиозид G2 (GD2), ганглиозид G3 (GD3), глипикан-3 (GPC3), семейство EGFR, включая ErbB2 (HER2), IL-11R $\alpha$ , IL-13R $\alpha$ 2, каппа, раково-тестикулярный антиген 2 (LAGE-1A), лямбда, Льюис-Y (LeY), молекулу клеточной адгезии L1 (L1-CAM), представителя 2 подсемейства В иммуноглобулин-подобного рецептора лейкоцитов (LILRB2); ген антигена меланомы (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGEA10, антиген меланомы 1, распознаваемый Т-клетками (MelanA или MART1), мезотелин (MSLN), молекулу адгезии нервных клеток (NCAM), раково-тестикулярный антиген 1 (NY-ESO-1), полисиаловую кислоту; специфический для плаценты белок 1 (PLAC1), преимущественно экспрессируемый меланомой антиген (PRAME), антиген стволовых клеток предстательной железы (PSCA), простатспецифический мембранный антиген (PSMA), орфанный рецептор 1, подобный рецепторной тирозинкиназе (ROR1), белок точки разрыва-2 хромосомы X при синовиальной саркоме (SSX2), ассоциированный с опухолью гликопротеин 72 (TAG72), белок 3, содержащий Т-клеточный иммуноглобулиновый домен и домен муцина (TIM-3), эндотелиальный маркер опухоли 1 (TEM1/CD248), родственный эндотелиальному маркеру опухоли белка 7 (TEM7R), трофобластический гликопротеин (TPBG), лиганды NKG2D, рецептор фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGFR2) и белок 1 опухоли Вильмса (WT-1).

Все публикации, патентные заявки и выданные патенты, цитируемые в данном описании, включены в настоящий документ посредством ссылки, как если бы каждая отдельная публикация, патентная заявка или выданный патент были специально и индивидуально указаны как включенные посредством ссылки.

Несмотря на то, что упомянутое выше изобретение было описано с приведением некоторых подробностей в качестве иллюстрации и примера для ясности понимания, специалисту в данной области техники будет очевидно в свете информации, представленной в настоящем документе, что в них могут внесены некоторые изменения и модификации без отступления от сущности или объема прилагаемой формулы изобретения. Следующие примеры приведены только в целях иллюстрации и не имеют

ограничительного характера. Специалистам в данной области техники будет ясен ряд некритических параметров, которые можно изменять или модифицировать для получения по существу аналогичных результатов.

## ПРИМЕРЫ

### ПРИМЕР 1

ПЕРВОНАЧАЛЬНАЯ КОНСТРУКЦИЯ ХИМЕРНЫХ АНТИГЕННЫХ РЕЦЕПТОРОВ (CAR) ПРОТИВ MUC16.

Получали химерные антигенные рецепторы (CAR), нацеленные на MUC16, содержащие связывающие молекулы scFv, нацеленные на фрагмент MUC16, оставшийся на поверхности клетки после протеолитического расщепления (см. фрагмент MUC16 в SEQ ID NO: 39). На **фигуре 1** представлено схематическое изображение полипептида MUC16 и показан фрагмент («выпуклость»), оставшийся на поверхности клетки после расщепления. В частности, CAR конструировали таким образом, чтобы они содержали связывающие молекулы scFv против MUC16 как в ориентации VH-VL (H-L), так и в ориентации VL-VH (L-H), шарнир CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий сигнальный домен 4-1BB и сигнальный домен CD3 $\zeta$  (SEQ ID NO: 1 - 12 и 41 - 150). Также конструировали CAR BB4020 и BB4021, содержащие известную связывающую MUC16 молекулу, костимулирующий домен 41BB или CD28, соответственно, и сигнальный домен CD3 $\zeta$ .

### ТАБЛИЦА 3

CAR против MUC16	Описание	Титры	Kd связывающей молекулы	Группа эпитопов
pBB4000	7135 H-L; BBz	$8,57 \times 10^7$	1,05e-8	1
pBB4001	7135 L-H; BBz	$1,03 \times 10^7$	1,05e-8	1
pBB4002	7138 H-L; BBz	$6,55 \times 10^7$	3,21e-10	2
pBB4003	7138 L-H; BBz	$4,54 \times 10^7$	3,21e-10	2
pBB4004	8755 H-L; BBz	$1,10 \times 10^8$	1,24e-10	3
pBB4005	8755 L-H; BBz	$2,38 \times 10^8$	1,24e-10	3
pBB4006	8767 H-L; BBz	$2,74 \times 10^8$	1,01e-9	1
pBB4007	8767 L-H; BBz	$7,17 \times 10^7$	1,01e-9	1
pBB4008	8794 H-L; BBz	$2,98 \times 10^8$	5,54e-10	3
pBB4009	8794 L-H; BBz	$4,62 \times 10^5$	5,54e-10	3
pBB4010	8799 H-L; BBz	$2,24 \times 10^8$	8,26e-10	2

pBB4011	8799 L-H; BBz	$1,06 \times 10^8$	8,26e-10	2
pBB4012	8804 H-L; BBz	$7,86 \times 10^7$	1,86e-9	1
pBB4013	8804 L-H; BBz	$1,32 \times 10^7$	1,86e-9	1
pBB4014	8808 H-L; BBz	$9,67 \times 10^5$	2,77e-10	4
pBB4015	8808 L-H; BBz	$4,23 \times 10^7$	2,77e-10	4
pBB4016	8810 H-L; BBz	$1,68 \times 10^7$	1,12e-9	2
pBB4017	8810 L-H; BBz	$2,55 \times 10^7$	1,12e-9	2
pBB4018	8813 H-L; BBz	$5,35 \times 10^7$	3,2e-10	5
pBB4019	8813 L-H; BBz	$3,46 \times 10^7$	3,2e-10	5
pBB4020	aMUC16 CAR; BBz	$7,42 \times 10^7$		
pBB4021	aMUC16 CAR; CD28z	$6,14 \times 10^7$		

## ПРИМЕР 2

### ОЦЕНКА ХАРАКТЕРИСТИК CAR ПРОТИВ MUC16 IN VITRO.

Десять scFv антител преобразовывали в CAR в ориентации легкая-тяжелая, тяжелая-легкая с получением 20 конструкций CAR против MUC16 (таблица 4). Каждой конструкцией в лентивирусных векторах (LVV) трансдуцировали Т-клетки, полученные от здоровых доноров, и подвергали скринингу на число копий вектора (VCN) (фигура 2), экспрессию CAR (фигура 3) и антиген-зависимую и независимую активность (фигуры 4А - 4D). Антигензависимую активность оценивали по  $IFN\gamma$ , высвобожденному в совместных культурах CAR-Т-клеток с положительными (OVCAR3) или отрицательными (Jurkat, PANC-1) по антигену опухолевыми клетками, тогда как антиген-независимую активность оценивали по  $IFN\gamma$ , высвобожденному только в культурах Т-клеток. Число копий вектора (VCN) оценивали для оценки эффективности трансдукции LVV. Из 20 подвергнутых скринингу CAR 6 конструкций были исключены из числа приоритетных: 3 конструкции минимально трансдуцировали Т-клетки (фигура 2: BB4009, BB4013, BB4014); и из конструкций, которые хорошо трансдуцировали клетки (т. е.  $VCN > 1$ ), 3 продукта CAR-Т демонстрировали низкую (< 30%) экспрессию CAR (фигура 3: BB4002, BB4003, BB4016). Из оставшихся 14 CAR BB4010 была исключена из числа приоритетных вследствие относительно более высокого антиген-независимого высвобождения  $IFN\gamma$  (фигура 4А). Из оставшихся 13 CAR, 8 проявляли антигензависимую активность, поскольку эти CAR приводили к высвобождению  $IFN\gamma$  при совместном культивировании с клетками OVCAR3 (фигура 4В), но не клетками Jurkat (фигура 4С) или PANC-1 (фигура 4D). Из этих 8 CAR

выбрали BB4000, BB4011 и BB4015 для дополнительного определения характеристик *in vitro* и *in vivo* на основании их аффинности к МАТ, связывающего эпитопа и диапазона антигензависимой реактивности, >30% экспрессии CAR, незначительной антиген-независимой реактивности или ее отсутствия и >1 VCN.

### ПРИМЕР 3

ОЦЕНКА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ CAR ПРОТИВ MUC16 К ЭКСПРЕССИИ MUC16.

Фармакологическую чувствительность BB4000, BB4011 и BB4015 оценивали для шести антиген-отрицательных опухолевых клеток (**фигура 5**: Jurkat, PANC-1, HUN7, K562, A549 и RD) для демонстрации антигенной специфичности. Высвобождение IFN $\gamma$  измеряли в супернатантах, собранных из совместных культур CAR-T-клеток или контрольных нетрансдуцированных T-клеток (UTD), с каждой антиген-отрицательной линией опухоли при соотношении 1:1 в течение 24 часов. Из оцененных CAR, BB4015 продемонстрировал самую низкую тоническую активность у всех доноров.

Затем BB4000, BB4011 и BB4015 оценивали на сконструированных клетках опухоли RD, стабильно экспрессирующих высокие, средние или низкие уровни эктодомена MUC16 (**фигура 6A**), в отношении антигензависимой активности по IFN $\gamma$ , высвобожденному в совместную культуру. CAR-T-клетки или UTD T-клетки (от трех доноров) культивировали совместно с экспрессирующими MUC16 клетками опухоли RD в течение 24 часов в соотношении 1:1. BB4000 приводила к самому высокому высвобождению IFN $\gamma$ , за которой следовали BB4015 и BB4011. Поддающиеся титрованию антигензависимые ответы наблюдали во всех антиген-положительных условиях (**фигура 6B**).

Антигензависимую активность дополнительно оценивали по IFN $\gamma$ , высвобожденному в совместную культуру CAR-T-клеток или контрольных UTD T-клеток с опухолевыми клетками K562, экспрессирующими титруемое количество антигена MUC16. мРНК, кодирующую эктодомен MUC16 (SEQ ID NO: 39), вводили путем электропорации в опухолевые клетки K562 в диапазоне от 0,156 мкг до 2,5 мкг мРНК (**фигура 7A**). CAR-T-клетки и UTD T-клетки от трех здоровых доноров культивировали совместно в соотношении 1:1 с трансфицированными K562 в течение 24 часов. Для K562 продемонстрировали титруемое высвобождение IFN $\gamma$  в условиях подвергнутых

электропорации опухолевых клеток (**фигура 7B**). Все из ВВ4000, ВВ4011 и ВВ4015 демонстрировали зависимое от антигена высвобождение IFN $\gamma$  дозозависимым образом.

Наконец, антигензависимую цитотоксичность ВВ4000, ВВ4011 и ВВ4015 оценивали по проценту (%) уничтожения опухолевых клеток. CAR-T-клетки или UTD T-клетки от трех здоровых доноров и упомянутые выше сконструированные опухолевые клетки RD совместно культивировали при соотношениях эффектора и T-клеток (Э:М) 10:1, 5:1 и 2,5:1 в течение 72 часов на анализаторе сопротивления. Для CAR ВВ4015, ВВ4000 и ВВ4011 выявили >70% цитотоксичность при культивировании со средой RD или опухолевыми клетками с высокой экспрессией антигена при всех соотношениях Э:М (**фигура 8A**). Для ВВ4011 и ВВ4015 выявили <60% цитотоксичность при культивировании с опухолевыми клетками RD с низкой экспрессией антигена при соотношении Э:М 2,5:1, тогда как для ВВ4000 выявили >60% (**фигура 8B**). Для всех из ВВ4000, ВВ4011 и ВВ4015 выявили антигензависимую цитотоксичность дозозависимым образом.

#### ПРИМЕР 4

ОЦЕНКА ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ T-КЛЕТОК С CAR ПРОТИВ MUC16.

T-клетки с CAR ВВ4000, ВВ4011 и ВВ4015 характеризовали по фенотипическим маркерам с помощью проточной цитометрии. Маркеры включали CD3, CD4, CD8, CD62L и CD45RA. ВВ4000 приводил к получению в среднем 45% CD4<sup>+</sup> T-клеток и в среднем 36,4% CD8<sup>+</sup> T-клеток; ВВ4011 - 47,1% CD4<sup>+</sup> T-клеток и 38% CD8<sup>+</sup> T-клеток; ВВ4015 - 60,9% CD4<sup>+</sup> T-клеток и 29% CD8<sup>+</sup> T-клеток. По сравнению с UTD контролями, для ВВ4015 продемонстрировали повышенную экспрессию CD62L и CD45RA, что указывает на более необученный фенотип с потенциалом большей персистенции *in vivo*, тогда как оба ВВ4000 и ВВ4011 характеризовались пониженной экспрессией CD62L (фигура 9).

#### ПРИМЕР 5

СВЯЗЫВАНИЕ CAR ПРОТИВ MUC16 С ЭКТОДОМЕНОМ MUC16.

Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), выделенные из крови человека, активировали с применением антител против CD3 и против CD28. Затем активированные клетки из МКПК трансдуцировали лентивирусным вектором,

содержащим полинуклеотид, кодирующий конструкцию BB4015 на основе CAR против MUC16 (см. SEQ ID NO: 11 и 12). UTD клетки использовали в качестве контрольного условия. Трансдуцированные клетки и UTD клетки размножали в среде для выращивания Т-клеток в течение 10 дней в присутствии IL2.

После размножения клетки, трансдуцированные CAR против MUC16, культивировали в 96-луночных планшетах, покрытых антигеном эктодомена выпуклости MUC16 (SEQ ID NO: 39) в концентрации в диапазоне от 1,54 нг/мл до 1125 нг/мл или белком CA125 (полипептид MUC16 человека без антигена эктодомена выпуклости; SEQ ID NO: 40) в концентрациях в диапазоне от 1,37 ед/мл до 10000 ед/мл. Т-клетки с CAR против MUC16 высвобождали возрастающие уровни IFN $\gamma$ , пропорциональные концентрации эктодомена выпуклости MUC16 (**фигура 10A**), тогда как белок CA125 не вызывал никакого функционального ответа со стороны Т-клеток с CAR против MUC16 (**фигура 10B**). Контроли UTD не демонстрировали какого-либо функционального ответа на выпуклость MUC16 или CA125. Это иллюстрирует специфичность CAR против MUC16 к эктодомену MUC16 по сравнению со срезанной частью CA125.

#### ПРИМЕР 6

##### ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ Т-КЛЕТКИ С CAR ПРОТИВ MUC16

МКПК здорового человека собирали и активировали с применением антител против CD3 и против CD28. Затем клетки трансдуцировали лентивирусным вектором, содержащим полинуклеотид, кодирующий конструкцию BB4015 CAR против MUC16 (см. SEQ ID NO: 11 и 12). UTD клетки использовали в качестве контрольного условия. Трансдуцированные клетки и UTD клетки размножали в среде для выращивания Т-клеток в течение 10 дней в присутствии IL2.

UTD клетки или Т-клетки с CAR против MUC16 совместно культивировали в соотношении 1:1 с опухолевыми клетками OVCAR3, которые экспрессируют антиген MUC16. Через 24 часа после совместного культивирования супернатанты собирали и анализировали в них концентрацию IFN $\gamma$  с применением Lumiplex. Для Т-клеток с CAR против MUC16 продемонстрировали специфическое для антигена MUC16 высвобождение IFN $\gamma$  по сравнению с контрольным условием UTD (результаты не представлены).

Самкам мышей NSG *in vivo* инокулировали внутрибрюшинно  $20 \times 10^6$  клеток OVCAR3.FP, экспрессирующих люциферазу. Приблизительно через 14 дней, когда опухоли в среднем достигли опухолевой нагрузки  $1,5 \times 10^8$  п/с, мышам либо вводили среду-носитель, либо  $20 \times 10^6$  UTD, либо  $20 \times 10^6$  Т-клеток с CAR против MUC16. Контроль опухоли OVCAR3.FP наблюдали у животных, которым инъецировали Т-клетки с CAR против MUC16, через ~5 дней после инъекций CAR-Т-клеток (**фигура 11**). Группа с Т-клетками с CAR против MUC16 в количестве  $n = 5$  представлена в виде отдельных точек данных для каждого животного группы. Через 28 дней после инъекции Т-клеток с CAR против MUC16 группе мышей  $n = 5$  повторно вводили инъекцию опухоли OVCAR3.FP, при этом контрольной интактной группе мышей NSG повторно вводили опухолевые клетки OVCAR3.FP. Отторжение опухоли наблюдали после повторного введения. На **фигуре 11** показан средний поток люминесценции на группу для групп среды-носителя, UTD и OVCAR3.FP для  $n = 5$  мышей.

#### ПРИМЕР 7

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ Т-КЛЕТОК С CAR ПРОТИВ MUC16 В МОДЕЛИ OVCAR3

Исследования *in vivo* проводили на самках мышей NSG, инокулированных опухолевыми клетками OVCAR3, мечеными люциферазой светлячка, позволяющими отслеживать опухолевую нагрузку с помощью системы визуализации *in vivo* (IVIS<sup>®</sup>; PerkinElmer<sup>®</sup>).  $20 \times 10^6$  опухолевых клеток вводили во внутрибрюшинное пространство самок мышей и отслеживали до достижения подходящего объема опухоли для инъекции CAR-Т. Т-клетки BB4000, BB4011, BB4017 и BB4015 вводили в/в в общем объеме 0,4 мл через хвостовую вену. Отслеживали эффективность Т-клеток у мышей на протяжении исследования. При попарном сравнении *in vivo* для BB4015 продемонстрировали более быстрый и более продолжительный ответ, чем BB4011 (**фигура 12А**), BB4000 (**фигура 12В**) и BB4017 (**фигура 12С**).

Затем использовали модель IP опухоли OVCAR3.FP, как описано выше. В день 0 животных лечили однократной в/в инъекцией BB4015 и BB4000 в количестве  $20 \times 10^6$ ,  $10 \times 10^6$  или  $3 \times 10^6$  CAR+ клеток/мышь, UTD клеток или среды-носителя RPMI (контроль). Среда-носитель отдельно и контрольные UTD клетки не оказывали влияния на опухолевую нагрузку. Для BB4015 продемонстрировали лучшую дозозависимую противоопухолевую эффективность по сравнению с BB4000 при всех дозах, при этом

наиболее высокая доза, составляющая  $20 \times 10^6$  CAR+ клеток/мышь, устраняла опухоли примерно ко дню 6 (**фигуры 13A - 13C**). В целом, эти результаты демонстрируют, что BB4015 контролирует рост опухоли OVCAR3.FP с большей дозозависимой противоопухолевой активностью, чем другие конструкции.

**Таблица 4. ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ**

SEQ ID NO :	Описание	Последовательность
1	CDRL1 антитела против MUC16 8808	QSLSSNY
2	CDRL2 антитела против MUC16 8808	GIS
3	CDRL3 антитела против MUC16 8808	QQYGSSPWT
4	CDRH1 антитела против MUC16 8808	GFTFSNYG
5	CDRH2 антитела против MUC16 8808	ISDDGSFK
6	CDRH3 антитела против MUC16 8808	AKWQHNWNDGGFDY
7	Вариабельная область легкой цепи антитела против MUC16 8808	EIVLTQSPDTLSLSPGERATLSCRASQSLSSNYLAWYRQKP GQAPRLLIYGISSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK
8	Вариабельная область тяжелой цепи антитела против MUC16 8808	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSNYGIHWVRQ APGKGLEWVAVISDDGSFKFYADSVKGRFTISRDNKNTL YLQMNSLRVEDSAVYHCAKWQHNWNDGGFDYWGQGT LVTVSS
9	pBB4015 CAR, AK	EIVLTQSPDTLSLSPGERATLSCRASQSLSSNYLAWYRQKP GQAPRLLIYGISSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF

	<p>последовательность без сигнального пептида</p>	<p>AVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGG                  SQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSNYGIHWVR                  QAPGKGLEWVAVISDDGSFKFYADSVKGRFTISRDN SKN                  TLYLQMNLSLRVEDSAVYHCAKWQHNWNDGGFDYWGQ                  GTLVTVSSTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG                  AVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGR                  KLLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEEGGCELRV                  KFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG                  RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG                  ERRRGKGH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR</p>
<p>10</p>	<p>pBB4015 CAR, НК последовательность без сигнального пептида</p>	<p>GAAATTGTGCTGACCCAGAGCCCCGATACCCTTTCCT                  TTCCCAGGCGAGCGGCCACACTGTCTTGCAGGGCGT                  CACAGAGCCTGAGCAGCAACTATCTCGCGTGGTATAGA                  CAGAAACCAGGGCAAGCCCCACGGCTGCTGATCTATG                  GAATTAGCTCACGGGCAACAGGAATCCCCGACAGATTC                  AGTGGGTCTGGGAGCGGAACGGATTTTACCCTGACAAT                  TAGTAGATTGGAACCGGAAGACTTCGCTGTGTACTATT                  GCCAGCAGTACGGCTCATCCCCGTGGACCTTCGGACAA                  GGCACTAAGGTAGAGATCAAAGGTGGAGGGGGCTCAG                  GGGGAGGCGGAAGCGGAGGCGGAGGATCTCAGGTGCA                  GCTGGTTGAGTCTGGAGGCGGAGTCGTTTCAGCCAGGTA                  GGAGCCTCCGACTCTCCTGCGTCGCAAGTGGGTTTACG                  TTTTCCAATTACGGGATTCCTGGGTCCGACAGGCCCC                  CGGGAAGGGGCTCGAGTGGGTGGCCGTTATTAGCGAT                  GACGGGTCTTCAAGTTCTATGCCGATTCAGTCAAAGG                  TAGATTCACAATTTCAAGGGATAATAGTAAAAATACAC                  TGTA CTTGCAAATGAACTCTCTGCGCGTCGAGGATTC A                  GCCGTGTACCATTGCGCGAAATGGCAGCACAATTGGAA                  TGACGGCGGATTCGATTATTGGGGCCAGGGCACACTTG                  TAACTGTGTCAAGCACCACAACACCTGCTCCAAGGCC                  CCCACACCCGCTCCA ACTATAGCCAGCCAACCATTGAG                  CCTCAGACCTGAAGCTTGCAGGCCCGCAGCAGGAGGC                  GCCGTCCATACGCGAGGCCTGGACTTCGCGTGTGATAT                  TTATATTTGGGCCCTTTGGCCGGAACATGTGGGGTGT                  TGCTTCTCTCCCTTGTGATCACTCTGTATTGTAAGCGCG                  GGAGAAAGAAGCTCCTGTACATCTTCAAGCAGCCTTTT                  ATGCGACCTGTGCAAACCACTCAGGAAGAAGATGGGT                  GTTCATGCCGCTTCCCCGAGGAGGAAGAAGGAGGGTG                  TGA ACTGAGGGTGAAATTTTCTAGAAGCGCCGATGCTC                  CCGCATATCAGCAGGGTCAGAATCAGCTCTACAATGAA                  TTGAATCTCGGCAGGCGAGAAGAGTACGATGTTCTGGA                  CAAGAGACGGGGCAGGGATCCCGAGATGGGGGGAAAG                  CCCCGGAGAAAAATCCTCAGGAGGGGTTGTACAATG                  AGCTGCAGAAGGACAAGATGGCTGAAGCCTATAGCGA                  GATCGGAATGAAAGGCGAAAGACGCAGAGGCAAGGG                  GCATGACGGTCTGTACCAGGGTCTCTCTACAGCCACCA                  AGGACACTTATGATGCGTTGCATATGCAAGCCTTGCCA                  CCCC GC</p>

<p>11</p>	<p>pBB4015 CAR AK последовательность с сигнальным пептидом</p>	<p>MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVLTQSPDTLSLSPGERAT LSCRASQSLSSNYLAWYRQKPGQAPRLLIYGISSRATGIPD RFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWFQ GTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGR SLRLSCVASGFTFSNYGIHWVRQAPGKGLEWVAVISDDG SFKFYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRVEDSAVY HCAKWQHNWNDGGFDYWGQGLVTVSSTTTPAPRPPTP APTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWP LAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQ LYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGDL YQGLST ATKDTYDALHMQUALPPR</p>
<p>12</p>	<p>pBB4015 CAR, HK последовательность с сигнальным пептидом</p>	<p>ATGGCCCTGCCGTTACCGCTCTCTTGCTGCCCTGGCG CTGCTTCTGCACGCGGCAAGACCCGAAATTGTGCTGAC CCAGAGCCCCGATACCCTTCCCTTCCCCAGGCGAGC GCGCCACACTGTCTTGCAGGGCGTCACAGAGCCTGAGC AGCAACTATCTCGCGTGGTATAGACAGAAACCAGGGC AAGCCCCACGGCTGCTGATCTATGGAATTAGCTCACGG GCAACAGGAATCCCCGACAGATTCAGTGGGTCTGGGA GCGGAACGGATTTTACCCTGACAATTAGTAGATTGGAA CCGGAAGACTTCGCTGTGTACTATTGCCAGCAGTACGG CTCATCCCCGTGGACCTTCGGACAAGGCACTAAGGTAG AGATCAAAGGTGGAGGGGGCTCAGGGGGAGGCGGAAG CGGAGGCGGAGGATCTCAGGTGCAGCTGGTTGAGTCTG GAGGCGGAGTCGTTACGCCAGGTAGGAGCCTCCGACTC TCCTGCGTCGCAAGTGGGTTTACGTTTTCCAATTACGGG ATTCAGTGGGTCCGACAGGCCCCCCGGGAAGGGGCTCGA GTGGGTGGCCGTTATTAGCGATGACGGGTCTTTCAAGT TCTATGCCGATTCAGTCAAAGGTAGATTCACAATTTCA AGGGATAATAGTAAAAATACACTGTA CTTGCAAATGAA CTCTCTGCGCGTCGAGGATTCAGCCGTGTACCATTGCG CGAAATGGCAGCACAAATTGGAATGACGGCGGATTCGA TTATTGGGGCCAGGGCACACTTGTA ACTGTGTCAAGCA CCACAACACCTGCTCCAAGGCCCCCCACACCCGCTCCA ACTATAGCCAGCCAACCATTGAGCCTCAGACCTGAAGC TTGCAGGCCCGCAGCAGGAGGCGCCGTCCATACGCGA GGCCTGGACTTCGCGTGTGATATTTATATTTGGGCCCT TTGGCCGGAACATGTGGGGTGTGCTTCTCTCCCTTGTG ATCACTCTGTATTGTAAGCGCGGGAGAAAGAAGCTCCT GTACATCTTCAAGCAGCCTTTTATGCGACCTGTGCAA CCACTCAGGAAGAAGATGGGTGTTTCATGCCGCTTCCCC GAGGAGGAAGAAGGAGGGTGTGAACTGAGGGTGAAAT TTTCTAGAAGCGCCGATGCTCCCGCATATCAGCAGGGT CAGAATCAGCTCTACAATGAATTGAATCTCGGCAGGCG AGAAGAGTACGATGTTCTGGACAAGAGACGGGGCAGG GATCCCGAGATGGGGGGAAAGCCCCGGAGAAAAAATC CTCAGGAGGGGTGTACAATGAGCTGCAGAAGGACAA GATGGCTGAAGCCTATAGCGAGATCGGAATGAAAGGC</p>

		<p>GAAAGACGCAGAGGCAAGGGGCATGACGGTCTGTACC                  AGGGTCTCTCTACAGCCACCAAGGACACTTATGATGCG                  TTGCATATGCAAGCCTTGCCACCCCGC</p>
<p>13</p>	<p>Последовательно                  сть АК MUC16                  человека</p>	<p>MLKPSGLPGSSSPTRSLMTGSRSTKATPEMDSGLTGATLS                  PKTSTGAIVVTEHTLPFTSPDKTLASPTSSVVGRRTQSLGV                  MSSALPESTRGMTHSEQRTSPSLSPQVNGTPSRNYPATS                  MVSGLSSPRTRTSSTEGNFTKEASTYTLTVETTSGPVTEKY                  TVPTETSTTEGDSTETPWDTRYIPVKITSPMKTFADSTASK                  ENAPVSMTPAETTVDSHTPGRTNPSFGTLYSSFLDLSPKG                  TPNSRGETSLELILSTTGYPFSSPEPGSAGHSRISTSAPLSSS                  ASVLDNKISETSIFSGQSLTSPLSPGVPEARASTMPNSAIPF                  SMTLSNAETSAERVRSTISSLGTPSISTKQTAETILTFHAF                  ETMDIPSTHIAKTLASEWLGSPGTLGGTSTSALTTTSPSTT                  LVSEETNTHHSTSGKETEGTLNTSMTPLETSAPGEESEMT                  ATLVPTLGF TTLDSKIRSPSQVSSSHPTRELRTTGSTSGRQS                  SSTA AHGSSDILRATTSSTSKASSWTSESTAQQFSEPQHTQ                  WVETSPSMKTERPPASTSVAAPITTSVPSVVSFGFTLKTSS                  TKGIWLEETSADTLIGESTAGPTTHQFAVPTGISMTGGSST                  RGSQGTTHLLTRATASSETSADLTLATNGVPVSVSPAVSK                  TAAGSSPPGGTKPSYTMVSSVIPETSSLQSSAFREGTSLGL                  TPLNTRHPFSSPEPDSAGHTKISTSIPLLSSASVLEDKVSAT                  STF SHKATSSITGTPEISTKTKPSSAVLSSMTLSNAATSP                  ERVRNATSPLTHPSPSGEETAGSVLTLSTSAETDSPNIHPT                  GTLTSESSESPSTLSLPSVSGVKTTFSSSTPSTHLFTSGEETE                  ETSNPSVSQPETSVS RVRTTLASTSVPTPVFPTMDTWPTRS                  AQFSSSHLVSELRATSSSTSVTNSTGSALPKISHLTGTATMS                  QTNRDTFNDSAAPQSTTWPETSPRFKTGLPSATTTVSTSA                  TSLSATVMVSKFTSPATSSMEATSIREPSTTILTTETTNGPG                  SMAVASTNIPIGKGYITEGRDLTSHLPIGTTASSETSMDFT                  MAKESVSMVSPSQSMDAAGSSTPGRTSQFVDTFSDDVY                  HLTSREITIPRDGTSSALTPQMTATHPPSPDPGSARSTWLG                  LSSSPSSPTPKVTMSSTFSTQRVTTSMIMDTVETSRWNMP                  NLPSTTSLTPSNIPTSGAIGKSTLVPLDTPSPATSLEASEGG                  LPTLSTYPESTNTPSIHLGAHASSESPSTIKLTMASVVKPGS                  YTPLTFPSIETHIHVSTARMA YSSGSSPEMTAPGETNTGST                  WDPTTYITTTDPKDTSSAQVSTPHSVRTLRTTENHPKTES                  ATPAAYSGSPKISSPNLTSPATKAWTITDTTEHSTQLHYT                  KLAEKSSGFETQSAPGPVSVVIPTSP TIGSSTLELTS DVPGE                  PLVLAPSEQTTITLPMATWLSTSLTEEMASTDLDISSPSSP                  MSTFAIFPPMSTPSHELKSEADTSAIRNTDSTTL DQHLGIR                  SLGRTGDLTTPITPLTTTWTSVIEHSTQAQDTLSATMSPT                  HVTQSLKDQTSIPASASPSHLTEVYPELGTQGRSSSEATTF                  WKPSTD TLSREIETGPTNIQSTPPMDNTT TGSSSSGVT LGIA                  HLPIGTSSPAETSTNMALERRSSTATVSMAGTMGLLV TSA                  PGRSISQSLGRVSSVLSESTTEGVT DSSKGS SPRLNTQGNT                  ALSSSLEPSYAEGSQMSTSIPLTSSPTTPDVEFIGGSTFWTK                  EVTTVMTSDISKSSARTESSATLMSTALGSTENTGKEKL                  RTASMDLPSPTPSMEVTPWISLTL SNAPNTTDSL DLSHG                  HTSSAGTLATDRSLNTGVTRASRLENGSDTSSKSLSMGNS</p>

		<p>THTSMTYTEKSEVSSSIHPRPETSAPGAETTLTSTPGNRAIS LTLPFSSIPVEEVISTGITSGPDINSAPMTHSPITPPTIVWTST GTIEQSTQPLHAVSSEKVSVQTQSTPYVNSVAVSASPTHE NSVSSGSSTSSPYSSASLESLDSTISRRNAITSWLWDLTSL PTTTWPSTSLSEALSSGHSVSNPSSTTTEFPLFSAASTSAA KQRNPETETHGPQNTAASTLNTDASSVTGLSETPVGASISS EVPLPMAITSRSDVSGLTSESTANPSLGTASSAGTKLRTIS LPTSESLVFRMNKDPWTVSIPLGSHPTTNTETSIPVNSAG PPGLSTVASDVIDTPSDGAESIPTVSFSPSPDTEVTTISHFPE KTTHSFRTISSLTHELTSRVTPIPGDWMSSAMSTKPTGASP SITLGERRTITSAAPTTSPIVLTASFSTETSTVSLDNETTVKTS DILDARKTNELPSDSSSSSDLINTSIASSTMDVTKTASISPTS ISGMTASSPSSLFSSDRPQVPTSTTETNTATSPSVSSNTYSL DGGSNVGGTTPSTLPPFTITHPVETSSALLAWSRPVRTFSTM VSTDTASGENPTSSNSVVTSPVAPGTWTSVGTDDLPAMG FLKTSPAGEAHSLLASTIEPATAFTPHLSAAVVTGSSATSE ASLLTTSESKAIHSSPQTPTTPTSGANWETSATPESLLVVT ETSDTTLTSKILVTDILFSTVSTPPSKFPSTGTLGASFP LPDTPAIPLTATEPTSSLATSFDSTPLVTIASDSLGTVPETTL TMSETSNGDALVLKTVSNPDRSIPGITIQGVTESPLHPSSTS PSKIVAPRNTTYEGSITVALSTLPAGTTGSLVFSQSSENSET TALVDSSAGLERASVMPLTTGSQGMASSGGIRSGSTHSTG TKTFSSLPLTMNPGEVTAMSEITNRLTATQSTAPKGIPVK PTSAESGLLTPVSASSSPSKAFASLTAPPTWGIPQSTLTFE FSEVPSLDTKSASLPTPGQSLNTIPDSDASTASSLSKSPEK NPRARMMTSTKAISASSFQSTGFTETPEGSASPSMAGHEP RVPTSGTGDPRYASESMSYPDPKASSAMTSTSLASKLTT LFSTGQAARSGSSSSPISLSTEKETSFLSPTASTSRKTSFLG PSMARQPNILVHLQTSALTLSPSTLNMSQEEPELTSSTQTI AEEEGTTAETQTLTFTPSETPTSLLPVSSPTEPTARRKSSPE TWASSISVPAKTSLVETTDGTLVTTIKMSSQAAQGNSTWP APAEETGSSPAGTSPGSPMSTTLKIMSSKEPSISPEIRSTVR NSPWKTPETTPMETTVEPVTLQSTALGSGSTSISHLPTGT TSPTKSP TENMLATERVSLSPSPPEAWTNLYSGTPGGTRQ SLATMSSVSLESPTARSITGTGQQSSPELVSKTTGMEFSM WHGSTGGTTGDTHVSLSTSSNILEDVTPSPNSVSSLTDKSK HKTETWVSTTAIPSTVLNNKIMAAEQQTSRSVDEAYSSTS SWSDQTS GSDITLGASPDVTNTLYITSTAQTSLVSLPSGD QGITSLTNPSGGKTSSASSVTSPSIGLET LRANVSAVKSDIA PTAGHLSQTSSPAEVSILDVTTAPTGPSTITITMGTNSISTT TPNPEVGMSTMDSTPATERRTTSTEPSTWSSTAASDSWT VTDMTSNLKVARSPTISTMHTTSFLASSTELDSMSTPHG RITVIGTSLVTPSSDASAVKTETSTSERLSPSDTTASTPIST FSRVQRMSISVPDILSTSWTPSSTEAEDVPVSMVSTDHAST KTDPNTP LSTFLFDSLSTLDWDTGRSLSSATATTSAPQGAT TPQELTLETMISPATSQLPFSIGHITSAVTPAAMARSSGVTF SRPDPTSKKAEQTSTQLPTTTS AHPGQVPRSAATTL DVIPH TAKTPDATFQRQGQALTTEARATSDSWNEKEKSTPSAP WITEMMNSVSEDTIKEVTSSSSVLRTLNLTLDINLESGTTSS PSWKSSPYERIAPSESTTDKEAHPSTNTVETTGWVTSSEH</p>
--	--	--

		<p>ASHSTIPAHSA SSKLTSPVVTTSTREQAIVSMSTTTWPEST RARTEPNSFL TIELRDVSPYMDTSSTTQTSIISSPGSTAITKG PRTEITSSKRIS SFLA QSMRSDSPSEAITRLSNFPAMTESG GMILAMQTSPPGATSL SAPTLDTASATASWTGTPLATTQRF TYSEKTTLFSKGPEDTSQPSPPSVEETSSSSSLVPIHATTSPS NILLTSQGHSPSTPPVTSVFLSETSGLGKTTDMSRISLEPG TSLPPNLSSTAGEALSTYEASRDTKAIHHSADTAVTNMEA TSSEYSPIPGHTKPSKATSPLVTSHIMGDITSSTS VFGSSETT EIETVSSVNQGLQERSTSQVASSATETSTVITHVSSGDATT HVTKTQATFSSGTSISSPHQFITSTNTFTDVSTNPSTSLIMT ESSGV TITTQTGPTGAATQGPYLLDTSTMPYL TETPLAVTP DFMQSEKTTLISKGPKDVS WTSPPSVAETSYPSSLTPFLVT TIPPATSTLQGGHTSSPVSATSVLTSGLVKTTDMLNTSMEP VTNSPQNLNPSNEILATLAATTDIETIHPSINKAVTNMGT ASSAHVLHSTLPVSSEPSTATSPMVPASSMGDALASISIPG SETTDIEGEPTSSLTAGRKENSTLQEMNSTTESNILSNVSV GAITEATKMEVPSFDATFIPTPAQSTKFPDIFSVASSRLSNS PPMTISTHMTTTQTGSSGATSKIPLALDTSTLET SAGTPSV VTEGFAHSKITTAMNNDVKDVSQTNPPFQDEASSPSSQAP VLVTTLPSSVAFTPQWHSTSSPVMSSVL TSSLVKTAGKV DTSLETVTSSPQSMSNTLDDISV TSAATTDIETHPSINTVV TNVGTGSAFESHSTVSAYPEPSKVTSPNVTTSTMEDTTIS RSIPKSSKTRTETETSSLTPKLRETSISQEITSS TETSTVPY KELTGATTEVSR TDVTSSSSTSPGPDQSTVSLDISTETNTR LSTSPIMTESAEITITTQTGPHGATSQDTFTMDPSNTTPQA GIHSAMTHGFSQLDVTTLM SRIPQDVSWTSPPSVDKTSSPS SFLSSPAMTTPSLISSTLPEDKLSSPMTSLLTSGLVKITDILR TRLEPVTSSLPNFSSTSDKILATSKD SKDTKEIFPSINTEETN VKANNSGHESHSPALADSETPKATTQMVITTTVGD PAPST SMPVHGSSETTIKREPTYFLTPRLRETSTSQESSFPTDTSF LLSKVPTGTITEVSSTGVNSSSKISTPDHDKSTVPPDTFTGE IPRVFTSSIKTKSAEMTITTQASPPESASHSTLPLDTSTTLSQ GGTHSTVTQGFYSEVTTLMGMPGNVSWMTTPPVEETS SVSSLMSSPAMTSPSPVSSTSPQSIPSSPLPVTALPTSVL VTT TDVLGTTSPESVTSSPNNLSSITHERPATYKDTAHTEAAMH HSTNTAVTNVGTSGSGHKSQSSVLADSETSKATPLMSTTS TLGDTSVSTSTPNISQTNQIQTEPTASLSPRLRESSTSEKTSS TTETNTAFSYVPTGAITQASRTEISSR TISISDLDRPTIAPDI STGMITRLFTSPIMTKSAEMTVTTQTTTPGATSQGILPWDT STTLFQGGTHSTVSQGFPHSEITTLRSRTPGDVSWMTTPPV EETSSGFSLMSPSMTSPSPVSSTSPESIPSSPLPVTALLTSVL VTTTNVLGTTSPPEPVTSSPNNLSSPTQERLTTYKDTAHTEA MHA SMHTNTAVANVGTSISGHESQSSVPADSHTSKATSP MGITFAMGDTSVSTSTPAFFETRIQTESTSSLIPGLRDRTS EEINTVTETSTVLSEVPTTTTTEVSRTEVITSSR TTISGPDHS KMSPYISTETITRLSTFPFVTGSTEMAITNQTGPIGTISQATL TLDTSS TASWEGTHSPVTQRFPHSEETTMSRSTKGVSWQ SPPSVEETSSPSPVPLPAITSHSSLYSAVSGSSPTSALPVTS LLTSGRRKTIDMLDTHSELV TSSLPSASSFSGEILTSEASTN TETIHSENTAETNMGTTNSMHKHLHSSVSIHSQPSGHTPPK</p>
--	--	--

		<p>VTGSMMEDAIVSTSTPGSPETKNVDRDSTSPLTPELKEDST ALVMNSTTESNTVFSSVSLDAATEVSRAEVYDPTFMP ASAQSTKSPDISPEASSSHSNPPLTISTHKTIATQTGPSGV SLGQLTLDSTIATSAGTPSARTQDFVDSETTSVMNNDLN DVLKTSFSAEEANSLSSQAPLLVTTSPSPVTSTLQEHSTSS LVSVTSVPTPLAKITDMDTNLEPVTRSPQNLRLTLATSE ATTDTHTMHPSINTAVANVGTTSSPNEFYFTVSPDSDPYK ATS AVVITSTSGDSIVSTSMRPSAMKKIESETTFLIFRLR ETSTSQKIGSSSDTSTVFDKAFTAATTEVSRTELSSSRTSI QGTEKPTMSPDTSTRSVTMLSTFAGLTKSEERTIATQTGP HRATSQGTLTWDT SITTSQAGTHSAMTHGFSQLDLSTLTS RVPEYISGTSPPSVEKTSSSSSLLSLPAITSPSPVPTTLPE SRPSSPVHLTSLPTSLVKTDDMLASVASLPPNLGSTSHKIPT TSEDIKDTEKMYPSTNIAVTNVGTTTSEKESYSSVPAYSEPP KVTSPMVTSFNIRDTIVSTSMPGSSEITRIEMESTFSLAHL GLKGTSTSQDPIVSTEKSAVLHKLTTGATETSRTEVASSRRTS IPGPDHSTESPDISTEVIPSLPISLGITESSNMTIITRTGPPLGS TSQGTFTLDTPTTSSRAGTHSMATQEFPHSEMTTVMNKDP EILSWTIPPSIEKTSFSSSLMPSPAMTSPVSSTLPKTIHTPS PMTSLLTPSLVMTTDTLGTSPPEPTTSSPPNLSSTSHLITD EDTTAIEAMHPSTSTAATNVETTSSGHGSQSSVLADSEKT KATAPMDTTSTMGHSTVSTSMSVSSETTKIKRESTYSLTP GLRETSISQNASFSTDTSIVLSEVPTGTTAEVSRTEVTSSGR TSIPGPSQSTVLPEISTRMTRLFASPTMTESAEMTIPTQTG PSGTSQDTLTLDTSTTKSQAKTHSTLTQRFPHEMTTLM SRGPGDMSWQSSPSLENPSSLPSLLSLPATTSPPISSTLPV TISSSPLPVTSLLTSSPVTTTDMMLHTSPELVTSSPPKLSHTSD ERLTTGKDTTNEAVHPSTNTAASNVEIPSSGHESPSSALA DSETSKATSPMFITSTQEDTTVAISTPHFLETSRIQKESISSL SPKLRETGSSVETSSAIETSAVLSEVSIGATTEISRTEVTSSS RTSISGSAESTMLPEISTTRKIIKFPTSPILAESSEMTIKTQTS PPGSTSESTFTLDTSTTPSLVITHSTMTQRLPHSEITTLVSR GAGDVPRPSSLPVEETSPPSSQLSLSAMISPPVSSTLPASS HSSASVTSLLTPGQVKTTEVLDASAEPETSSPPSLSSTSVE ILATSEVTTDTEKIHPSNTAVTKVGTSSSGHESPSSVLPDS ETTKATSAMGTISIMGDTSVSTLTPALSNTKIQSEPASSLT TRLRETSTSEETSLATEANTVLSKVSTGATTEVSRTEAISFS RTSMMSGPEQSTMSQDISIGTIPRISASSVLTESAKMTITTQT GPSESTLESTLNLNTATTPSWVETHSIVIQGFHPPEMTTSM GRGPGGVSWPSPPFVKETSPSSPLSLPAVTSHPVSTTFL AHIPPSPLPVTSLLTSGPATTTDILGTSTEPGTSSSSSLSTTS HERLTTYKDTAHTAVHPSTNTGGTNVATTSSGYKSQSS VLADSSPMCTTSTMGDTSVLTSTPAFLETRRIQTEASSLT PGLRESSGSEGTSSTGKMSVLSKVPTGATTEISKEDVTSIP GPAQSTISPDISTRVSWFSTSPVMTESAEITMNTHTSPLG ATTQGTSTLDTSSSTSLTMTHSTISQGFSSHMSTLMRRGP EDVSWMSPPLLEKTRPSFSLMSSPATTSPSPVSSTLPEISS SPLPVTSLLTSGLAKTTDMLHKSSEPVTNSPANLSSTSVEI LATSEVTTDTEKTHPSSNRTVTDVGTSSSGHESTSFVLADS QTSKVTSPMVITSTMEDTSVSTSTPGFFETSRIQTEPTSSLT</p>
--	--	--

		<p>LGLRKTSSSEGTSLATEMSTVLSGVPTGATAEVSRTTEVTSS SRTSISGFAQLTVSPETSTETITRLPTSSIMTESAEMMIKTQ TDPGPGSTPESTHTVDISTTPNWWETHSTVTQRFHSEM TTL VSRSPGDMLWPSQSSVEETSSASSLLSLPATTSPSPVSS TL VEDFPSASLPVTSLLNPGLVITDRMGISREPGTSSTSNLSS TSHERLTTLEDTVDTEDMQPSTHTAVTNVRTSISGHESQS SVLSDSETPKATSPMGTTYTMGETSVSISTSDFFETSRIQIE PTSSLTSGLRETSSSERISSATEGSTVLSEVPSGATTEVSRT EVISSRGTSMGPDQFTISPDISTEAITRLSTSPIMTESAESAI TIETGSPGATSEGTLTLDSTTTTFWSGTHSTASPGFHSSEM TTLMSRTPGDVPWPSLPSVEEASSVSSSLSSPAMTSTSFFS TLPESISSPHPV TALLTLGPVKTTDMLRTSSEPETSSPNL SSTS AEILATSEVTKDREKIHPSNTPVVNVGTVIYKHLSPS SVLADLVTTKPTSPMATTSTLGNSTVSTSTPAFPEMTMTQ PTSSLTSGLREISTSQETSSATERSASLSGMPTGATTKVSR T EALSLGRTSTPGPAQSTISPEISTETITRISTPLTTTGSAEMTI TPKTGHSGASSQGTFTLDTSSRASWPGTHSAATHRSPHSG MTTPMSRGPEDVSWPSRPSVEKTSPPSSLVSLSAVTSPSPL YSTPSESSHSSPLRVTSLFTPVMMKTTDMLDTSLEPVTTSP PSMNITSDESLATSKATMETEAIQLSENTAVTQMGTISAR QEFYSSYPGLPEPSKVTSPVVTSSTIKDIVSTTIPASSEITRIE MESTSTLTPTPRETSTSQEIHSATKPSTVPYKALTSATIEDS MTQVMSSSRGSPDQSTMSQDISTEVITRLSTSPIKTESTE MTITTQTGSPGATSRGTLTLDSTTFMSGTHSTASQGFHS QMTALMSRTPGDVPWLSHPSVEEASSASFSLSSPVMTSS PVSS TL PDSIHSSLPVTSLLTSGLVKTTTELLGTSSEPETSSP PNLSSTS AEILAITVTTDTEKLEMTNVVTS GYTHESSV LADSVTTKATSSMGITYPTGDTNVLSTPAFSDTSRIQTKS KLSLTPGLMETSISEETSSATEKSTVLSSVPTGATTEVSRTE AISSRRTSIPGPAQSTMSSDTSMETITRISTPLTRKESTDMAI TPKTGPSGATSQGTFTLDSSTASWPGTHSATTQRFPSV VTTTPMSRGPEDVSWPSPLSVEKNSPSSLVSSSVTSPSPL YSTPSGSSHSSPVVTSLFTSIMMKATDMLDASLEPETTSA PNMNITSDESLAASKATTETEAIHVFENTAASHVETTSATE ELYSSSPGFSEPTKVISPVVTSSSIRDNMVSTTMPGSSGITRI EIESMSSLTPGLRETRTSQDITSSSTETSTVLKMPGATPEV SRTEVMPSSRTSIPGPAQSTMSLDISDEVVTRLSTSPIMTES AEITITTQTGYSLATSQVTLPLGTSMTFLSGTHSTMSQGLS HSEMTNLMSRGPESLSWTS PRFVETTRSSSSLTSLPLTTSL SPVSS TLLDSSPSSPLPVTSLLPGLVKTTTEVLDTSSEPKTSS SPNLSSTSVEIPATSEIMTDTEKIHPSNTAVAKVRTSSSVH ESHSSVLADSETTITIPSMGITS AVDDTTVFTSNPAFSETRRI PTEPTFSLTPGFRETSTSEETTSITETSAVLYGVPTSATTEVS MTEIMSSNRIHIPDSDQSTMSPDIITEVITRLSSSSMMSEST QMTITTQKSSPGATAQSTLTLATTTAPLARTHSTVPPRFLH SEM TTLMSRSPENPSWKSSSLFVEKTS SSSSLSLPVTTSPSV SSTLPQSIPSSSFVTSLLTPGMVKTTDTSTEPGTSLSPNLS GTSVEILAASEVTTDTEKIHPSMAVTNVGTTSSGHELYS SVSIHSEPSKATYPVGTSSMAETSISTSM PANFETTGF EAE PFSHLTSGFRKTNMSLDTSSVTPNTNPSSPGSTHLLQSSKT</p>
--	--	---

		<p>DFTSSAKTSSPDWPPASQYTEIPVDIITPFNASPSITESTGITS FPESRFTMSVTESTHHLSTDLLPSAETISTGTVMPSLSEAM TSFATTGVPRAISGSGSPFSRTESGPGDATLSTIAESLPSSTP VPFSSSTFTTTDSSTIPALHEITSSSATPYRVDTSLGTESST EGRLVMVSTLDTSSQPGRTESSPILDRMTESVELGTVTS YQVPSLSTRLTRTDGIMEHITKIPNEAAHRGTIRPVKGPQT STSPASPKGLHTGGTKRMETTTTALKTTTTALKTTSRATL TTSVYTPTLGLTLPLNASMQMASTIPTEMMITTPYVFPDV PETSSLATSLGAETSTALPRTTPSVFNRESETTASLVSRSG AERSPVIQTLDVSSSEPDTTASWVIHPAETIPTVSKTTPNFF HSELDTVSSTATSHGADVSSAIPTNISPSELDALTPLVTISG TDTSTTFPTLTKSPHETETRTTWLTHPAETSSTIPRTIPNFS HHESDATPSIATSPGAETSSAIPIMTVSPGAEDLVTSQVTSS GDRNMTIPTLTLSPGEPKTIASLVTHPEAQTSSAIPTSTISP AVSRLVTSMVTSLAAKTSTTNRALTNSPGEPATTVSLVTH PAQTSPTVPWTTSIFFHSKSDTTPSMTTSHGAESSAVPTP TVSTEVPGVVTPLVTSSRAVISTTIPILTLSPGEPETTPSMAT SHGEEASSAIPPTVSPGVPGVVTSLVTSSRAVTSTTIPILTF SLGEPETTPSMATSHGTEAGSAVPTVLPEVPGMVTSLVAS SRAVTSTLPTLTLSPGEPETTPSMATSHGAEASSTVPTVS PEVPGVVTSLVTSSSGVNSTSIPTLILSPGELETTTPMATSH GAEASSAVPTPTVSPGVSGVVTPLVTSSRAVTSTTIPILTL SSEPETTPSMATSHGVEASSAVLTVSPEVPGMVTSLVTSSR AVTSTTIPTLTISSDEPETTTSLVTHSEAKMISAIPTLAVSPT VQGLVTSLVTSSGSETSAFNLTVASSQPETIDSWVAHPGT EASSVVPTLTVSTGEPFTNISLVTHPAESSTLPRTTSRFSH SELDTMPSTVTSPEAESSAISTTISPGIPGVLTSLVTSSSGRD ISATFPTVPESPHSEATASWVTHPAVTSTTVPRTPPNYSH SEPDTTPSIATSPGAEATSDFTITVSPDVPDMVTSQVTSSG TDTSIPTLTLSSGEPETTTSFITYSEHTSSAIPTLPVSPGA SKMLTSLVISSGTDSTTFPTLTETPYEPETTAIQLIHPAET NTMVPRTTPKFSSHKSDTTLPVAITSPGPEASSAVSTTTISP DMSDLVTSLVPSSGTDSTTFPTLSETPYEPETTATWLTHP AETSTTVSGTIPNFSHRGSDTAPSMVTSPGVDTRSGVPTTT IPPSIPGVVTSQVTSSATDTSTAIPTLTPSPGEPETTASSATH PGTQTGFTVPIRTVPSSEPDTMASWVTHPPQTSTPVSRSTS SFSHSSPDATPVMATSPRTEASSAVLTTISPGAPEMVTSQIT SSGAATSTTVPTLTHSPGMPETTALLSTHPRTETSKTFPAS TVFPQVSETTASLTIRPGAETSTALPTQTSSSLFTLLVTGTS RVDLSPTASPGVSAKTAPLSTHPGTETSTMIPTSTLSLGLL ETTGLLATSSSAETSTSTLTLTVSPAUSGLSSASITTDKPQT VTSWNTETSPSVTSVGPPEFSRTVTGTTMTLIPSEMPTPPK TSHGEGVSPTTILRTTMVEATNLATTGSSPTVAKTTTTFNT LAGSLFTPLTPGMSTLASESVTSRRTSYNHRSWISTTSSYN RRYWTPATSTPVTSTFSPGISTSSIPSSAATVPFMVPFTLN FTITNLQYEEDMRHPGSRKFNATERELQGLLKPLFRNSSL EYLYSGCRLASLRPEKDSSATAVDAICTHRPDPEDLGLDR ERLYWELSNLTNGIQELGPYTLDRNSLYVNGFTHRSSMPT TSTPGTSTVDVGTSGTPSSSPSTTAGPLLMPFTLNFTITNL QYEEDMRRTGSRKFNTMESVLQGLLKPLFKNTSVGPLYS</p>
--	--	---

		<p>GCRLTLLRPEKDGAATGVDAICTHRLDPKSPGLNREQLY WELSKLTNDIEELGPYTLDRNSLYVNGFTHQSSVSTTSTP GTSTVDLRTSGTPSSLSSPTIMAAGPLLVPFTLNFTITNLQY GEDMGHPGSRKFNTTERVLQGLLGPIFKNTSVGPLYSGCR LTSLRSEKDGAATGVDAICIHHLDPKSPGLNRERLYWELS QLTNGIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHRTSVPTSSTPGTSTV DLGTSGTPFSLPSPATAGPLLVLFTLNFTITNLKYEEDMHR PGSRKFNTTERVLQTLLGPMFKNTSVGLLYSGCRLTLLRS EKDGAATGVDAICTHRLDPKSPGVDREQLYWELSQTNG IKELGPYTLDRNSLYVNGFTHWIPVPTSSTPGTSTVDLGS TPSSLSPPTTAGPLLVPFTLNFTITNLKYEEDMHCPGSRKF NTTERVLQSLGPMFKNTSVGPLYSGCRLTLLRSEKDGA TGVDAICTHRLDPKSPGVDREQLYWELSQTNGIKELGPY TLDRNSLYVNGFTHQTSAPNTSTPGTSTVDLGTSGTPSSLP SPTSAGPLLVPFTLNFTITNLQYEEDMHHPGSRKFNTTERV LQGLLGPMFKNTSVGLLYSGCRLTLLRPEKNGAATGMDA ICSHRLDPKSPGLNREQLYWELSQTNGIKELGPYTLDRN SLYVNGFTHRSSVAPTSTPGTSTVDLGTSGTPSSLSPPTA VPLLVPFTLNFTITNLQYGEDMRHPGSRKFNTTERVLQGL LGPLFKNSSVGPLYSGCRLISLRSEKDGAATGVDAICTHH LNPQSPGLDREQLYWQLSQMTNGIKELGPYTLDRNSLYV NGFTHRSSGLTTSTPWTSTVDLGTSGTPSPVPSPTTTGPLL VPFTLNFTITNLQYEENMGHPGSRKFNITESVLQGLLKPLF KSTSVGPLYSGCRLTLLRPEKDGVA TRVDAICTHRPDPKIP GLDRQQLYWELSQTHTSITELGPYTLDRDSL YVNGFTQRS SVPTTSTPGTFTVQPETSETPSSLPGPTATGPVLLPFTLNFTI TNLQYEEDMRRPGSRKFNTTERVLQGLLMPLFKNTSVSSL YSGCRLTLLRPEKDGAATRVDVCTHRPDPKSPGLDRER LYWKLSQTHTGITELGPYTLDRHSL YVNGFTHQSSMTTTR TPDTSTMHLATS RTPASLSGPMTASPLLVLFTINFTITNLR YEENMHHPGSRKFNTTERVLQGLLRPVFKNTSVGPLYSG CRLTLLRPKKDGAATKVDAICTYRPDPKSPGLDREQLYW ELSQLTHSITELGPYTLDRDSL YVNGFTQRSSVPTTSSIPGTP TVDLGTSGTPVSKPGPSAASPLLVLFTLNFTITNLR YEENM QHPGSRKFNTTERVLQGLLRSLFKSTSVGPLYSGCRLTLL RPEKDGTATGVDAICTHHPDPKSPRLDREQLYWELSQT HNITELGPYALDNDLSLVNGFTHRSSVSTTSTPGTPTVYL ASKTPASIFGPSAASHLLILFTLNFTITNLR YEENMWPGSR KFNTTERVLQGLLRPLFKNTSVGPLYSGCRLTLLRPEKDG EATGVDAICTHRPDPTGPGLDREQLYLELSQTHTSITELG PYTLDRDSL YVNGFTHRSSVPTTSTGVVSEEPFTLNFTINL RYMADMGPGLKFNITDNVMQHLLSPLFQRSSLGARYT GCRVIALRSVKNGAETRVDLLCTYLQPLSGPLPIKQVFH ELSQQTHGITRLGPYSLDKDSL YLNGYNEPGPDEPPTTPKP ATTFLPPLSEATTAMGYHLKTLTNFTISNLQYSPDMGKG SATFNSTEGVLQHLLRPLFKSSMGPYLGQCQLISLRPEKD GAATGVDTTCTYHPDPVGPGLDIQQLYWELSQTHTGVTQ LGFYVLDRLDSL FINGYAPQNL SIRGEYQINFHIVNWNLSNP DPTSSEYITLLRDIQDKVTTL YKGSQ LHDTRFCLVTNLT MDSVLVTVKALFSSNLDPSLVEQVFLDKTLNASFWLGS</p>
--	--	--

		TYQLVDIHVTEMESSVYQPTSSSSSTQHFYLNFTITNLPYSQ DKAQP GTTNYQRNKRNIEDALNQLFRNSSIKSYFSDCQVS TFRSVPNRHHTGVDSL CNFSPLARRVDRVAIYEFLRMTR NGTQLQNFTLDRSSVLVDGYSPNRNEPLTGNSDLPFWAVI LIGLAGLLGVITCLICGVLVTTRRRKKEGEYNVQQQCPGY YQSHLDLEDLQ
14	Линкер	DGGGS
15	Линкер	TGEKP
16	Линкер	GRR
17	Линкер	(GGGS) <sub>n</sub> , где n = 1, 2, 3, 4 или 5
18	Линкер	EGKSSGSGSESKVD
19	Линкер	KESGSVSSEQLAQFRSLD
20	Линкер	GRRGGGS
21	Линкер	LRQRDGERP
22	Линкер	LRQKDGGSERP
23	Линкер	LRQKD(GGS) <sub>2</sub> ERP
24	Линкер	GGGSGGGGSGGGGS
25	Линкер	GSTSGSGKPGSGEGSTKG
26	Сайт расщепления 2A	LLNFDLLKLAGDVESNPGP
27	Сайт расщепления 2A	TLNFDLLKLAGDVESNPGP
28	Сайт расщепления 2A	LLKLAGDVESNPGP
29	Сайт расщепления 2A	NFDLLKLAGDVESNPGP
30	Сайт расщепления 2A	QLLNFDLLKLAGDVESNPGP
31	Сайт расщепления 2A	APVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
32	Сайт расщепления 2A	VTELLYRMKRAETYCPRLLAHPTEARHKQKIVAPVKQT
33	Сайт расщепления 2A	LNFDLLKLAGDVESNPGP
34	Сайт расщепления 2A	LLAHPTEARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
35	Сайт расщепления 2A	EARHKQKIVAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
36	Сайт расщепления	EXXYXQ(G/S)
37	Сайт расщепления	ENLYFQG
38	Сайт расщепления	ENLYFQS
39	Эктодомен MUC16 человека с меткой тус- тус-his	PGSRKFNTTERVLQGLLRPLFKNTSVGPLYSGCRLTLLRPE KDGEATGVDAICTHRPDP TGPGLDREQLYLELSQLTHSIT ELGPYTLDRDSL YVNGFTHRSSVPTTSTGVVSEEPFTLNFT INNLRYMADMGQPGSLKFNITDNVMQHLLSPLFQRSSLG ARYTGCRVIALRSVKNGAETRVDLLCTYLQPLSGPGLPIK

		<p>QVFHEL SQTHGITRLGPYSLDKDSL YLNGYNEPGPDEPP                  TTPKPATTFLLPPLSEATTAMGYHLKTLTLNFTISNLQYSPD                  MGKGSATFNSTEGVLQHLLRPLFQKSSMGPFFYLGCQLISL                  RPEKDGAATGVDTTCTYHPDPVGPGLDIQQLYWELSQLT                  HGVTQLGFYVLDLDRDSLFINGYAPQNL SIRGEYQINFHIVN                  WNLSNPDPPTSSEYITLLRDIQDKVTTL YKGSQ LHDTRFCL                  VTNLTMDSVLVTVKALFSSNLDPSLVEQVFLDKTLNASFH                  WLGSTYQLVDIHVTEMESSVYQPTSSSSTQHFYLNFTITNL                  PYSQDKAQP GTTNYQRNKRNIEDALNQLFRNSSIKSYFSD                  CQVSTFRSVPNRHHTGVDSL CNFSPLARRVDRVAIYEFL                  RMTRNGTQLQNFTLDRSSVLVDGYSPNRNEPLTGNSDLP                  EQKLISEEDLGGEQKLISEEDLHHHHH</p>
<p>40</p>	<p>Полипептид                  MUC16 без                  выпуклости                  (CA125)</p>	<p>MLKPSGLPGSSSPTRSLMTGSRSTKATPEMDSGLTGATLS                  PKTSTGAIVVTEHTLPFTSPDKTLASPTSSVVGRTTQSLGV                  MSSALPESTRGMTHSEQRTSPSLSPQVNGTPSRNYPATS                  MVSGLSSPRTRTSSTEGNFTKEASTYTLTVETSGPVTEKY                  TVPTETSTTEGDSTETPWDTRYIPVKITSPMKTFADSTASK                  ENAPVSMTPAETTVDSTHPGRTPNPSFGTL YSSFLDLSPKG                  TPNSRGETSLELILSTTGYPFSSPEPGSAGHSRISTSAPLSSS                  ASVLDNKISETSIFSGQSLTSP LSPGVPEARASTMPNSAIPF                  SMTLSNAETSAERVRSTISSLGTPSISTKQTAETILTFHAF                  ETMDIPSTHIAKTLASEWLGSPGTLGGTST SALTTTSPSTT                  LVSEETNTHHSTSGKETEGTLNTSMTPLETSAPGEESEMT                  ATL VPTLGF TTLDSKIRSPSQVSSSHPTRELRTTGSTSGRQS                  SSTA AHGSSDILRATTSSTSKASSWTSESTAQQFSEPQHTQ                  WVETSPSMKTERPPASTSVAAPITTSVPSVVS GF TTKTSS                  TKGIWLEETSADTLIGESTAGPTTHQFAVPTGISMTGGSST                  RGSQGTTHLLTRATASSETSADLTLATNGVPVSVSPAVSK                  TAAGSSPPGGTKPSYTMVSSVIPETSSLQSSAFREGTSLGL                  TPLNTRHPFSSPEPDSAGHTKISTSIPL LSSASVLEDKVSAT                  STF SHHKATSSITGTPEISTKTKPSSAVLSSMTLSNAATSP                  ERVRNATSPLTHPSPSGEETAGSVLTLSTSAETDSPNIHPT                  GTLTSESESPSTLSLPSVSGVKTTFSSSTPSTHLFTSGEETE                  ETSNPSVSQPETS VSRVRTLASTSVPTPVFPTMDTWPTRS                  AQFSSSHLVSELRATSSTSVTNSTGSALPKISHLTGTATMS                  QTNRDTFNDSAAPQSTTWPETS PRFKTGLPSATTTVSTSA                  TSLSATVMVSKFTSPATSSMEATSIREPSTILT TETTNGPG                  SMAVASTNIPIGKGYITEGRLDTSHLPIGTTASSETSMDFT                  MAKESVMSVSPSQSMDAAGSSTPGRTSQFVDTFSDDVY                  HLTSREITIPRDGTSSALTPQMTATHPPSPDPGSARSTWLGI                  LSSSPSSPTPKVTMSSTFSTQRVT TSMIMDTVETSRWNMP                  NLPSTTSLTPSNIPTSGAIGKSTLVPLDTPSPATSLEASEGG                  LPTLSTYPESTNTPSIHLGAHASSESPSTIKLTMASVVKPGS                  YTPLTFPSIETHIHVSTARMAYSSGSSPEMTAPGETNTGST                  WDPTTYITTTDPKDTSSAQVSTPHSVRTLRTTENHPKTES                  ATPAA YSGSPKISSPNLTSPATKAWTITDTTEHSTQLHYT                  KLAEKSSGFETQSAPGPVSVVIPTSP TIGSSTLELTS DVPGE                  PLVLAPSEQTITLPMATWLSTSLTEEMASTDLDISSPSSP                  MSTFAIFPPMSTPSHELKSEADTSAIRNTDSTTL DQHLGIR                  SLGRTGDLTTVPITPLTTTWTSVIEHSTQAQD TLSATMSPT</p>

		<p>HVTQSLKDQTSIPASASPSHLTEVYPELGTQGRSSSEATTF WKPSTDTLSREIETGPTNIQSTPPMDNTTGGSSSSGVTGLGIA HLPIGTSSPAETSTNMALERRSSTATVSMAGTMGLLVTSA PGRSISQSLGRVSSVLSESTTEGVTDSSKGSSPRLNTQGNT ALSSSLEPSYAEGSQMSTSIPLTSSPTTPDVEFIGGSTFWTK EVTVMVMTSDISKSSARTESSSATLMSTALGSTENTGKEKL RTASMDLPSPTPSMEVTPWISLTLNAPNTTDSLDSLHGV HTSSAGTLATDRSLNTGVTRASRENGSDTSSKSLSMGNS THTSMTYTEKSEVSSSIHPRPETSAPGAETTLTSTPGNRAIS LTLPFSSIPVEEVISTGITSKPDINSAPMTHSPITPPTIVWTST GTIEQSTQPLHAVSSEKVSQVQSTPYVNSVAVSASPTHE NSVSSGSSSTSSPYSSASLESLDSTISRRNAITSWLWDLTSSL PTTTWPSTSLSEALSSGHSVSNPSSSTTEFPLFSAASTSAA KQRNPETETHGPQNTAASTLNTDASSVTGLSETPVGASISS EVPLPMAITSRSDVSGLTSESTANPSLGTASSAGTKLTRTIS LPTSESLVFRMNKDPWTVSIPLGSHPTTNTETSIPVNSAG PPGLSTVASDVIDTPSDGAESIPTVSFSPSPDTEVTTISHFPE KTTHSFRTISSLTHELTSRVTPIPGDWMSSAMSTKPTGASP SITLGERRTITSAAPTTSPIVLTASFSTSTVSLDNETTVKTS DILDARKTNELPSDSSSSSDLINTSIASSTMDVTKTASISPTS ISGMTASSPSSLFSSDRPQVPTSTTETNTATSPSVSSNTYSL DGGSNVGGTPSTLPPFTITHPVETSSALLAWSRPVRTFTSM VSDTASGENPTSSNSVVTSPVAPGTWTSVGGSTTDLAMP FLKTSPAGEAHSLLASTIEPATAFTPHLSAAVVTGSSATSE ASLLTTSSEKAIHSSPQTPTTPTSGANWETSATPESLLVVT ETSDTTLTSKILVTDILFSTVSTPPSKFPSTGTLGASFP LPDTPAIPLTATEPTSSLATSFDSTPLVTIASDSLGTVPETTL TMSETSNGDALVLKTVSNPDRSIPGITIQGVTESPLHPSSTS PSKIVAPRNTTYEGSITVALSTLPAGTTGSLVFSQSSENSET TALVDSSAGLERASVMPLTTGSQGMASGGIRSGSTHSTG TKTFSSLPLTMNPGEVTAMSEITNRLTATQSTAPKGIPVK PTSAESGLLTPVSASSSPSKAFASLTAPPTWGPQSTLTFE FSEVPSLDTKSASLPTPGQSLNTIPDSDASTASSLSKSPEK NPRARMMTSTKAISASSFQSTGFTETPEGSASPSMAGHEP RVPTSGTGDPRYASESMSYPDPKASSAMTSTSLASKLTT LFSTGQAARSGSSSSPISLSTEKETSFLSPTASTSRKTSFLG PSMARQPNILVHLQTSALTLSPSTLNMSQEEPELTSSQTI AEEEGTTAETQTLTFTPSETPTSLLPVSSPTEPTARRKSSPE TWASSISVPAKTSLVETTDGTLVTTIKMSSQAAQGNSTWP APAEETGSSPAGTSPGSPPEMSTTLKIMSSKEPSISPEIRSTVR NSPWKTPETTVPMETTVEPVTLQSTALGSGSTSISHLPTGT TSPTKSPTEMLATERVSLSPSPEAWTNLYSGTPGGTRQ SLATMSSVSLESPTARSITGTGQSSPELVSKTTGMEFSM WHGSTGGTTGDTHVSLSTSSNILEDPVTPNSVSSLTDKSK HKTETWVSTTAIPSTVLNNKIMAAEQQTSRSVDEAYSSTS SWSDQTSKSDITLGASPDVTNTLYITSTAQTSLVSLPSGD QGITSLTNPSGGKTSSASSVTSPSIGLETLRANVSAVKSDIA PTAGHLSQTSSPAEVSILDVTTAPTGPSTTTITMGNTSISTT TPNPEVGMSTMDSTPATERRTTSTEPSTWSSTAASDSWT VTDMTSNLKVARSPTISTMHTTSFLASSTELDSMSTPHG</p>
--	--	--

		<p>RITVIGTSLVTPSSDASAVKTETSTERTLSPSDTTASTPIST FSRVQRMSISVPDILSTSWTPSSTEAEDVPVSMVSTDHAST KTDPNTPLESTFLFDSLSTLDWDTGRSLSSATATTSAPQGAT TPQELTLETMISPATSQLPFSIGHITSAVTPAAMARSSGVTF SRPDPTSKKAEQTSTQLPTTTSAHPGQVPRSAATTLDVIPH TAKTPDATFQRQGQTALTTEARATSDSWNEKEKSTPSAP WITEMMNSVSEDTIKEVTSSSSVLRTLNLTLDINLESGTTSS PSWKSSPYERIAPSESTTDKEAIHPSTNTVETTGWVTSSEH ASHSTIPAHSASSKLTSPVVTSTREQAIVSMSTTTWPEST RARTEPNSFLTIELRDVSPYMDTSSTTQTSIISSPGSTAITKG PRTEITSSKRISSEFLAQSMRSDSPSEAITRLSNFPAMTESG GMILAMQTSPPGATSLSAPTLDTSATASWTGTPLATTQRF TYSEKTTLFSKGPEDTSQPSPPSVEETSSSSSLVPIHATTSPS NILTSQGHSPSSTPPVTSVFLSETSGLGKTTDMSRISLEPG TSLPPNLSSTAGEALSTYEASRDTKAIHHSADTAVTNMEA TSSEYSPIPGHTKPSKATSPLVTSHIMGDITSSTSVFGSSETT EIETVSSVNQGLQERSTSQVASSATETSTVITHVSSGDATT HVTKTQATFSSGTSISSPHQFITSTNTFTDVSTNPSTSLIMT ESSGVTTITTQTGPTGAATQGPYLLDTSTMPYLTTETPLAVTP DFMQSEKTTLISKGPKDVSWTSPPSVAETSYPPSSLTPFLVT TIPPATSTLQGQHTSSPVSATSVLTSGLVKTTDMLNTSMEP VTNSPQNLNPSNEILATLAATTDIETIHPSINKAVTNMGT ASSAHVLHSTLPVSSEPSTATSPMVPASSMGDALASISIPG SETTDIEGEPTSSLTAGRKENSTLQEMNSTTESNILSNVSV GAITEATKMEVPSFDATFIPTPAQSTKFPDIFSVASSRLSNS PPMTISTHMTTTQTGSSGATSKIPLALDTSTLETSAGTPSV VTEGFAHSKITTAMNNDVKDVSQTNPPFQDEASSPSSQAP VLVTTLPSSVAFTPQWHSTSSPVMSSVLTSSLVKTAGKV DTSLETVTSSPQSMSNTLDDISVTSAAATTDIETTHPSINTVV TNVGTGSAFESHSTVSAYPEPSKVTSPNVTTSTMEDTTIS RSIPKSSKTRTETETTSSLTPKLRETSISQEITSSSTETSTVPY KELTGATTEVSRDVTSSSSTSFPGPDQSTVSLDISTETNTR LSTSPIMTESAEITITTQTGPHGATSQDTFTMDPSNTPQA GIHSAMTHGFSQLDVTTLMRIPQDVSWTSPPSVDKTSSPS SFLSSPAMTTPSLISSTLPEDKLSPPMTSLLTSGLVKITDILR TRLEPVTSSLPNFSSTSDKILATSKDSKDTKEIFPSINTEETN VKANNSGHESHSPALADSETPKATTQMVITTTVGDPAPOST SMPVHGSSSETTNIKREPTYFLTPRLRETSTSQESSFPTDTSF LLSKVPTGTITEVSSTGVNSSSKISTPDHDKSTVPPDTFTGE IPRVFTSSIKTKSAEMTITTQASPPESASHSTLPLDTSTTLSEQ GGTHSTVTQGFYSEVTTLMGMGPGNVSWMTTPPVEETS SVSSLMSSPAMTSPSPVSSTSPQSIPSSPLPVTALPTSVLVT TDVLGTTSPESVTSSPPNLSSITHERPATYKDTAHTEAAMH HSTNTAVTNVGTSGSGHKSQSSVLADSETSKATPLMSTTS TLGDTSVSTSTPNISQTNQIQTEPTASLSPRLRESSTSEKTSS TTETNTAFSYVPTGAITQASRTEISSRSTISIDLDRPTIAPDI STGMITRLFTSPIMTKSAEMTVTTQTTTPGATSQGILPWDT STTLFQGGTHSTVSQGFPHSEITTLRSRTPGDVSWMTTPPV EETSSGFSLMSPSMTSPSPVSSTSPESIPSSPLPVTALLTSVL VTTTNVLGTTSPPEPVTSSPPNLSSPTQERLTTYKDTAHTEA</p>
--	--	---

		<p>MHASMHTNTAVANVGTSISGHESQSSVPADSHTSKATSP MGITFAMGDTSVSTSTPAFFETRIQTESTSSLIPGLRDTRTS EEINTVTETSTVLSEVPTTTTTEVSRTEVITSSRRTISGPDHS KMSPYISTETITRLSTFPFVTGSTEMAITNQTGPIGTISQATL TLDTSSASWEGTHSPVTQRFPHSEETTTMSRSTKGVSWQ SPPSVEETSSPSSPVPLPAITSHSSLYSAVSGSSPTSALPVTS LLTSGRRKTIDMLDTHSELVTSSLPSASSFSGEILTSEASTN TETIHFSENTAETNMGTTNSMHKLHSSVSIHSQPSGHTPPK VTGSMMEDAIVSTSTPGSPETKNVDRDSTSPLPELKEDST ALVMNSTTESNTVFSSVSLDAATEVSRAEVTYYDPTFMP ASAQSTKSPDISPEASSHSNSPPLTISTHKTIATQTGPPSGVT SLGQLTLDSTIATSAGTPSARTQDFVDSETTSMNNDLN DVLKTSFSAEANSLSQAPLLVTTSPSPVTSTLQEHSTSS LVSVTSVPTPLAKITDMDTNLEPVTRSPQNLRLNLATSE ATTDHTMHPSINTAVANVGTTSSPNEFYFTVSPDSDPYK ATS AVVITSTSGDSIVSTSMPRSSAMKKIESETTFLIFRLR ETSTSQKIGSSSDTSTVFDKAFTAATTEVSRTELTSRRTSI QGTEKPTMSPDTSTRSVTMLSTFAGLTKSEERTIATQTGP HRATSQGLTWDTSITTSQAGTHSAMTHGFSQLDLSTLTS RVPEYISGTSPSVEKTSSSSSLLSLPAITSPSPVPTTLPESRP SSPVHLTSLPTSLVKTTDMLASVASLPPNLGSTSHKIPTT SEDIKDTEKMYPSTNIAVTNVGTTTSEKESYSSVPAYSEPP KVTSPMVTSFNIRDITIVSTSMPGSSEITRIEMESTFLAHGL KGTSTSQDPIVSTEKSAVLHKLTTGATETSRTEVASSRRTS IPGPDHSTESPDISTEVIPSLPISLGITESSNMTHITRTGPPLGS TSQGTFTLDTPTTSSRAGTHSMATQEFPHSEMTTVMNKDP EILSWTIPPSIEKTSFSSSLMPSPAMTSPPVSSTLPKTIHTPS PMTSLLTPSLVMTTDTLGTSPPEPTTSSPPNLSSTSHEILTTD EDTTAIEAMHPSTSTAATNVETTSSGHGSQSSVLADSEKT KATAPMDTTSTMGHITVSTSMSVSSETTKIKRESTYSLTP GLRETSISQNASFSTDTSIVLSEVPTGTTAEVSRTEVTSSGR TSIPGPSQSTVLPEISTRMTMLRFASPTMTESAEMTIPTQTG PSGSTSQDTLTLDTSTTKSQAKTHSTLTQRFPHSEMTTLM SRGPGDMSWQSSPSLENPSSLPSLLSLPATTSPPISSTLPV TISSSPLPVTSLLTSSPVTTTDMMLHTSPELVTSSPPKLSHTSD ERLTTGKDTTNTA AVHPSTNTAASNVEIPSSGHESPSSALA DSETSKATSPMFITSTQEDTTVAISTPHFLETSRIQKESISL SPKLRETGSSVETSSAIETSAVLSEVSIGATTEISRTEVTSSS RTSISGSAESTMLPEISTTRKIIKFPTSPILAESSEMTIKTQTS PPGSTSESTFTLDTSTTPSLVITHSTMTQRLPHSEITTLVSR GAGDVPRPSSLPVEETSPPSSQLSLSAMISPSPVSSTLPASS HSSASVTSLLTPGQVKTTTEVLDASAEPETSSPPSLSSTSVE ILATSEVTTDTEKIHPSNTAVTKVGTSSSGHESPSSVLPDS ETTKATSAMGTISIMGDTSVSTLTPALSNTRKIQSEPASSLT TRLRETSTSEETSLATEANTVLSKVSTGATTEVSRTEAISFS RTSMSGPEQSTMSQDISIGTIPRISASSVLTESAKMTITTQT GPSESTLESTLNLNTATTPSWVETHSIVIQGFHPPEMTTSM GRGPGGVSWPSPFVKETSPSSPLSLPAVTSHPVSTTFL AHIPPSPLPVTSLLTSGPATTTDILGTSTEPGTSSSSSLSTTS HERLTTYKDTAHTA AVHPSTNTGGTNVATTSSGYKSQSS</p>
--	--	--

		<p>VLADSSPMCTTSTMGDTSVL TSTPAFLETRRIQTELASLT PGLRESSGSEGTSSTGKMSVLSKVPTGATTEISKEDVTSIP GPAQSTISPDISTRVSWFSTSPVMTESAEITMNTHTSPLG ATTQGTSTLDTSSSTSLTMTHSTISQGFSSQMSLMMRRGP EDVSWMSPPLLEKTRPSFSLMSSPATTSPSPVSSTLPESISS SPLPVTSLLTSGLAKTTDMLHKSSEPVTNSPANLSSTSVEI LATSEVTTDTEKTHPSSNRTVTDVGTSSSGHESTSFVLADS QTSKVTSPMVITSTMEDTSVSTSTPGFFETSRIQTEPTSSLT LGLRKTSSSEGTSLATEMSTVLSGVPTGATAEVS RTEVTSS SRTSISGFAQLTVSPETSTETITRLPTSSIMTESAEMMIKTQ TDPPGSTPESTHTVDISTTPNWVETHSTVTQRF SHSEM TTL VSRSPGDMLWPSQSSVEETSSASSLLSLPATTSPSPVSSTL VEDFPSASLPVTSLNPNGLVITDRMGISREPGTSSTSNLSS TSHERLTTLEDTVDTEDMQPSTHTAVTNVRTSISGHESQS SVLSDSETPKATSPMGTTYTMGETSVSISTSDFFETSRIQIE PTSSLTSGLRETSSSERISSATEGSTVLSEVPSGATTEVSRT EVISSRGTSMSGPDQFTISPDISTEAITRLSTSPIMTESAESAI TIETGSPGATSEGTLTLDSTTTTFWSGTHSTASPGFSSHSEM TTLMSRTPGDVPWPSLPSVEEASSVSSSLSPAMTSTSFSS TLPESISSSPHPVTALLTLGPVKTTDMLRTSSEPETSSPNL SSTSAEILATSEVTKDREKIHPSNTPVNVGTVIYKHLSPS SVLADLVTTKPTSPMATTSTLGNTSVSTSTPAFPETMMTQ PTSSLTSGLREISTSQETSSATERSASLSGMPTGATTKVSR EALSLGRTSTPGPAQSTISPEISTETITRISTPLTTTGS AEMTI TPKTGHSGASSQGTFTLDTSSRASWPGTHSAAATHRSPHSG MTTPMSRGPEDVSWPSRPSVEKTSPPSSLVSLSAVTPSPPL YSTPSESSHSSPLRVTSLFTPVMMKTTDMLDTSLEPVTTSP PSMNITSDESLATSKATMETEAIQLSENTAVTQMGTISAR QEFYSSYPGLPEPSKVTSPVVTSSSTIKDIVSTTIPASSEITRIE MESTSTLTPTPRETSTSQEIHSATKPSTVPYKALTSATIEDS MTQVMSSSRGSPDQSTMSQDISTEVITRLSTSPIKTESTE MTITTQTGSPGATSRGTLTLDSTTFMSGTHSTASQGFSSHS QMTALMSRTPGDVPWLSHPSVEEASSASFSLSPVMTSSS PVSSTLPDSIHSSSLPVTSLLTSGLVKTELLGTSSEPETSSP PNLSSTSAEILAITVTTDTEKLEMTNVVTSGYTHESPSSV LADSVTTKATSSMGITYPTGDTNVL TSTPAFSDTSRIQTKS KLSLTPGLMETSISEETSSATEKSTVLSSVPTGATTEVSRTE AISSRRTSIPGPAQSTMSSDTSMETITRISTPLTRKESTDMAI TPKTGPSGATSQGTFTLDSSTASWPGTHSATTQRF PQSV VTPMSRGPEDVSWPSPLSVEKNSPSSLVSSSVTSPSPPL YSTPSGSSHSSPPVVTSLFTSIMMKATDMLDASLEPETTSA PNMNITSDESLAASKATTETEAIHVFENTAASHVETTSATE ELYSSSPGFSEPTKVISPVVTSSSIRDNMVSTTMPGSSGITRI EIESMSSLTPGLRETRTSQDITSSSTETSTVL YKMPSGATPEV SRTEVMPSRRTSIPGPAQSTMSLDISDEVVTRLSTSPIMTES AEITITTQTGYSLATSQVTLPLGTSMTFLSGTHSTMSQGLS HSEMTNLMSRGPESLSWTS PRFVETTRSSSSLTSLPLTTSL SPVSSTLDDSSPSSLPVTSLILPGLVKTTTEVLDTSSEPKTSS SPNLSSTSVEIPATSEIMTDTEKIHPSNTAVAKVRTSSSVH ESHSSVLADSETTITIPSMGITS AVDDTTVFTSNPAFSETRRI</p>
--	--	--

		<p>PTEPTFSLTPGFRETSTSEETTSITETS AVLYGVPTSATTEVS MTEIMSSNRIHIPDSDQSTMSPDIITEVITRLSSSSMMSEST QMTITTQKSSPGATAQSTLTLATTTAPLARHSTVPPRFLH SEM TTLMSRSPENPSWKSSLFVEKTSSSSSLLSLPVTTSPSV SSTLPQSIPSSSFVTSLLTPGMVKTTDTSTEPGTSLSPNLS GTSVEILAASEVTTDTEKIHPSMAVTNVGTTSSGHELYS SVSIHSEPSKATYPVGTSSMAETSISTSM PANFETTGF EAE PFSHLTSGFRKTNMSLDTSSVTPTNTPSSPGSTHLLQSSKT DFTSSAKTSSPDWPPASQYTEIPVDIITPFNASPSITESTGITS FPESRFTMSVTESTHHLSTDLLPSAETISTGTVMPSSLSEAM TSFATTGVPRAISGSGSPFSRTESGPGDATLSTIAESLPSSTP VPFSSSTFTTTDSS TIPALHEITSSSATPYRVDTS LGTESST EGRLVMVSTLDTSSQPGR TSSSPILDTRM TESVELGTVTSA YQVPSLSTRLTRTDGIMEHITKIPNEAAHRGTIRPVKGPQT STSPASP KGLHTGGTKRMETTTTALKTTTTALKTTSRATL TTSVYPTLGLTLPLNASMQMASTIPTEMMITTPYVFPDV PETTSSLATSLGAETSTALPRTTPSVFNRESETTASLVSRSG AERSPV IQTLDVSSSEPDTTASWVIHPAETIPTVSKTTPNFF HSELDTVSSTATSHGADVSSAIPTNISPSELDAL TPLVTISG TDTSTTFPTLTKSPHETETRTTWLTHPAETSSTIPRTIPNFS HHESDATPSIATSPGAETSSAIPIMTVSPGAEDLVTSQVTSS GTD RNMTIPTLTLSPGEPKTIASLVTHPEAQTSSAIPTSTISP AVSRLVTSMVTS LAAKTSTTNRALTNSPGEPATTVSLVTH PAQTSPTVPWTT SIFFHSKSDTTPSMTTSHGAESS SAVPTP TVSTEVPGVV TPLVTSSRAVISTTIPILTLSPGEPETTPSMAT SHGEEASSAIPTPTVSPGVPGVV TSLVTSSRAVTSTTIPILTF SLGEPETTPSMATSHGTEAGSAVPTVLPEVPGMV TSLVAS SRAVTSTLPTLTLSPGEPETTPSMATSHGAEASSTVPTVS PEVPGVV TSLVTSSSGVNSTSIPTLILSPGELETTPSMATSH GAEASSAVPTPTVSPGVSGVV TPLVTSSRAVTSTTIPILTL S SSEPETTPSMATSHGVEASSAVLTVSPEVPGMV TSLVTSSR AVTSTTIPTLTISSDEPETTTSLVTHSEAKMISAIPTLAVSPT VQGLVTSLVTSSGSETSAFNLTVASSQPETIDSWVAHPGT EASSVVPTLTVSTGEPFTNISLVTHPAESSSTLPRTTSRF SH SELDTMPSTVTSPEAESSAISTTISPGIPGVL TSLVTSSGRD ISATFPTVPESPHSEATASWVTHPAVTSTTVPRTPPNYSH SEPDTTPSIATSPGAEATSDFPTITVSPDVPDMVTSQVTSSG TDTSIPTLTLSSGEPETTTSFITYSEHTSSAIPTLPVSPGA SKMLTSLVISSGTDSTTFPTLTETPYEPETTAIQLIHPAET NTMVPRTTPKF SHSKSDTTLPVAITSPGPEASSAVSTTTISP DMSDLVTSLVPSSGTDSTTFPTLSETPYEPETTATWLTHP AETSTTVSGTIPNF SHRGSDTAPSMV TSPGVDTRSGVPTTT IPPSIPGVVTSQVTSSATDTSTAIPTLTPSPGEPETTASSATH PGTQTGFTVPIRTVPSSEPDTMASWVTHPPQTSTPVSR TTS SFSHSPDATPVMATSPRTEASSAVLTTISPGAPEMVTSQIT SSGAATSTTVPTLTHSPGMPETTALLSTHPR TETS KTFPAS TVFPQVSETTASLTIRPGAETSTALPTQTSSSLFLLVTGTS RVDLSPTASPGVSAKTAPLSTHPGTETSTMIPTSTLSLGLL ETTGLLATSSSAETSTSTLTLTVSPA VSGLSSASITTDKPQT VTSWNTETSPSVTSVGPPEFSRTVTGTTMTLIPSEMPTPK</p>
--	--	---

		<p>TSHGEGVSPTTILRTTMVEATNLATTGSSPTVAKTTTTFNT  LAGSLFTPLTPGMSTLASESVTSRSTSYNHRSWISTTSSYN  RRYWTPATSTPVTSTFSPGISTSSIPSSTAATVPMFVPFTLN  FTITNLQYEEDMRHPGSRKFNATERELQGLLKPLFRNSSL  EYLYSGCRLASLRPEKDSSATAVDAICTHRPDPEDLGLDR  ERLYWELSNLTNGIQELGPYTLDRNSLYVNGFTHRSSMPT  TSTPGTSTVDVGTSGTPSSSPSPTTAGPLLMPFTLNFTITNL  QYEEDMRRTGSRKFNTMESVLQGLLKPLFKNTSVGPLYSG  GCRLTLLRPEKDGAATGVDAICTHRLDPKSPGLNREQLY  WELSKLTNDIEELGPYTLDRNSLYVNGFTHQSSVSTTSTP  GTSTVDLRTSGTPSSLSSPTIMAAGPLLVPFTLNFTITNLQY  GEDMGHPGSRKFNTTERVLQGLLGPIFKNTSVGPLYSGCR  LTSLRSEKDGAATGVDAICIHHLDPKSPGLNRERLYWELS  QLTNGIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHRTSVPTSSTPGTSTV  DLGTSGTPFSLPSPATAGPLLVLFTLNFTITNLKYEEDMHR  PGSRKFNTTERVLQTLGPMFKNTSVGLLYSGCRLTLLRS  EKDGAATGVDAICTHRLDPKSPGVDREQLYWELSQLTNG  IKELGPYTLDRNSLYVNGFTHWIPVPTSSTPGTSTVDLGSG  TPSSLPSPTTAGPLLVPFTLNFTITNLKYEEDMHCPGSRKF  NTTERVLQSLGPMFKNTSVGPLYSGCRLTLLRSEKDGA  TGVDAICTHRLDPKSPGVDREQLYWELSQLTNGIKELGPY  TLDRNSLYVNGFTHQTSAPNTSTPGTSTVDLGTSGTPSSLP  SPTSAGPLLVPFTLNFTITNLQYEEDMHHPGSRKFNTTERV  LQGLLGPMFKNTSVGLLYSGCRLTLLRPEKNGAATGMDA  ICSHRLDPKSPGLNREQLYWELSQLTHGIKELGPYTLDRN  SLYVNGFTHRSSVAPTSTPGTSTVDLGTSGTPSSLPSPTTA  VPLLVPFTLNFTITNLQYGEDMRHPGSRKFNTTERVLQGL  LGPLFKNSSVGPLYSGCRLISLRSEKDGAATGVDAICTHH  LNPQSPGLDREQLYWQLSQMTNGIKELGPYTLDRNSLYV  NGFTHRSSGLTTSTPWTSTVDLGTSGTPSPVPSPTTTGPLL  VPFTLNFTITNLQYEENMGHPGSRKFNTESVLQGLLKPLF  KSTSVGPLYSGCRLTLLRPEKDGVA TRVDAICTHRPDPKIP  GLDRQQLYWELSQLTHSITELGPYTLDRDSL YVNGFTQRS  SVPTTSTPGTFTVQPETSETPSSLPGPTATGPVLLPFTLNFTI  TNLQYEEDMRRPGSRKFNTTERVLQGLLMPLFKNTSVSSL  YSGCRLTLLRPEKDGAATRVDVCTHRPDPKSPGLDRER  LYWKLSQLTHGITELGPYTLDRHSLYVNGFTHQSSMTTTR  TPDTSTMHLATSRTPASLSGPMTASPLLVLFTINFTITNLR  YEENMHHPGSRKFNTTERVLQGLLRPVFKNTSVGPLYSG  CRLTLLRPKKDGAATKVDAICTYRPDPKSPGLDREQLYW  ELSQLTHSITELGPYTLDRDSL YVNGFTQRSSVPTTSIPGTP  TVDLGTSGTPVSKPGPSAASPLLVLFTLNFTITNLRYEENM  QHPGSRKFNTTERVLQGLLRSLFKSTSVGPLYSGCRLTLL  RPEKDGTATGVDAICTHHPDPKSPRLDREQLYWELSQLT  HNITELGPYALDNDSLFVNGFTHRSSVSTTSTPGTPTVYLG  ASKTPASIFGPSAASHLLILFTLNFTITNLRYEENMW</p>
<p>41</p>	<p>CDRL1 антитела  против MUC16  7135</p>	<p>QSISY</p>

42	CDRL2 антитела против MUC16 7135	AAS
43	CDRL3 антитела против MUC16 7135	QQSYSTPPIT
44	CDRH1 антитела против MUC16 7135	GFTFSYHE
45	CDRH2 антитела против MUC16 7135	IGSRGTTK
46	CDRH3 антитела против MUC16 7135	ASEVGSILGYSMDV
47	Вариабельная область легкой цепи антитела против MUC16 7135	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK
48	Вариабельная область тяжелой цепи антитела против MUC16 7135	EVQLVESGGGLVQAGGSLRSLCAASGFTFSYHEMNWVRQAPGKGLEWVSYIGSRGTTKHYADPVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASEVGSILGYSMDVWGQGT TVTVSS
49	pBB4000 CAR, АК последовательность без сигнального пептида	EVQLVESGGGLVQAGGSLRSLCAASGFTFSYHEMNWVRQAPGKGLEWVSYIGSRGTTKHYADPVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASEVGSILGYSMDVWGQGT TVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRGKGDHGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
50	pBB4000 CAR, АК последовательность с сигнальным пептидом	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQAGGSLRSLCAASGFTFSYHEMNWVRQAPGKGLEWVSYIGSRGTTKHYADPVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASEVGSILGYSMDVWGQGT TVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKTTTPAPRPPTPAPT

		IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAG TCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEE DGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYN ELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGDL YQGLSTATK DTYDALHMQALPPR
51	pBB4001 CAR, AK последовательность без сигнального пептида	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKP GKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPED FATYYCQQSYSTPPITFGQGRLEIKGGGGSGGGGSGGGG SEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFSYHEMNWVR QAPGKGLEWVSYIGSRGTTKHYADPVKGRFTISRDAKNSL SLYLQMNSLRRAEDTAVYYCASEVGSILGYSMDVWGQGT TVTVSSTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKK LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFS RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR RGKGHGDL YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
52	pBB4001 CAR, AK последовательность с сигнальным пептидом	MALPVTALLLPLALLHAARPDIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS RFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQG TRLEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSL RLSCAASGFTFSYHEMNWVRQAPGKGLEWVSYIGSRGTT KHYADPVKGRFTISRDAKNSL YLQMNSLRRAEDTAVYYC ASEVGSILGYSMDVWGQGT TVTVSSTTPAPRPPTPAPTIA SQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTC GVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG CSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL NLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNEL QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGDL YQGLSTATKDT YDALHMQALPPR
53	CDRL1 антитела против MUC16 7138	QSISSY
54	CDRL2 антитела против MUC16 7138	AAS
55	CDRL3 антитела против MUC16 7138	QQSYSTPPIT
56	CDRH1 антитела против MUC16 7138	GYTFTSSD

57	CDRH2 антитела против MUC16 7138	MNPNYGYT
58	CDRH3 антитела против MUC16 7138	ARVTYCSSLTSCFRPFTY
59	Вариабельная область легкой цепи антитела против MUC16 7138	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKP GKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLT TISSLQPED FATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK
60	Вариабельная область тяжелой цепи антитела против MUC16 7138	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSSDINWVRQ ATGQGLEWVGWMNPNYGYTGSARKFQDRVTMTRNTSL STAYLELHSLRSEDTAVYYCARVTYCSSLTSCFRPFTYWG QGTLVTVSA
61	pBB4002 CAR, АК последовательность без сигнального пептида	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSSDINWVRQ ATGQGLEWVGWMNPNYGYTGSARKFQDRVTMTRNTSL STAYLELHSLRSEDTAVYYCARVTYCSSLTSCFRPFTYWG QGTLVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASV GDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFLT TISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPI TFGQGTRLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA AGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKR GRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
62	pBB4002 CAR, АК последовательность с сигнальным пептидом	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTSSDINWVRQATGQGLEWVGWMNPNYG YTGSARKFQDRVTMTRNTSLSTAYLELHSLRSEDTAVYY CARVTYCSSLTSCFRPFTYWGQGTLVTVSAGGGGSGGGG SGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNW YQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLT TIS SLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKTTTPAPRPPT PAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAP LAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQ LYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLST ATKDTYDALHMQUALPPR
63	pBB4003 CAR, АК последовательность без сигнального	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKP GKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLT TISSLQPED FATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKGGGGSGGGGSGGGG SQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSSDINWVR QATGQGLEWVGWMNPNYGYTGSARKFQDRVTMTRNTS

	пептида	LSTAYLELHSLRSEDТАVYYCARVTYCSSVTSCFRPFTYW GQGTЛVTVSATTTTPAPRPPTPAPTІASQPLSLRPEACRPAА GGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKR GRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGHGDLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
64	pBB4003 CAR, AK последовательность с сигнальным пептидом	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS RFSGSGSGTDFLTІSSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQG TRLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTSSDINWVRQATGQGLEWVGWMNPNYG YTGSARKFQDRVTMTRNTSLSTAYLELHSLRSEDТАVYY CARVTYCSSVTSCFRPFTYWGQGTЛVTVSATTTTPAPRPPT PAPTІASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAP LAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQ LYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGDLYQGLST ATKDTYDALHMQUALPPR
65	CDRL1 антитела против MUC16 8755	QSINIY
66	CDRL2 антитела против MUC16 8755	AAS
67	CDRL3 антитела против MUC16 8755	QHSYSTPPIT
68	CDRH1 антитела против MUC16 8755	GFTFNDYA
69	CDRH2 антитела против MUC16 8755	IDWNGGSI
70	CDRH3 антитела против MUC16 8755	AKDIGHWNYIGGMDV
71	Вариабельная область легкой цепи антитела против MUC16	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINIYLNWYQQKPG KAPKFLIYAASSLQTVPSRFSGSGSGTDFLTІSSLEPEDF ATYYCQHSYSTPPITFGQGTRLEIK

	8755	
72	Вариабельная область тяжелой цепи антитела против MUC16 8755	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQSPGKGLEWVSGIDWNGGSIDYADSVKGRFTISRDTAKN SLYLQMNSLKVEDTALYYCAKDIGHWNYIGGMDVWGQ GTTVTVSS
73	pBB4004 CAR, АК последовательность без сигнального пептида	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQSPGKGLEWVSGIDWNGGSIDYADSVKGRFTISRDTAKN SLYLQMNSLKVEDTALYYCAKDIGHWNYIGGMDVWGQ GTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVG DRVTITCRASQSINIYLNWYQQKPGKAPKFLIYAASSLQT GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSEPEDFATYYCQHSYSTPPIT FGQGTRLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAG GAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGR RKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELR VKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
74	pBB4004 CAR, АК последовательность с сигнальным пептидом	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQSPGKGLEWVSGIDWNGGSIDYADSVKGRFTISRDTAKNSLYLQMNSLKVEDTALYYCAKDIGHWNYIGGMDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINIYLNWYQQKPGKAPKFLIYAASSLQTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSEPEDFATYYCQHSYSTPPITFGQGTRLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
75	pBB4005 CAR, АК последовательность без сигнального пептида	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINIYLNWYQQKPGKAPKFLIYAASSLQTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSEPEDFATYYCQHSYSTPPITFGQGTRLEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQSPGKGLEWVSGIDWNGGSIDYADSVKGRFTISRDTAKN SLYLQMNSLKVEDTALYYCAKDIGHWNYIGGMDVWGQ GTTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGR RKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRV KFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
76	pBB4005 CAR, АК последовательность с сигнальным пептидом	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINIYLNWYQQKPGKAPKFLIYAASSLQTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSEPEDFATYYCQHSYSTPPITFGQGTRLEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGRSL

	пептидом	RLSCAASGFTFNDYAMHWVRQSPGKGLEWVSGIDWNGG SIDYADSVKGRFTISRDTAKNSLYLQMNSLKVEDTALYYC AKDIGHWNYIGGMDVWGQGTTVTVSSTTTPAPRPPTPAP TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLA GTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQE EDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLY NELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTAT KDTYDALHMQUALPPR
77	CDRL1 антитела против MUC16 8767	QSISTY
78	CDRL2 антитела против MUC16 8767	TAS
79	CDRL3 антитела против MUC16 8767	QSYSTPPIT
80	CDRH1 антитела против MUC16 8767	GFTFSNYY
81	CDRH2 антитела против MUC16 8767	ISGRGSTI
82	CDRH3 антитела против MUC16 8767	VKDRGGYSPY
83	Вариабельная область легкой цепи антитела против MUC16 8767	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISTYLNWYQQKP GKAPKLLIYTASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPED FATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK
84	Вариабельная область тяжелой цепи антитела против MUC16 8767	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWVRQ APGKGLEWISYISGRGSTIFYADSVKGRITISRDNKNSLF LQMNSLRAEDTAVYFCVKDRGGYSPYWGQGLVTVSS
85	pBB4006 CAR, AK последовательнос ть без сигнального пептида	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWVRQ APGKGLEWISYISGRGSTIFYADSVKGRITISRDNKNSLF LQMNSLRAEDTAVYFCVKDRGGYSPYWGQGLVTVSSG GGSGGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS QSISTYLNWYQQKPGKAPKLLIYTASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKT

		TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF ACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQP FMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPA YQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHG LYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
86	pBB4006 CAR, AK последовательность с сигнальным пептидом	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVESGGGLVKPGGSL RLSCAASGFTFSNYYMSWVRQAPGKGLEWISYISGRGSTI FYADSVKGRITISRDNKNSLFLQMNSLRAEDTAVYFCVK DRGGYSPYWQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQM TQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISTYLNWYQQKPKAP KLLIYTASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLL LSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCR FPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPR
87	pBB4007 CAR, AK последовательность без сигнального пептида	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISTYLNWYQQKPK GKAPKLLIYTASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKGGGGSGGGGSGGGG SQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWVR QAPGKGLEWISYISGRGSTIFYADSVKGRITISRDNKNSL FLQMNSLRAEDTAVYFCVKDRGGYSPYWQGTLLTVSS TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD FACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQ PFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAP AYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHG GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
88	pBB4007 CAR, AK последовательность с сигнальным пептидом	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQSPSSLSASVGDRV ITICRASQSISTYLNWYQQKPKGKAPKLLIYTASSLQSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQG TRLEIKGGGGSGGGGSGGGGSSQVQLVESGGGLVKPGGSL RLSCAASGFTFSNYYMSWVRQAPGKGLEWISYISGRGSTI FYADSVKGRITISRDNKNSLFLQMNSLRAEDTAVYFCVK DRGGYSPYWQGTLLTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSL RPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLL LSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCR PEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM AEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALH MQALPPR
89	CDRL1 антитела против MUC16	QSINSY

	8794	
90	CDRL2 антитела против MUC16 8794	AAS
91	CDRL3 антитела против MUC16 8794	QQSYSSPPIT
92	CDRH1 антитела против MUC16 8794	GFTFRDYS
93	CDRH2 антитела против MUC16 8794	VTFNSAI
94	CDRH3 антитела против MUC16 8794	AREREPIVGGFDY
95	Вариабельная область легкой цепи антитела против MUC16 8794	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQGGVPSRFSGGGSGTDFTLTITSLQPEDFATFYCQQSYSSPPITFGQGTRLEIK
96	Вариабельная область тяжелой цепи антитела против MUC16 8794	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFRDYSMSWIRQAPGKGLEWVSYVTFNSAIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREREPIVGGFDYWGQGLVTVSS
97	pBB4008 CAR, AK последовательность без сигнального пептида	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFRDYSMSWIRQAPGKGLEWVSYVTFNSAIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREREPIVGGFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQGGVPSRFSGGGSGTDFTLTITSLQPEDFATFYCQQSYSSPPITFGQGTRLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSDAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGRDPEMGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
98	pBB4008 CAR, AK последовательность с сигнальным пептидом	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFRDYSMSWIRQAPGKGLEWVSYVTFNSAIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREREPIVGGFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINSYLNWYQQKPG

		KAPKLLIYAASSLQGGVPSRFSGGGSGTDFTLTITSLQPED FATFYCQQSYSSPPITFGQGTRLEIKTTTPAPRPPTPAPTIA QPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCG VLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELN LGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTY DALHMQUALPPR
99	pBB4009 CAR, AK последовательность без сигнального пептида	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSINSYLNWYQQK GKAPKLLIYAASSLQGGVPSRFSGGGSGTDFTLTITSLQPE DFATFYCQQSYSSPPITFGQGTRLEIKGGGGSGGGGSGGG GSQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFRDYSMSWI RQAPGKGLEWVSYVTFFNDAIYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREREPIVGGFDYWGGT LVTVSSTTPAPRPPTPAPTIAQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRK LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFS RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR RGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
100	pBB4009 CAR, AK последовательность с сигнальным пептидом	MALPVTALLPLALLHAARPDIQMTQSPSSLSASVGDRT TITCRASQSINSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQGGV SRFSGGGSGTDFTLTITSLQPEDFATFYCQQSYSSPPITFGQ GTRLEIKGGGGSGGGGSGGGGSGQVQLVESGGGLVKPGGS LRLSCAASGFTFRDYSMSWIRQAPGKGLEWVSYVTFFN DAIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYY CAREREPIVGGFDYWGGTLVTVSSTTPAPRPPTPAPTIA SQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTC GVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG CSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL NLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDT YDALHMQUALPPR
101	CDRL1 антитела против MUC16 8799	QSITSSY
102	CDRL2 антитела против MUC16 8799	GAS
103	CDRL3 антитела против MUC16 8799	QQYGSSPWT
104	CDRH1 антитела против MUC16	GFAFGDHT

	8799	
105	CDRH2 антитела против MUC16 8799	IRSRAYGGTT
106	CDRH3 антитела против MUC16 8799	TSGGYDSSLHYYYYYYH
107	Вариабельная область легкой цепи антитела против MUC16 8799	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSITSSYLAWYQQRPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK
108	Вариабельная область тяжелой цепи антитела против MUC16 8799	EVQLVESGGGLEQPGRSLRLSCTASGFAFGDHTMSWVRQAPGKGLEWVGFIRSRAYGGTTEYAASVKGRFTISRDDSKSIAYLQMDSLKTEDTAVYYCTSGGYDSSLHYYYYYYHGMDVWGRGTTVTVSS
109	pBB4010 CAR, АК последовательность без сигнального пептида	EVQLVESGGGLEQPGRSLRLSCTASGFAFGDHTMSWVRQAPGKGLEWVGFIRSRAYGGTTEYAASVKGRFTISRDDSKSIAYLQMDSLKTEDTAVYYCTSGGYDSSLHYYYYYYHGMDVWGRGTTVTVSSGGGGSGGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSITSSYLAWYQQRPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGS SPWTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGDL YQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
110	pBB4010 CAR, АК последовательность с сигнальным пептидом	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLEQPGRSLRLSCTASGFAFGDHTMSWVRQAPGKGLEWVGFIRSRAYGGTTEYAASVKGRFTISRDDSKSIAYLQMDSLKTEDTAVYYCTSGGYDSSLHYYYYYYHGMDVWGRGTTVTVSSGGGGSGGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSITSSYLAWYQQRPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGS SPWTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGDL YQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
111	pBB4011 CAR, АК последовательность	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSITSSYLAWYQQRPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGS SPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGGSGGG

	ть сигнального пептида	без	GSEVQLVESGGGLEQPGRSLRLSCTASGFAFGDHTMSWV RQAPGKGLEWVGFIRSRAYGGTTEYAASVKGRFTISRDDS KSIAYLQMDSLKTEDTAVYYCTSGGYDSSLHYYYYYHG MDVWGRGTTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC RPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITL YCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG GCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE IGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPP R
112	pBB4011 AK последовательнос ть с сигнальным пептидом	CAR, AK	MALPVTALLPLALLHAARPEIVLTQSPGTLSPGERAT LSCRASQSITSSYLAWYQQRPQGAPRLLIYGASSRATGIPD RFSGSGSGTDFLTISRLEPFDFAVYYCQQYGSSPWTFGQ GTKVEIKGGGGSGGGGGSGGGGGSEVQLVESGGGLEQPGRS LRLSCTASGFAFGDHTMSWVRQAPGKGLEWVGFIRSAY GGTTEYAASVKGRFTISRDDSKSIAYLQMDSLKTEDTAVY YCTSGGYDSSLHYYYYYHGMDVWGRGTTVTVSSTTTPA PRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMR PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQ GQNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGRDPPEMGGKPRRKN PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQ GLSTATKDTYDALHMQUALPPR
113	CDRL1 против 8804	антитела MUC16	QTVSSSY
114	CDRL2 против 8804	антитела MUC16	GAS
115	CDRL3 против 8804	антитела MUC16	QQYGSSPWT
116	CDRH1 против 8804	антитела MUC16	GLTFGDYG
117	CDRH2 против 8804	антитела MUC16	IRSKGYGGTT
118	CDRH3 против 8804	антитела MUC16	TSGGYDSSVHYYYYYY
119	Вариабельная		EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQTVSSSYLAWYQQPK

	область легкой цепи антитела против MUC16 8804	GQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK
120	Вариабельная область тяжелой цепи антитела против MUC16 8804	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTGSGLTFGDYGMSSWVRQAPGKGLEWVGFIRSKGYGGTTEYAASVKGRFTISRDDSKS TAYLQMNSLKTEDTAVYYCTSGGYDSSVHYYYYYYAM DVWGQGTTVTVSS
121	pBB4012 CAR, АК последовательность без сигнального пептида	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTGSGLTFGDYGMSSWVRQAPGKGLEWVGFIRSKGYGGTTEYAASVKGRFTISRDDSKS TAYLQMNSLKTEDTAVYYCTSGGYDSSVHYYYYYYAM DVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRASQTVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQY GSSPWTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA CRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVIT LYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEE GGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD VLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY SEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALHMQUAL PPR
122	pBB4012 CAR, АК последовательность с сигнальным пептидом	MALPVTALLLPLALLHAARPEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTGSGLTFGDYGMSSWVRQAPGKGLEWVGFIRSKGY GGTTEYAASVKGRFTISRDDSKSTAYLQMNSLKTEDTAV YYCTSGGYDSSVHYYYYYYAMDVWGQGTTVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRASQTVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD FACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQ PFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAP AYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGK PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHG GLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
123	pBB4013 CAR, АК последовательность без сигнального пептида	EIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRASQTVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGG GSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTGSGLTFGDYGMSSWVRQAPGKGLEWVGFIRSKGYGGTTEYAASVKGRFTISRDD SKSTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTSGGYDSSVHYYYYYY AMDVWGQGTTVTVSSSTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVIT LYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEE EGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD VLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY SEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALHMQUAL PPR

124	pBB4013 CAR, АК последовательность с сигнальным пептидом	MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQTVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTGSGLTFGDYGMWVRQAPGKGLEWVGFIRSKGYGGTTEYAASVKGRFTISRDDSKSTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTSGGYDSSVHYYYYYYAMDVWGQGTTVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGDL YQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
125	pBB4014 CAR, АК последовательность без сигнального пептида	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSNYGIHWVRQAPGKGLEWVAVISDDGSFKFYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRVEDSAVYHCAKWQHNWNDGGFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPDTLSLSPGERATLSCRASQSLSSNYLAWYRQKPGQAPRLLIYGISSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGDL YQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
126	pBB4014 CAR, АК последовательность с сигнальным пептидом	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSNYGIHWVRQAPGKGLEWVAVISDDGSFKFYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRVEDSAVYHCAKWQHNWNDGGFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPDTLSLSPGERATLSCRASQSLSSNYLAWYRQKPGQAPRLLIYGISSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGDL YQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
127	CDRL1 антитела против MUC16 8810	QSVSNRY
128	CDRL2 антитела против MUC16 8810	GAS

129	CDRL3 антитела против MUC16 8810	HQYGSSPWT
130	CDRH1 антитела против MUC16 8810	GFTFSSYA
131	CDRH2 антитела против MUC16 8810	ISYNGGTT
132	CDRH3 антитела против MUC16 8810	ARAAAP
133	Вариабельная область легкой цепи антитела против MUC16 8810	EIVLTQSPDTLSLSPGERATLSCRASQSVSNRYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEFAVYYCHQYGSSPWTFGQGTKVEIK
134	Вариабельная область тяжелой цепи антитела против MUC16 8810	EVQLVESGGALVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEFVSTISYNGGTTYADSVKGRFTVSRDNSKNTVFLRMGSLRTEDMAVYYCARAAAPWGQGTLLTVSS
135	pBB4016 CAR, AK последовательность без сигнального пептида	EVQLVESGGALVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEFVSTISYNGGTTYADSVKGRFTVSRDNSKNTVFLRMGSLRTEDMAVYYCARAAAPWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGGSGGGGSEIVLTQSPDTLSLSPGERATLSCRASQSVSNRYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCHQYGSSPWTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
136	pBB4016 CAR, AK последовательность с сигнальным пептидом	MALPVTALLLPLALLHAAARPEVQLVESGGALVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEFVSTISYNGGTTYADSVKGRFTVSRDNSKNTVFLRMGSLRTEDMAVYYCARAAAPWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGGSGGGGSEIVLTQSPDTLSLSPGERATLSCRASQSVSNRYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCHQYGSSPWTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK

		MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
137	pBB4017 CAR, AK последовательность без сигнального пептида	EIVLTQSPDTLSLSPGERATLSCRASQSVSNRYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCHQYGSSPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGSEVQLVESGGALVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEFVSTISYNGGTTYADSVKGRFTVSRDNSKNTVFLRMGSLRTEDMAVYYCARAAAPWGQGLVTVSSTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
138	pBB4017 CAR, AK последовательность с сигнальным пептидом	MALPVTALLPLALLHAARPEIVLTQSPDTLSLSPGERATLSCRASQSVSNRYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCHQYGSSPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGALVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEFVSTISYNGGTTYADSVKGRFTVSRDNSKNTVFLRMGSLRTEDMAVYYCARAAAPWGQGLVTVSSTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
139	CDRL1 антитела против MUC16 8813	QSVSSSY
140	CDRL2 антитела против MUC16 8813	GAS
141	CDRL3 антитела против MUC16 8813	QQYGSSPWT
142	CDRH1 антитела против MUC16 8813	GYTLTGY
143	CDRH2 антитела против MUC16 8813	INPNNGGT

144	CDRH3 антитела против MUC16 8813	ARSLELLPDGMDV
145	Вариабельная область легкой цепи антитела против MUC16 8813	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK
146	Вариабельная область тяжелой цепи антитела против MUC16 8813	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCAFGYTLTGYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNNGGTNYAQKFQGRVTMTRDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARLELLPDGMDVWGQGT TTVTVSS
147	pBB4018 CAR, АК последовательность без сигнального пептида	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCAFGYTLTGYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNNGGTNYAQKFQGRVTMTRDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARLELLPDGMDVWGQGT TTVTVSSGGGGGGGGGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRV KFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
148	pBB4018 CAR, АК последовательность с сигнальным пептидом	MALPVTALLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCAFGYTLTGYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNNGGTNYAQKFQGRVTMTRDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARLELLPDGMDVWGQGT TTVTVSSGGGGGGGGGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRV KFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
149	pBB4019 CAR, АК последовательность без сигнального пептида	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKGGGGGGGGGGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCAFGYTLTGYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNNGGTNYAQKFQGRVTMTRDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARLELLPDGMDVWGQGT TTVTVSSTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRV

		KFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG ERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
150	pBB4019 CAR, AK последовательнос ть с сигнальным пептидом	MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVLTQSPGTLSLSPGERAT LSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIP DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFG QGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSCAFGYTLTGYYIHWVRQAPGGLEWMGWINP NNGGTNYAQKFQGRVTMTRDKSISTAYMELSRRLSDDTA VYYCARSLELLPDGMDVWGQGTTVTVSSTTTPAPRPPTP APTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA LAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQ LYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLST ATKDTYDALHMQUALPPR
151	Эктодомен MUC16 человека («выпуклость»)	PGSRKFNTTERVLQGLLRPLFKNTSVGPLYSGCRLTLLRPE KDGEATGVDAICTHRPDPTGPGLDREQLYLELSQLTHSIT ELGPYTLDRDSL YVNGFTHRSSVPTTSTGVVSEEPFTLNFT INNLRYMADMGQPGSLKFNITDNVMQHLLSPLFQRSSLG ARYTGCRVIALRSVKNGAETRVDLLCTYLQPLSGPLPIK QVFHELSQLTHGITRLGPYSLDKDSL YLNGYNEPGPDEPP TTPKPATTFLLPPLSEATTAMGYHLKTLTLNFTISNLQYSPD MGKGSATFNSTEGVLQHLLRPLFQKSSMGPFFYLGCQLISL RPEKDGAATGVDTTCTYHPDPVGPGLDIQQLYWELSQLT HGVTQLGFYVLDLDRDSL FINGYAPQNLSIRGEYQINFHIVN WNLSNPDPPTSSEYITLLRDIQDKVTTL YKGSQ LHDTRFCL VTNLTMDSVLVTVKALFSSNLDP SLVEQVFLDKTLNASFH WLGSTYQLVDIHVTEMESSVYQPTSSSSTQH FYLNFTITNL PYSQDKAQP GTTNYQRNKRNIEDALNQLFRNSSIKSYFSD CQVSTFRSVPNRHHTGVDSL CNFSPLARRVDRVAIYEEFL RMTRNGTQLQNFTLDRSSVLVDGYSPNRNEPLTGNSDLP
152	Сигнальный пептид CD8	MALPVTALLLPLALLLHAARP
153	Шарнирная область CD8	TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD FACD
154	Трансмембранная область CD8	IYIWA PLAGTCGVLLLSLVIT
	Хвост/линкер	LYC
155	Костимулирующая область 4-1BB	KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGC EL
156	Область передачи сигнала CD3	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий внеклеточный домен, содержащий антитело против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают один или более эпитопов полипептида MUC16 человека; трансмембранный домен, один или более внутриклеточных костимулирующих сигнальных доменов и первичный сигнальный домен.
2. CAR по п. 1, характеризующийся тем, что антитело против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент связывают ближний к мембране фрагмент MUC16, оставшийся на поверхности клетки после протеолитического расщепления полноразмерного полипептида MUC16.
3. CAR по п. 2, характеризующийся тем, что фрагмент MUC16, оставшийся на поверхности клетки после протеолитического расщепления, содержит SEQ ID NO: 151.
4. CAR по любому из пп. 1 — 3, характеризующийся тем, что полноразмерный полипептид MUC16 содержит 16 доменов спермы морского ежа, энтерокиназы и агрина (SEA), пронумерованных 1 — 16 от N-конца к С-концу, и тем, что фрагмент MUC16 содержит SEA-домены 12 — 16.
5. CAR по любому из пп. 1 — 4, характеризующийся тем, что антитело против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают полипептид MUC16 человека, выбраны из группы, состоящей из Fab'-фрагмента, F(ab')<sub>2</sub>-фрагмента, биспецифического Fab-димера (Fab<sub>2</sub>), триспецифического Fab-тримера (Fab<sub>3</sub>), Fv, одноцепочечного белка Fv («scFv»), бис-scFv, (scFv)<sub>2</sub>, верблюжьего Ig, VHH, Ig NAR, минитела, диатела, триатела, тетратела, стабилизированного дисульфидными связями белка Fv («dsFv») и однодоменного антитела (sdAb, нанотела) или его фрагмента.
6. CAR по любому из пп. 1 — 5, характеризующийся тем, что антитело против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают полипептид MUC16 человека, представляют собой scFv.
7. CAR по любому из пп. 1 — 6, характеризующийся тем, что антитело против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат области CDRL1, CDRL2 и CDRL3 в пределах аминокислотной последовательности варибельной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 7.

8. CAR по любому из пп. 1 — 6, характеризующийся тем, что антитело против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат области CDRL1, CDRL2 и CDRL3 в пределах аминокислотной последовательности варибельной области легкой цепи, представленной в любой из SEQ ID NO: 47, 59, 71, 83, 95, 107, 119, 133 или 145.

9. CAR по любому из пп. 1 — 8, характеризующийся тем, что антитело против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат области CDRH1, CDRH2 и CDRH3 в пределах аминокислотной последовательности варибельной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 8.

10. CAR по любому из пп. 1 — 8, характеризующийся тем, что антитело против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат области CDRH1, CDRH2 и CDRH3 в пределах аминокислотной последовательности варибельной области тяжелой цепи, представленной в любой из SEQ ID NO: 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 134 или 146.

11. CAR по любому из пп. 1 — 10, характеризующийся тем, что антитело против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат одну или более CDR, представленных в любой из SEQ ID NO: 1 — 3.

12. CAR по любому из пп. 1 — 10, характеризующийся тем, что антитело против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат одну или более CDR, представленных в любой из (a) SEQ ID NO: 41 — 43, (b) SEQ ID NO: 53 — 55, (c) SEQ ID NO: 65 — 67, (d) SEQ ID NO: 77 — 79, (e) SEQ ID NO: 89 — 91, (f) SEQ ID NO: 101 — 103, (g) SEQ ID NO: 113 — 115, (h) SEQ ID NO: 127 — 129 или (i) SEQ ID NO: 139 — 141.

13. CAR по любому из пп. 1 — 12, характеризующийся тем, что антитело против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат одну или более CDR, представленных в любой из SEQ ID NO: 4 — 6.

14. CAR по любому из пп. 1 — 12, характеризующийся тем, что антитело против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат одну или более CDR, представленных в любой из (a) SEQ ID NO: 44 — 46, (b) SEQ ID NO: 56 — 58, (c) SEQ ID NO: 68 — 70, (d) SEQ ID NO: 80 — 82, (e) SEQ ID NO: 92 — 94, (f) SEQ ID NO: 104

— 106, (g) SEQ ID NO: 116 — 118, (h) SEQ ID NO: 130 — 132 или (i) SEQ ID NO: 142 — 144.

15. CAR по любому из пп. 1 — 14, характеризующийся тем, что антитело против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, идентичную по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% последовательности SEQ ID NO: 7 или содержащую ее.

16. CAR по любому из пп. 1 — 14, характеризующийся тем, что антитело против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, идентичную по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% последовательности любой из SEQ ID NO: 47, 59, 71, 83, 95, 107, 119, 133 или 145 или содержащую ее.

17. CAR по любому из пп. 1 — 16, характеризующийся тем, что антитело против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, идентичную по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% последовательности SEQ ID NO: 8 или содержащую ее.

18. CAR по любому из пп. 1 — 16, характеризующийся тем, что антитело против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, идентичную по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% любой из последовательностей SEQ ID NO: 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 134 или 146 или содержащую ее.

19. CAR по любому из пп. 1 — 18, характеризующийся тем, что трансмембранный домен получен из полипептида, выбранного из группы, состоящей из альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD3ε, CD3ζ, CD4, CD5, CD8α, CD9, CD16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD152, CD154 и PD1.

20. CAR по любому из пп. 1 — 18, характеризующийся тем, что трансмембранный домен получен из полипептида, выбранного из группы, состоящей из CD8 $\alpha$ , CD4, CD45, PD1 и CD154.
21. CAR по любому из пп. 1 — 18, характеризующийся тем, что трансмембранный домен получен из CD8 $\alpha$ .
22. CAR по п. 21, характеризующийся тем, что трансмембранный домен содержит последовательность SEQ ID NO: 154.
23. CAR по любому из пп. 1 — 22, характеризующийся тем, что один или более костимулирующих сигнальных доменов получены из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM и ZAP70.
24. CAR по любому из пп. 1 — 22, характеризующийся тем, что один или более костимулирующих сигнальных доменов получены из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD28, CD134 и CD137 (4-1BB).
25. CAR по любому из пп. 1 — 22, характеризующийся тем, что один или более костимулирующих сигнальных доменов получены из CD137 (4—1BB).
26. CAR по п. 25, характеризующийся тем, что костимулирующий сигнальный домен содержит последовательность SEQ ID NO: 155.
27. CAR по любому из пп. 1 — 26, характеризующийся тем, что первичный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ .
28. CAR по п. 27, характеризующийся тем, что первичный сигнальный домен содержит последовательность SEQ ID NO: 156.
29. CAR по любому из пп. 1 — 28, дополнительно содержащий полипептид шарнирной области.
30. CAR по п. 29, характеризующийся тем, что полипептид шарнирной области содержит шарнирную область CD8 $\alpha$ .

31. CAR по п. 30, характеризующийся тем, что полипептид шарнирной области содержит последовательность SEQ ID NO: 153.
32. CAR по любому из пп. 1 — 31, дополнительно содержащий сигнальный полипептид.
33. CAR по п. 32, характеризующийся тем, что сигнальный полипептид содержит сигнальный полипептид тяжелой цепи IgG1, сигнальный полипептид рецептора 2 гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSFR2), сигнальный полипептид I $\kappa$ g или сигнальный полипептид CD8 $\alpha$ .
34. CAR по п. 33, характеризующийся тем, что сигнальный полипептид содержит сигнальный полипептид CD8 $\alpha$ .
35. CAR по п. 34, характеризующийся тем, что сигнальный полипептид содержит последовательность SEQ ID NO: 152.
36. CAR по любому из пп. 1 — 35, дополнительно содержащий полипептидный линкер между вариабельным доменом тяжелой цепи и вариабельным доменом легкой цепи.
37. CAR по п. 36, характеризующийся тем, что полипептидный линкер между вариабельным доменом тяжелой цепи и вариабельным доменом легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 14 — 25.
38. CAR по п. 37, характеризующийся тем, что полипептидный линкер между вариабельным доменом тяжелой цепи и вариабельным доменом легкой цепи содержит аминокислотный линкер 3xG4S, представленный в SEQ ID NO: 24.
39. CAR по любому из пп. 1 — 38, дополнительно содержащий полипептидный линкер между трансмембранным доменом и одним или более внутриклеточными костимулирующими сигнальными доменами.
40. CAR по п. 39, характеризующийся тем, что полипептидный линкер между трансмембранным доменом и одним или более внутриклеточными костимулирующими сигнальными доменами содержит последовательность LYC.

41. CAR по любому из пп. 1 — 40, характеризующийся тем, что антитело против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат области CDRL1, CDRL2 и CDRL3 в пределах аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 7, и области CDRH1, CDRH2 и CDRH3 в пределах аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 8; трансмембранный домен получен из полипептида, выбранного из группы, состоящей из: CD8 $\alpha$ , CD4, CD45, PD1 и CD154; один или более костимулирующих сигнальных доменов получены из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD28, CD134 и CD137 (4-1BB); и первичный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ .

42. CAR по любому из пп. 1 — 40, характеризующийся тем, что антитело против MUC16 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат области CDRL1, CDRL2 и CDRL3 в пределах аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 7, и области CDRH1, CDRH2 и CDRH3 в пределах аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 8; трансмембранный домен получен из CD8 $\alpha$ ; один или более костимулирующих сигнальных доменов получены из CD137 (4-1BB); и первичный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ .

43. CAR по любому из пп. 1 — 42, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательности SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 11 или содержащую их.

44. CAR по любому из пп. 1 — 42, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% любой из последовательностей SEQ ID NO: 49, 50, 51, 52, 61, 62, 63, 64, 73, 74, 75, 76, 85, 86, 87, 88, 97, 98, 99, 100, 109, 110, 111, 112, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 135, 136, 137, 138, 147, 148, 149 или 150 или содержащую их.

45. CAR, который конкурирует за связывание с одним или более эпитопами полипептида MUC16 человека с CAR по любому из пп. 1 — 44.

46. Полинуклеотид, кодирующий CAR по любому из пп. 1 — 45.

47. Полинуклеотид, кодирующий CAR, характеризующийся тем, что полинуклеотидная последовательность кодирует полипептид, идентичный по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% последовательности SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 12 или содержащий их.

48. Полинуклеотид, кодирующий CAR, характеризующийся тем, что полинуклеотидная последовательность кодирует полипептид, идентичный по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% любой из последовательностей SEQ ID NO: 9, 11, 49, 50, 51, 52, 61, 62, 63, 64, 73, 74, 75, 76, 85, 86, 87, 88, 97, 98, 99, 100, 109, 110, 111, 112, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 135, 136, 137, 138, 147, 148, 149 или 150 или содержащий их.

49. Вектор, содержащий полинуклеотид по любому из пп. 46 — 48.

50. Вектор по п. 49, характеризующийся тем, что указанный вектор представляет собой вектор экспрессии.

51. Вектор по п. 49, характеризующийся тем, что указанный вектор представляет собой эписомный вектор.

52. Вектор по п. 49, характеризующийся тем, что указанный вектор представляет собой вирусный вектор.

53. Вектор по п. 49, характеризующийся тем, что указанный вектор представляет собой ретровирусный вектор.

54. Вектор по п. 49, характеризующийся тем, что указанный вектор представляет собой лентивирусный вектор.

55. Вектор по п. 49, характеризующийся тем, что указанный вектор представляет собой вектор на основе аденоассоциированного вируса.

56. Вектор по п. 54, характеризующийся тем, что лентивирусный вектор выбран из группы, состоящей из вируса иммунодефицита человека 1 (ВИЧ-1); вируса иммунодефицита человека 2 (ВИЧ-2), вируса Висна-Маеди (VMV); вируса артрита-энцефалита коз (CAEV); вируса инфекционной анемии лошадей (EIAV); вируса

иммунодефицита кошачьих (FIV); вируса иммунодефицита крупного рогатого скота (BIV) и вируса иммунодефицита обезьян (SIV).

57. Вектор по любому из пп. 49 — 56, содержащий левый (5') LTR ретровируса, сигнал упаковки Psi ( $\Psi$ ), центральный полипуриновый тракт/флэп ДНК (сPPT/FLAP), элемент экспорта ретровирусов; промотор, функционально связанный с полинуклеотидом по п. 26 или п. 27; и правый (3') LTR ретровируса.

58. Вектор по п. 57, дополнительно содержащий гетерологичную последовательность полиаденилирования.

59. Вектор по любому из п. 58, характеризующийся тем, что промотор 5'-LTR заменен гетерологичным промотором.

60. Вектор по п. 59, характеризующийся тем, что гетерологичный промотор представляет собой промотор цитомегаловируса (CMV), промотор вируса саркомы Рауса (RSV) или промотор вируса обезьян 40 (SV40).

61. Вектор по любому из пп. 57 — 60, характеризующийся тем, что 5'-LTR или 3'-LTR представляет собой LTR лентивируса.

62. Вектор по любому из пп. 57 — 61, характеризующийся тем, что 3'-LTR содержит одну или более модификаций.

63. Вектор по любому из пп. 57 — 62, характеризующийся тем, что 3'-LTR содержит одну или более делеций.

64. Вектор по любому из пп. 57 — 63, характеризующийся тем, что 3'-LTR представляет собой самоинактивирующийся (SIN) LTR.

65. Вектор по любому из пп. 57 — 64, характеризующийся тем, что промотор, функционально связанный с полинуклеотидом по любому из пп. 47 — 48, выбран из группы, состоящей из промотора непосредственно раннего гена цитомегаловируса (CMV), промотора фактора элонгации 1-альфа (EF1- $\alpha$ ), промотора фосфоглицераткиназы 1 (PGK), промотора убиквитина-С (UBQ-C), энхансера цитомегаловируса/промотора бета-актина кур (CAG), энхансера полиомы/промотора тимидинкиназы вируса простого герпеса (MC1), промотора бета-актина ( $\beta$ -ACT),

промотора вируса обезьян 40 (SV40) и промотора MND с энхансером вируса миелопролиферативной саркомы, с делецией участка, опосредующего отрицательную регуляцию, с сайтом связывания праймера, замененным на последовательность из dl587rev.

66. Вектор по п. 65, характеризующийся тем, что промотор, функционально связанный с полинуклеотидом по любому из пп. 46 — 48, представляет собой промотор MND.

67. Клетка, содержащая вектор по любому из пп. 49 - 66.

68. Клетка, содержащая CAR по любому из пп. 1 - 45.

69. Клетка по любому из пп. 67 или 68, характеризующаяся тем, что указанная клетка представляет собой иммунную эффекторную клетку.

70. Клетка по п. 69, характеризующаяся тем, что иммунная эффекторная клетка представляет собой цитотоксический Т-лимфоцит (CTL), инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL) или хелперную Т-клетку.

71. Клетка по п. 67 или п. 68, характеризующаяся тем, что указанная клетка представляет собой Т-клетку.

72. Клетка по п. 67 или п. 68, характеризующаяся тем, что указанная клетка представляет собой  $\alpha\beta$ -Т-клетку,  $\gamma\delta$ -Т-клетку, клетку - естественного киллера (NK) или Т-клетку - естественного киллера (NKT).

73. Композиция, содержащая клетку по любому из пп. 67 - 72.

74. Фармацевтическая композиция, содержащая клетку по любому из пп. 67 — 72 и физиологически приемлемое вспомогательное вещество.

75. Способ получения иммунной эффекторной клетки, содержащей CAR по любому из пп. 1 — 45, включающий введение в иммунную эффекторную клетку полинуклеотида по любому из пп. 46 — 48 или вектора по любому из пп. 49 — 66.

76. Способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции по п. 73 или фармацевтической композиции по п. 74.
77. Способ по п. 76, характеризующийся тем, что рак представляет собой солидный рак, необязательно при этом солидный рак экспрессирует MUC16.
78. Способ по п. 77, характеризующийся тем, что солидный рак выбран из группы, состоящей из саркомы, рака предстательной железы, рака матки, рака щитовидной железы, рака яичка, рака почки, рака поджелудочной железы, рака яичника, рака шейки матки, мезотелиомы, рака пищевода, рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, меланомы, гепатоцеллюлярной карциномы, рака головы и шеи, рака желудка, рака эндометрия, рака фаллопиевой трубы, колоректального рака, холангиокарциномы, рака молочной железы и рака мочевого пузыря.
79. Способ по п. 77, характеризующийся тем, что солидный рак выбран из группы, состоящей из рака яичника, рака эндометрия, рака шейки матки, мезотелиомы, NSCLC и SCLC.
80. Способ по п. 77, характеризующийся тем, что солидный рак представляет собой рак яичника.
81. Способ по любому из пп. 76 — 80, характеризующийся тем, что композицию вводят в комбинации с дополнительным терапевтическим средством.
82. Способ лечения рака у субъекта, который получал или получает терапевтическое средство, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции по п. 73 или фармацевтической композиции по п. 74.
83. Способ по п. 81 или п. 82, характеризующийся тем, что композицию и терапевтическое средство вводят последовательно или одновременно.
84. Способ по любому из пп. 81 — 83, характеризующийся тем, что терапевтическое средство представляет собой ингибитор иммунной контрольной точки, онколитический вирус или костимулирующее антитело.

85. Способ по п. 84, характеризующийся тем, что ингибитор иммунной контрольной точки связывает белок контрольной точки или соответствующий лиганд, выбранный из группы, состоящей из: белка 1 запрограммированной гибели клеток (PD-1; PDCD1), белка 3 гена активации лимфоцитов (LAG-3), белка 3, содержащего Т-клеточный иммуноглобулиновый домен и домен муцина (TIM-3), антигена 4 цитотоксических Т-лимфоцитов (CTLA-4), аттенюатора В- и Т-лимфоцитов (BTLA), индуцируемого глюкокортикоидами рецептора фактора некроза опухоли (GITR), домена Т-клеточного иммуноглобулина и тирозинсодержащего ингибиторного мотива иммунорецептора (TIGIT), содержащего V-домен Ig супрессора активации Т-клеток (VISTA), иммуноглобулин-подобного рецептора (KIR) клеток-киллеров, ICOS, ICOSL, OX40, B7-H3, B7-H4, CD47, 4-1BB, CD27 и CD70.

86. Способ по п. 84 или п. 85, характеризующийся тем, что ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой ингибитор PD-1 или ингибитор PD-L1.

87. Способ по п. 86, характеризующийся тем, что ингибитор PD-1 или ингибитор PD-L1 представляет собой антитело против PD-1 или против PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент.

88. Способ по п. 87, характеризующийся тем, что ингибитор PD-1 выбран из группы, состоящей из ниволумаба, пембролизумаба, атезолизумаба и цемиплимаба.

89. Способ по п. 84, характеризующийся тем, что костимулирующее антитело представляет собой биспецифическое антитело.

90. Способ по п. 89, характеризующийся тем, что биспецифическое антитело связывает опухоль-ассоциированный антиген (ТАА) и CD3.

91. Способ по п. 89, характеризующийся тем, что биспецифическое антитело связывает ТАА и CD28.

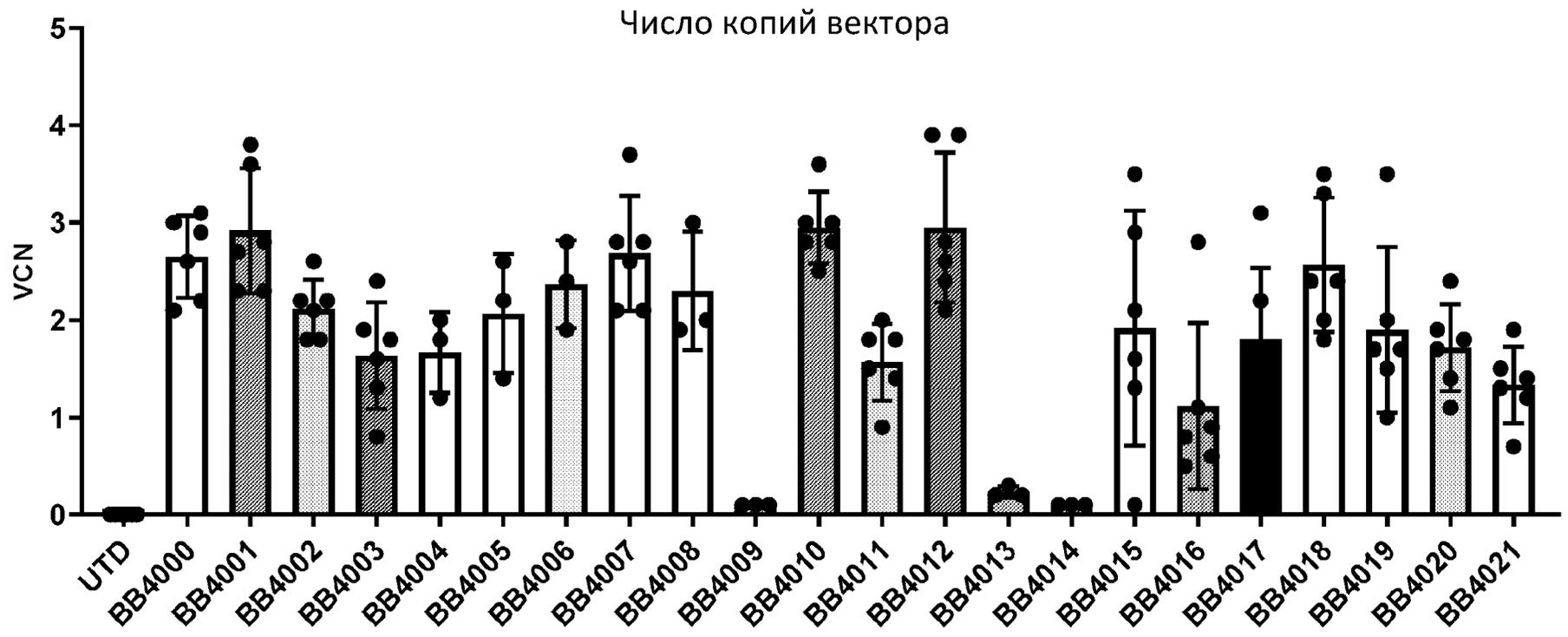
92. Способ по п. 90 или п. 91, характеризующийся тем, что ТАА выбран из группы, состоящей из AFP, ALK, белков BAGE,  $\beta$ -катенина, bcr-abl, BRCA1, BORIS, CA9, карбоангидразы IX, каспазы-8, CCR5, CD40, CDK4, CEA, CTLA4, циклина-B1, CYP1B1, ErbB3, ErbB4, ETV6-AML, Fra-1, FOLR1, белков GAGE (например, GAGE-1, -2), GD2, GloboH, глипикана-3, GM3, gp100, Her2, HLA/B-raf, HLA/k-ras, HLA/MAGE-A3, hTERT, LMP2, MART-1, ML-IAP, Muc1, Muc2, Muc3, Muc4, Muc5, Muc16, MUM1,

NA17, NY-BR1, NY-BR62, NY-BR85, OX40, p15, p53, PAP, PAX3, PAX5, PCTA-1, PRLR, белков RAGE, Ras, RGS5, Rho, SART-1, SART-3, Steap-1, Steap-2, сурвивина, TGF- $\beta$ , TMPRSS2, Tn, TRP-1, TRP-2, тирозиназы, уроплакина-3, рецептора фолиевой кислоты альфа (FR $\alpha$ ), интегрин  $\alpha$ v $\beta$ 6, антигена созревания В-клеток (BCMA), B7-H3 (CD276), B7-H6, карбоангидразы IX (CAIX), CCR1, CD16, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD37, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD133, CD135 (также известного как fms-подобная тирозинкиназа 3; FLT3), CD138, CD171, карциноэмбрионального антигена (CEA), клаудина-6 (CLDN6), подобной лектину С-типа молекулы 1 (CLL-1), белка подгруппы 1 CD2 (CS-1), хондроитинсульфат-протеогликана 4 (CSPG4), антигена 1, ассоциированного с Т-клеточной лимфомой кожи (CTAGE1), рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), варианта III рецептора эпидермального фактора роста (EGFRvIII), эпителиального гликопротеина 2 (EGP2), эпителиального гликопротеина 40 (EGP40), молекулы адгезии эпителиальных клеток (EPCAM), рецептора 2 эфрина типа А (EPHA2), белка активации фибробластов (FAP), белка 5, подобного Fc-рецептору (FCRL5), фетального рецептора ацетилхолинэстеразы (AChR), ганглиозида G2 (GD2), ганглиозида G3 (GD3), глипикана-3 (GPC3), семейства EGFR, включая ErbB2 (HER2), IL-11R $\alpha$ , IL-13R $\alpha$ 2, каппа, раково-тестикулярного антигена 2 (LAGE-1A), лямбда, Льюис-Y (LeY), молекулы клеточной адгезии L1 (L1-CAM), представителя 2 подсемейства В иммуноглобулин-подобного рецептора лейкоцитов (LILRB2); гена антигена меланомы (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGEA10, антигена меланомы 1, распознаваемого Т-клетками (MelanA или MART1), мезотелина (MSLN), молекулы адгезии нервных клеток (NCAM), раково-тестикулярного антигена 1 (NY-ESO-1), полисиаловой кислоты; специфического для плаценты белка 1 (PLAC1), преимущественно экспрессируемого меланомой антигена (PRAME), антигена стволовых клеток предстательной железы (PSCA), простатспецифического мембранного антигена (PSMA), орфанного рецептора 1, подобного рецепторной тирозинкиназе (ROR1), белка точки разрыва-2 хромосомы X при синовиальной саркоме (SSX2), опухольассоциированного гликопротеина 72 (TAG72), белка 3, содержащего Т-клеточный иммуноглобулиновый домен и домен муцина (TIM-3), эндотелиального маркера опухоли 1 (TEM1/CD248), родственного эндотелиальному маркеру опухоли белка 7 (TEM7R), трофобластического гликопротеина (TPBG), лигандов NKG2D, рецептора фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGFR2) и белка 1 опухоли Вильмса (WT-1).

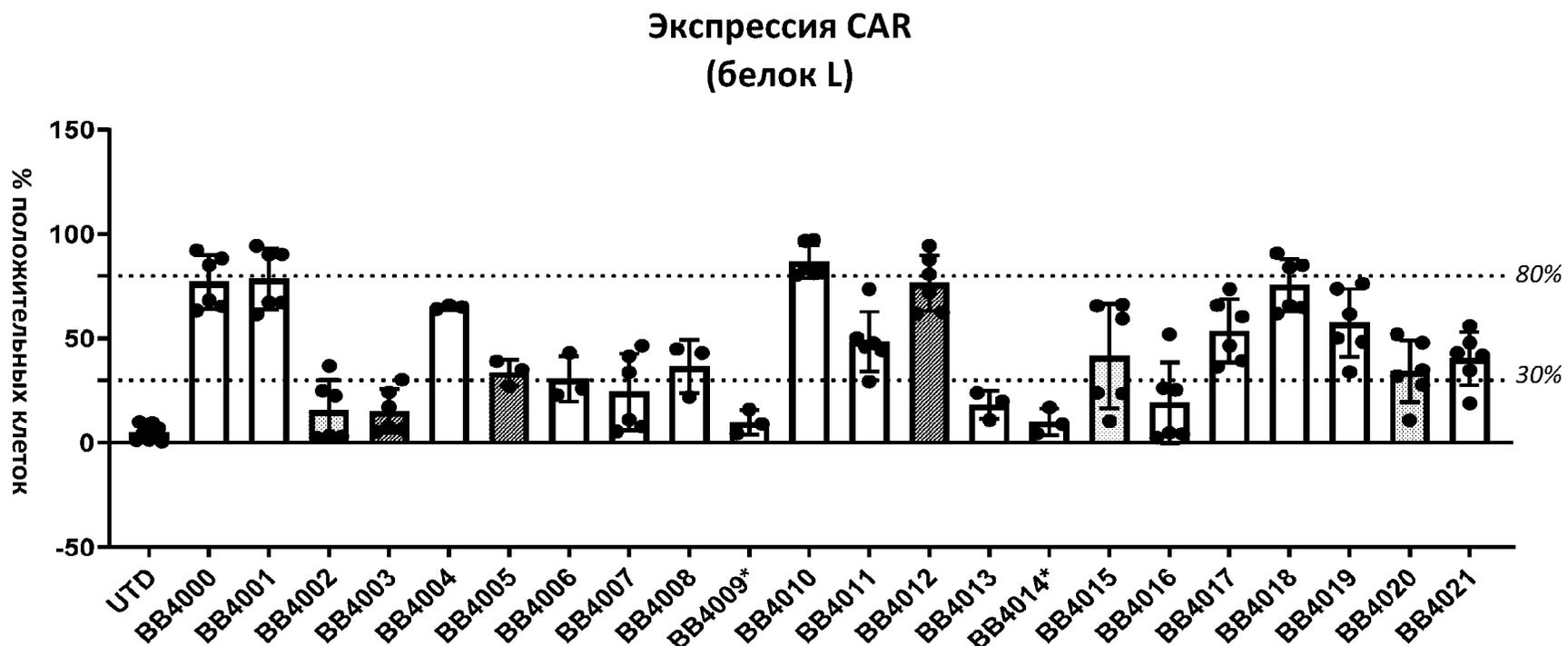
93. Способ по п. 90 или п. 91, характеризующийся тем, что ТАА представляет собой MSLN.
94. Способ по п. 90 или п. 91, характеризующийся тем, что ТАА представляет собой рецептор фолиевой кислоты альфа (FR $\alpha$ ).
95. Способ по п. 90 или п. 91, характеризующийся тем, что ТАА представляет собой MUC16.
96. Способ по любому из пп. 81 — 83, характеризующийся тем, что терапевтическое средство представляет собой ингибитор фактора роста эндотелия сосудов (VEGF).
97. Способ по п. 96, характеризующийся тем, что ингибитор VEGF представляет собой бевацизумаб.
98. Способ по любому из пп. 81 — 83, характеризующийся тем, что терапевтическое средство представляет собой цитокин.
99. Способ по п. 98, характеризующийся тем, что цитокин представляет собой IL-2 или маскированный IL-2.
100. Способ по любому из пп. 81 — 83, характеризующийся тем, что терапевтическое средство представляет собой онколитический вирус.
101. Способ по п. 100, характеризующийся тем, что онколитический вирус выбран из группы, состоящей из VSV (Voyager V1), HSV, аденовируса, вируса Мараба, вируса кори, NDV, пикорнавируса, реовируса или вируса осповакцины.
102. Способ по п. 100, характеризующийся тем, что онколитический вирус представляет собой Voyager V1.



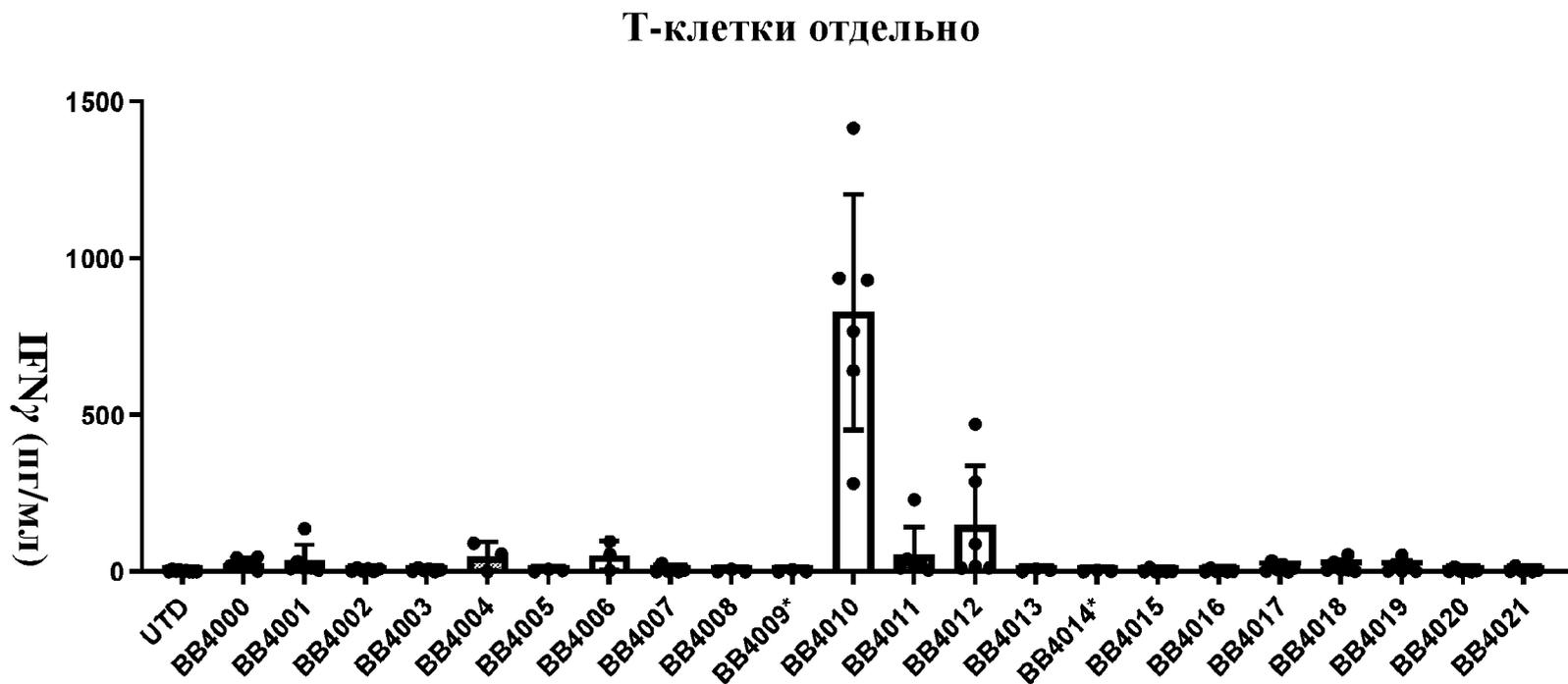
**ФИГ. 1**



**ФИГ. 2**

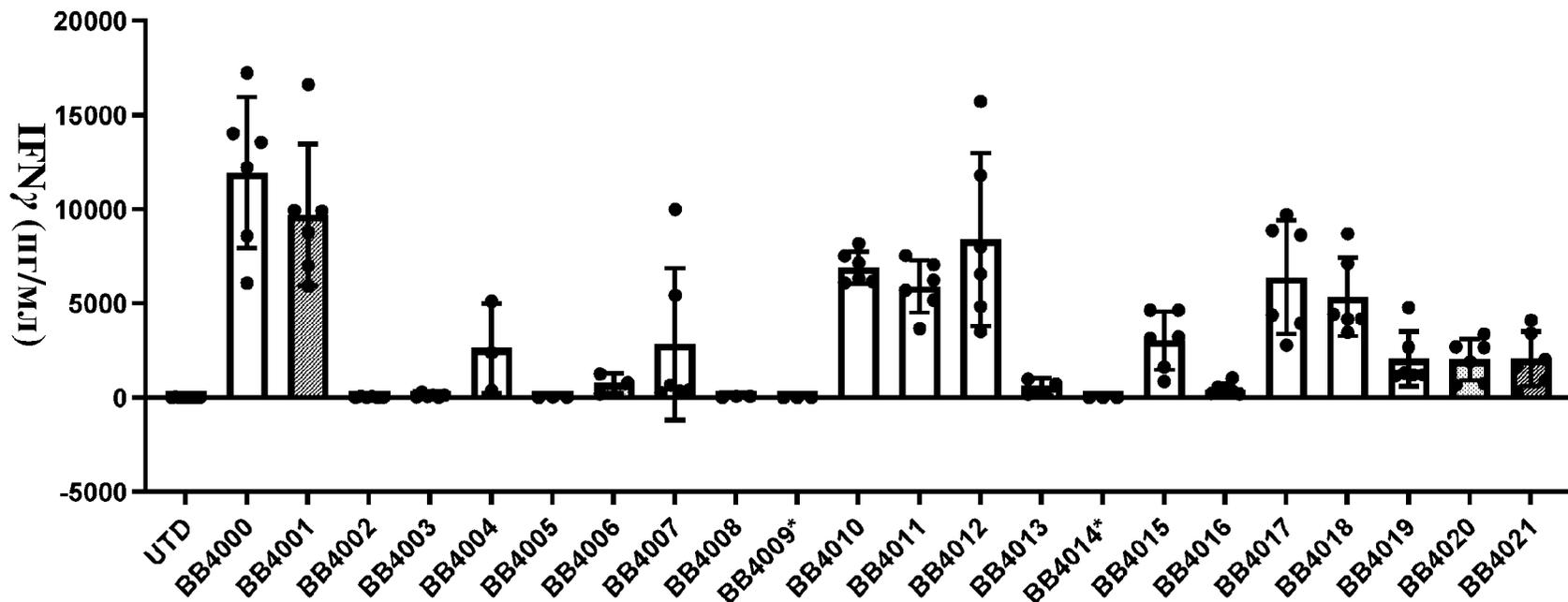


**ФИГ. 3**

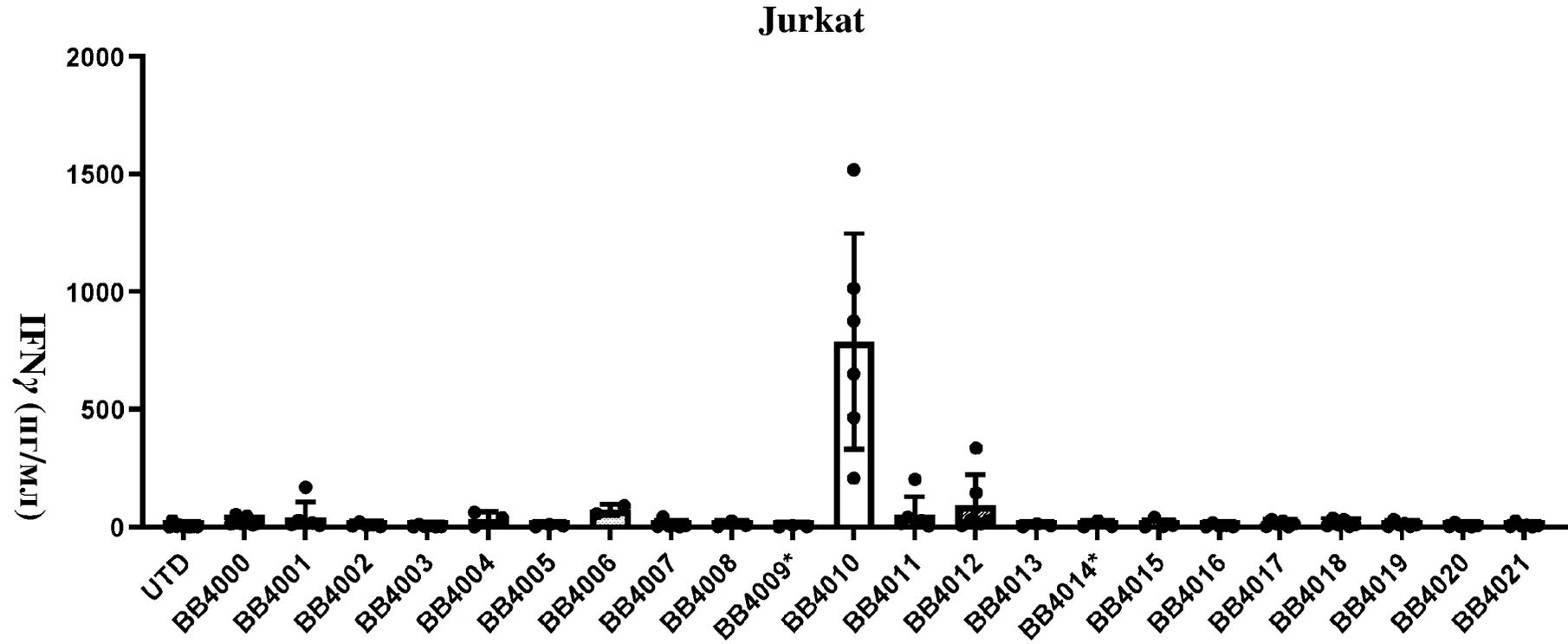


**ФИГ. 4А**

### OVCAR3

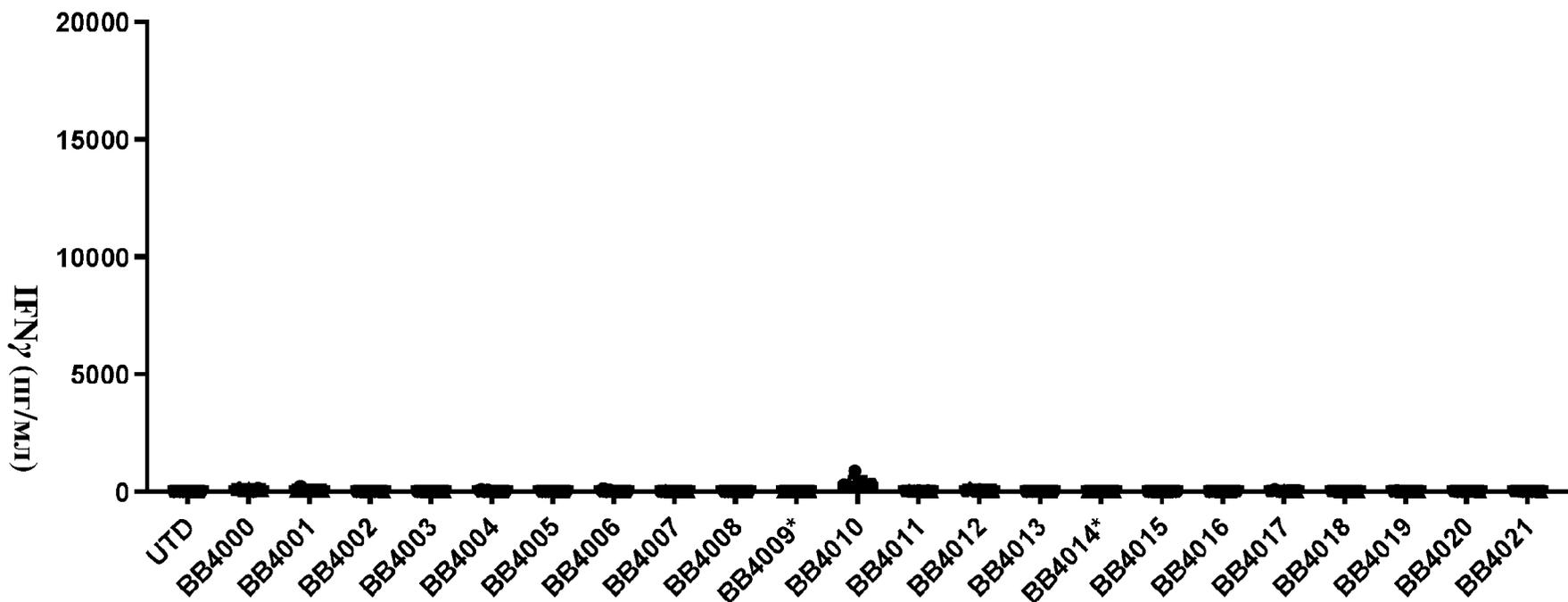


ФИГ. 4В

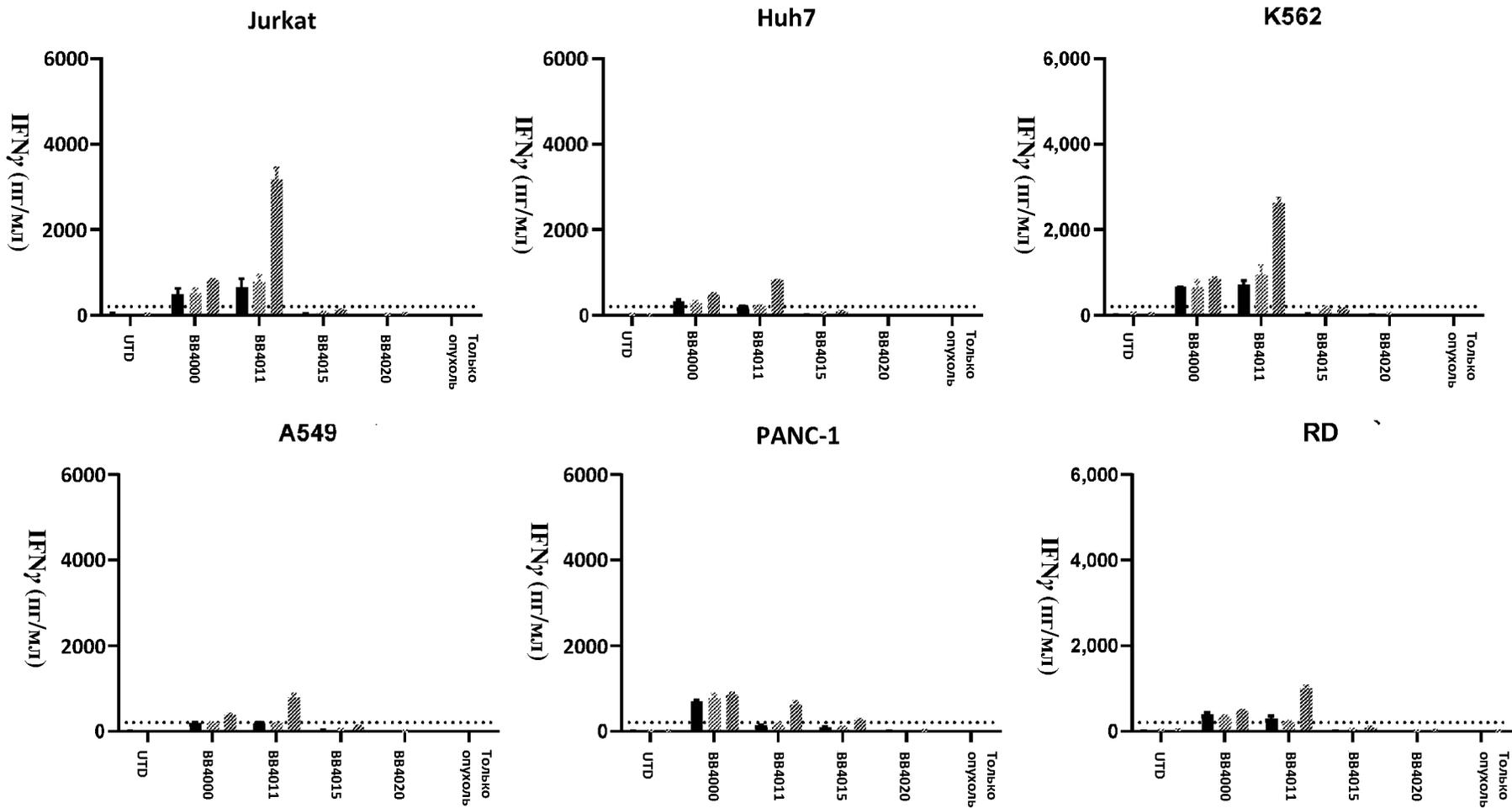


*ФИГ. 4С*

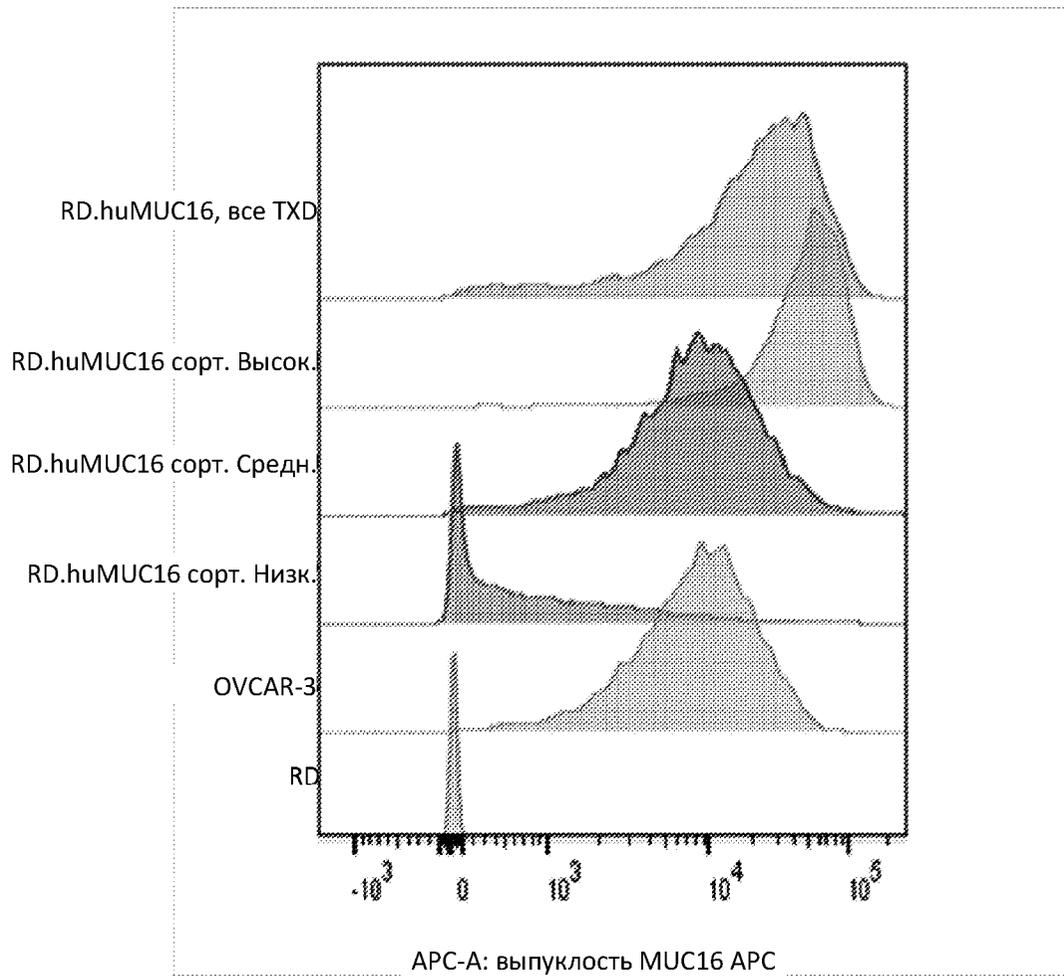
PANC-1



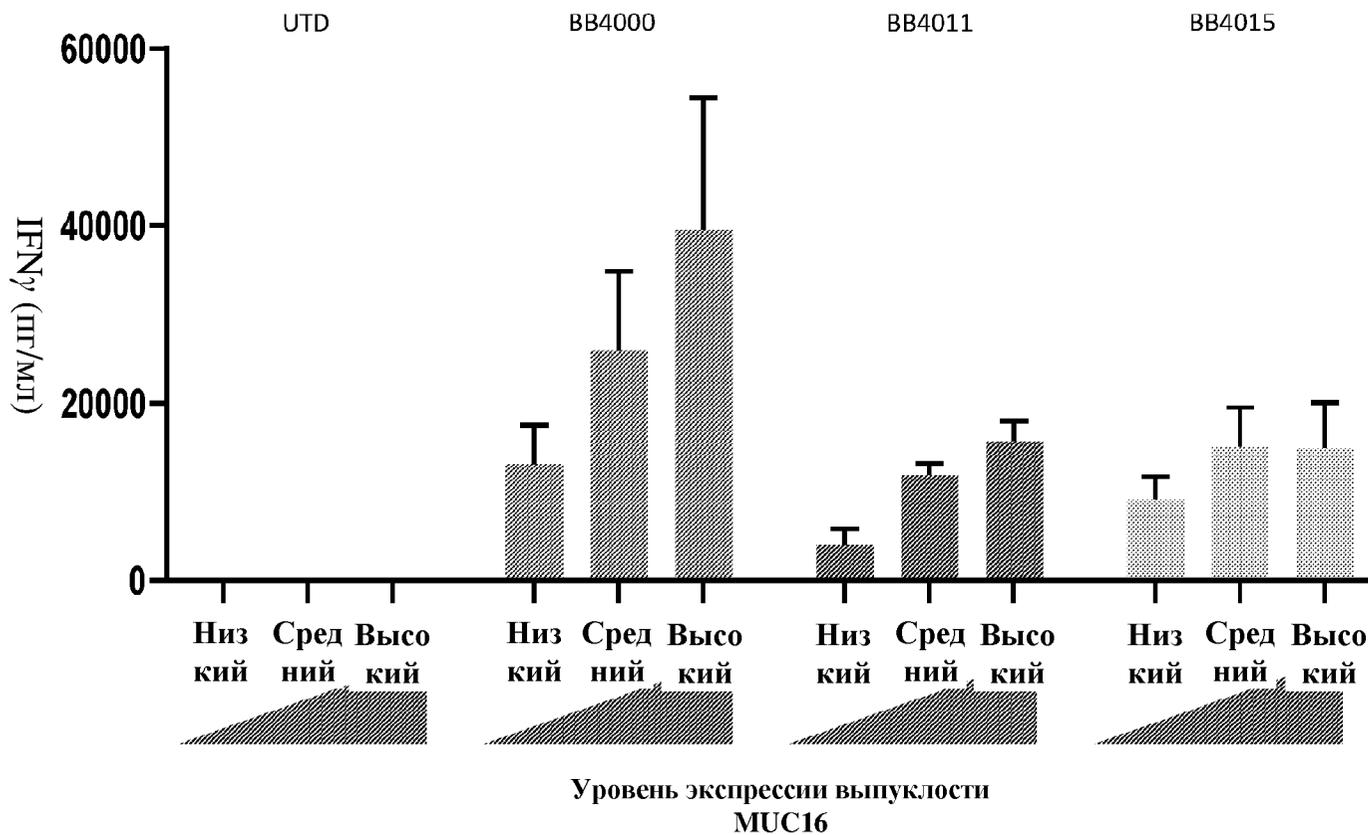
ФИГ. 4D



ФИГ. 5

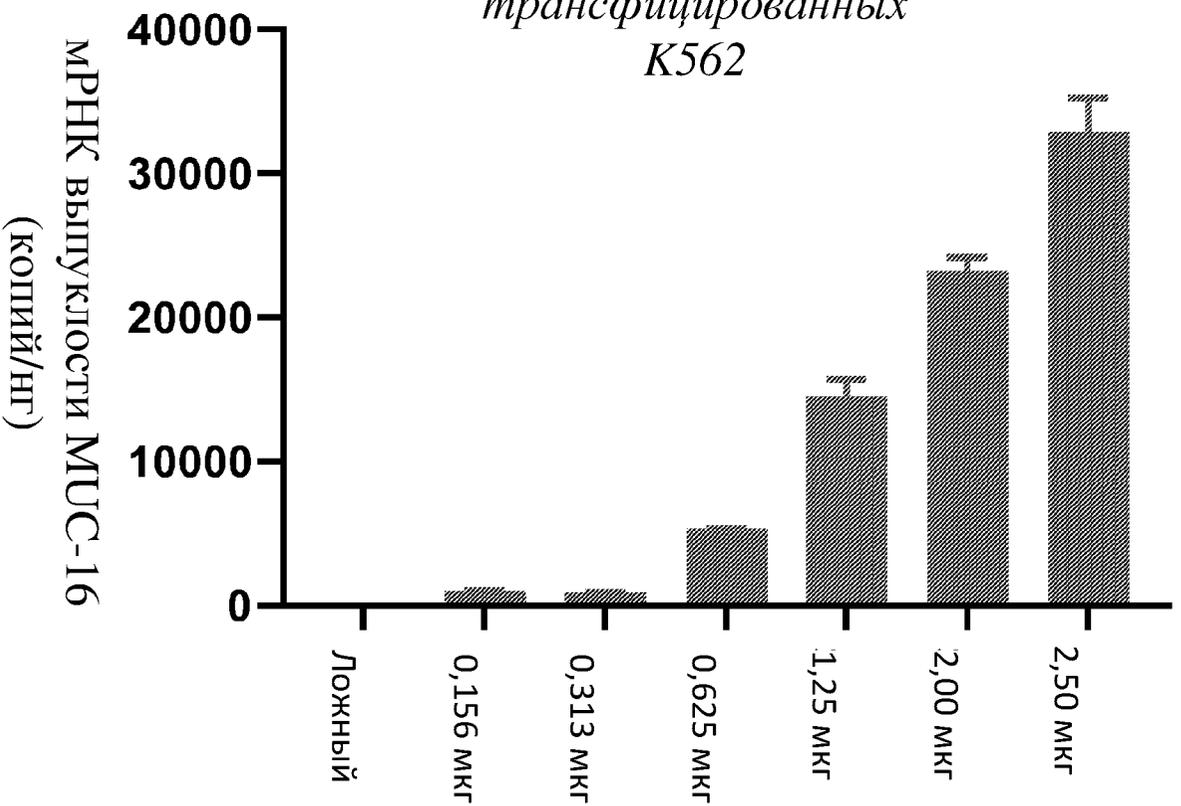


**ФИГ. 6А**



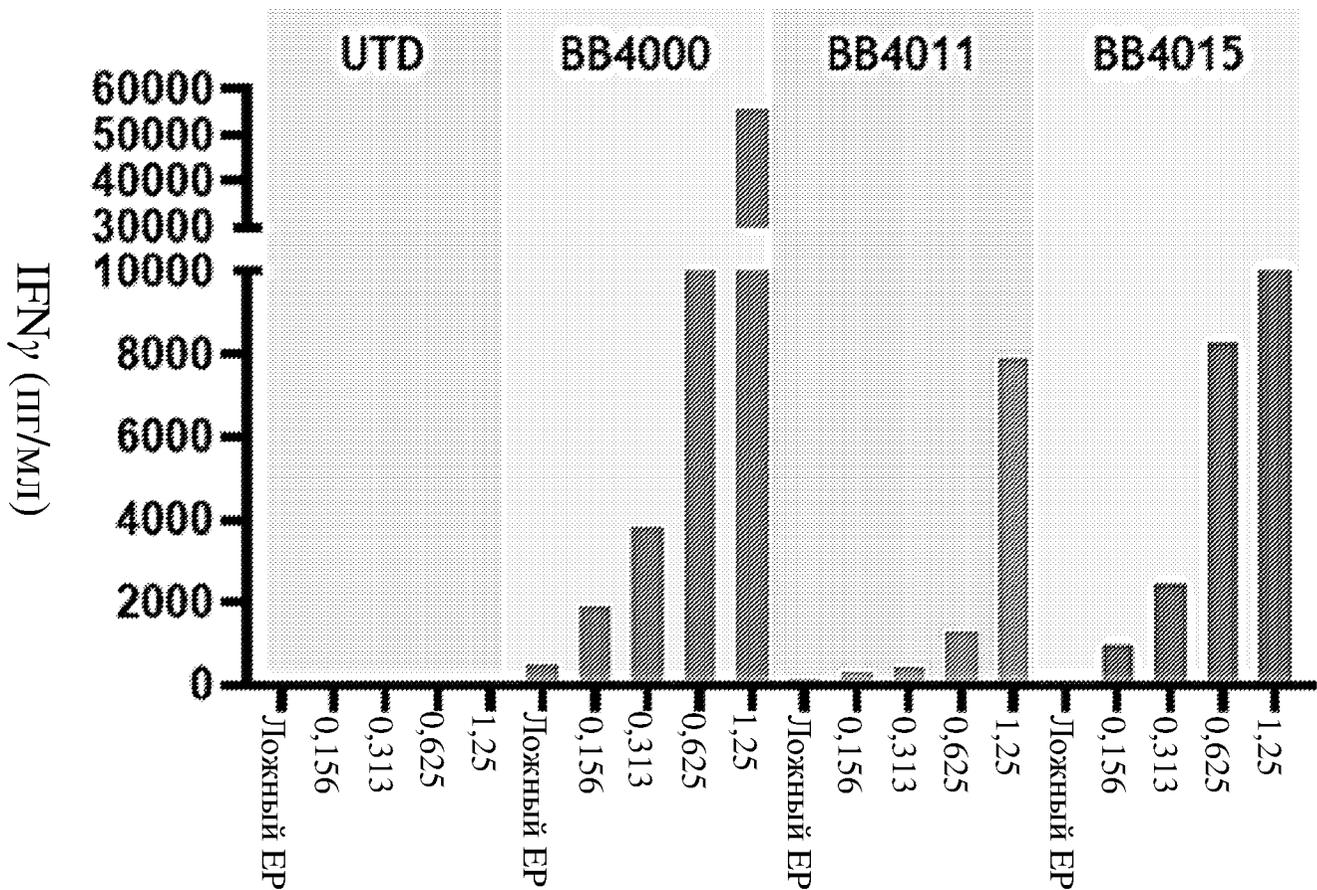
**ФИГ. 6В**

*мРНК вышуклости  
MUC-16 (MUC-16.nib) в  
трансфицированных  
K562*

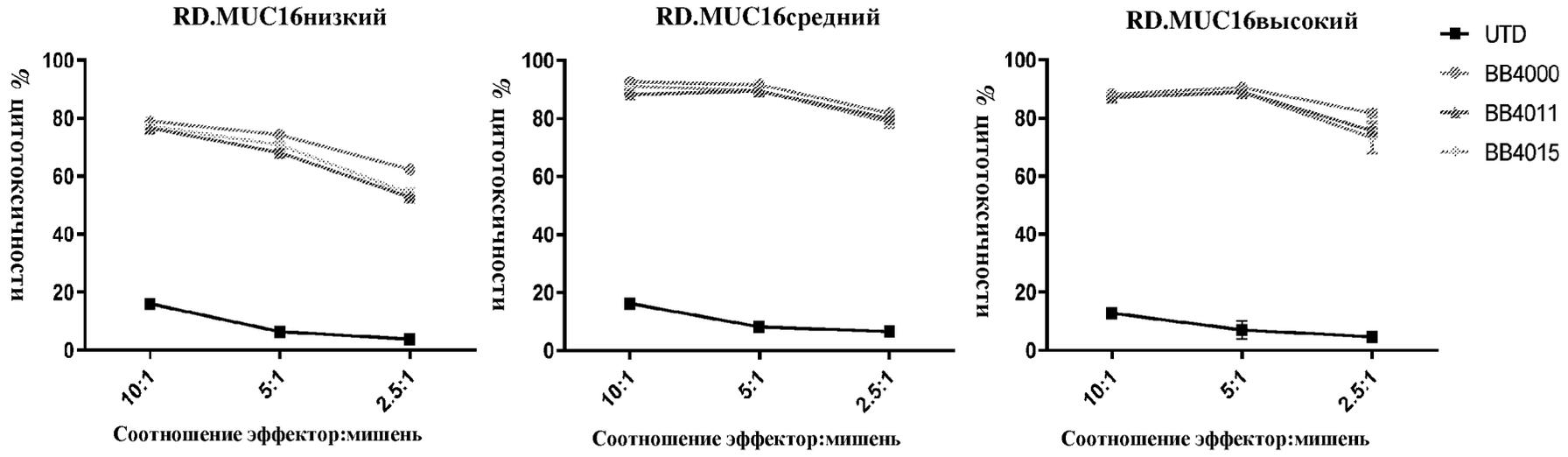


**ФИГ. 7А**

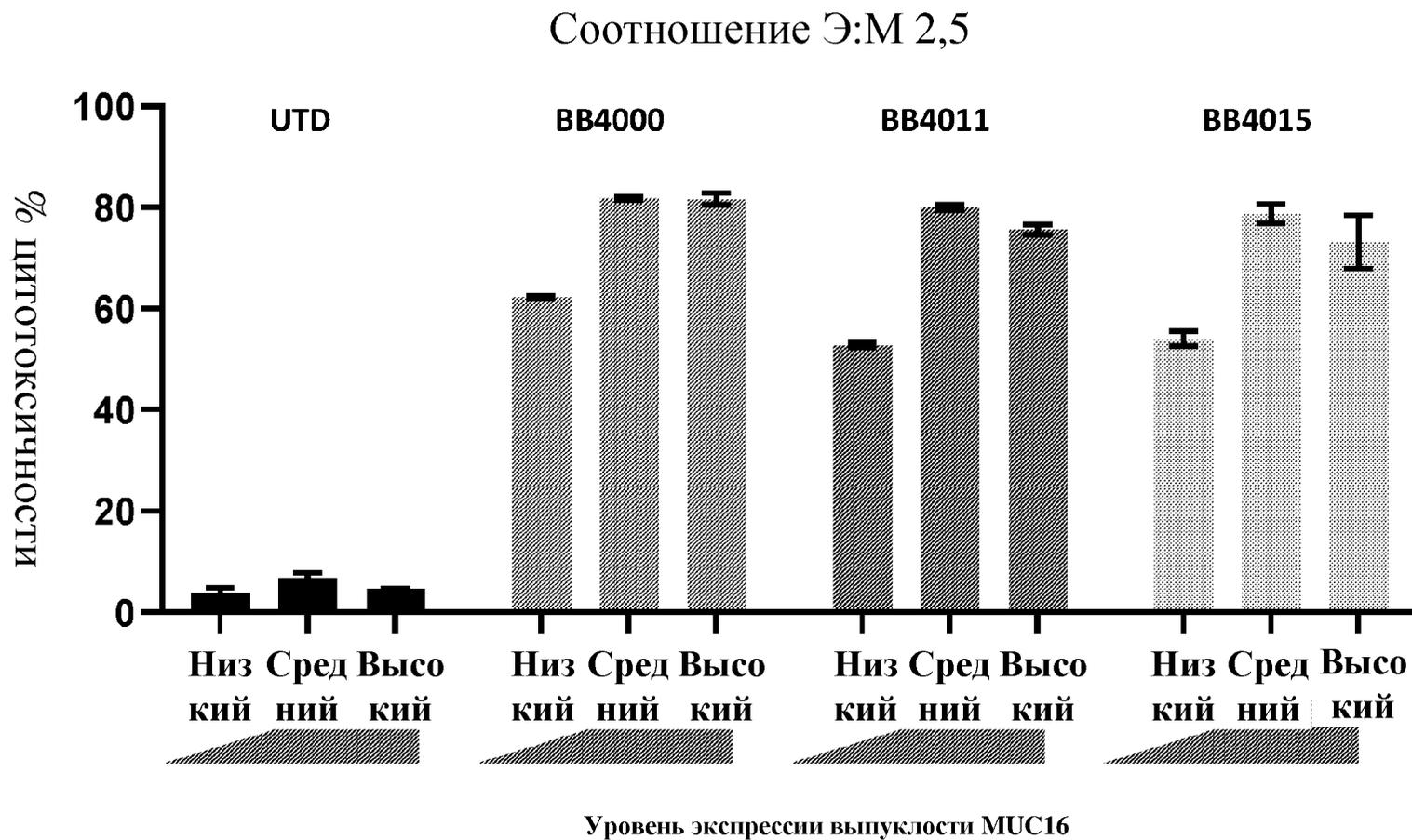
Реактивность CAR-T против MUC16



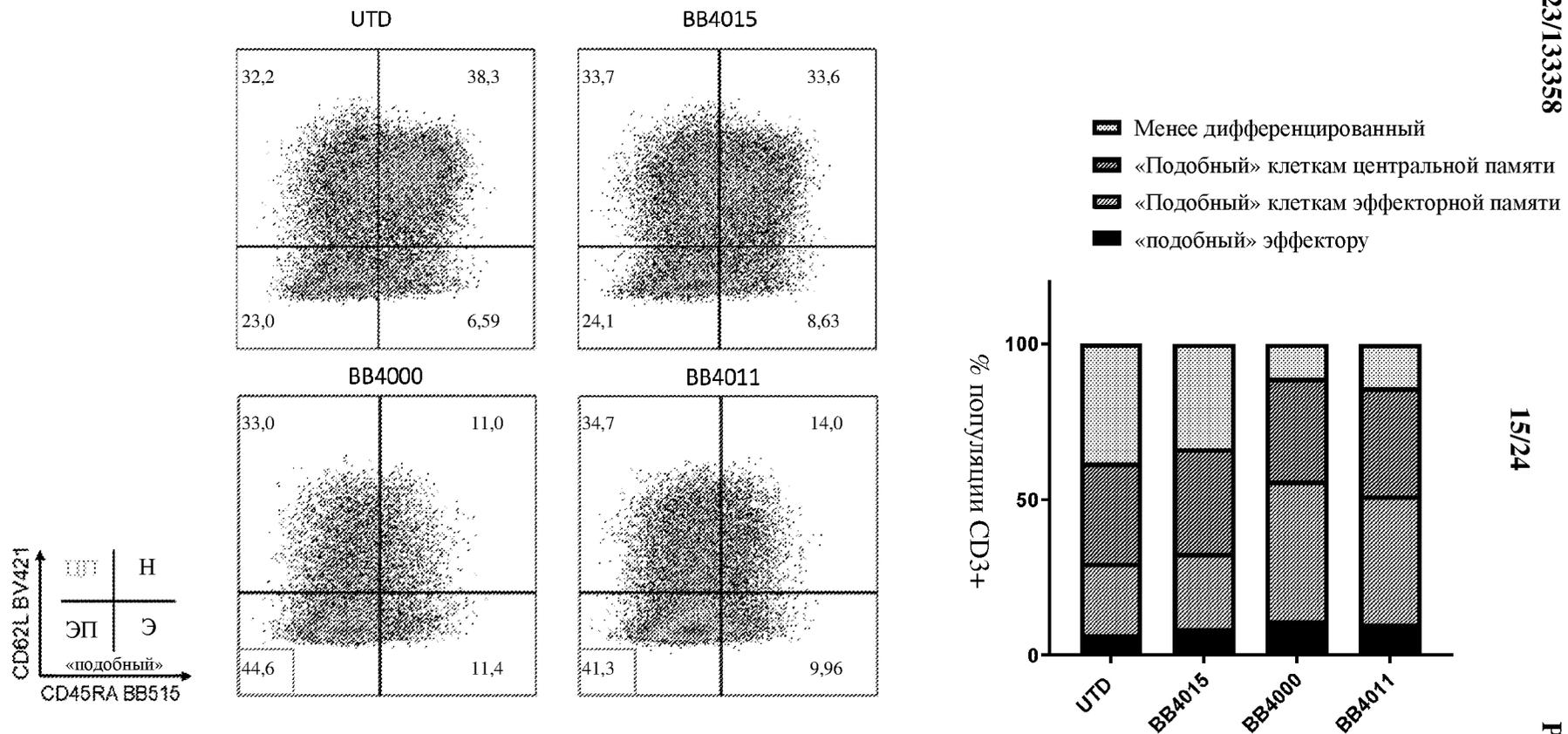
ФИГ. 7B



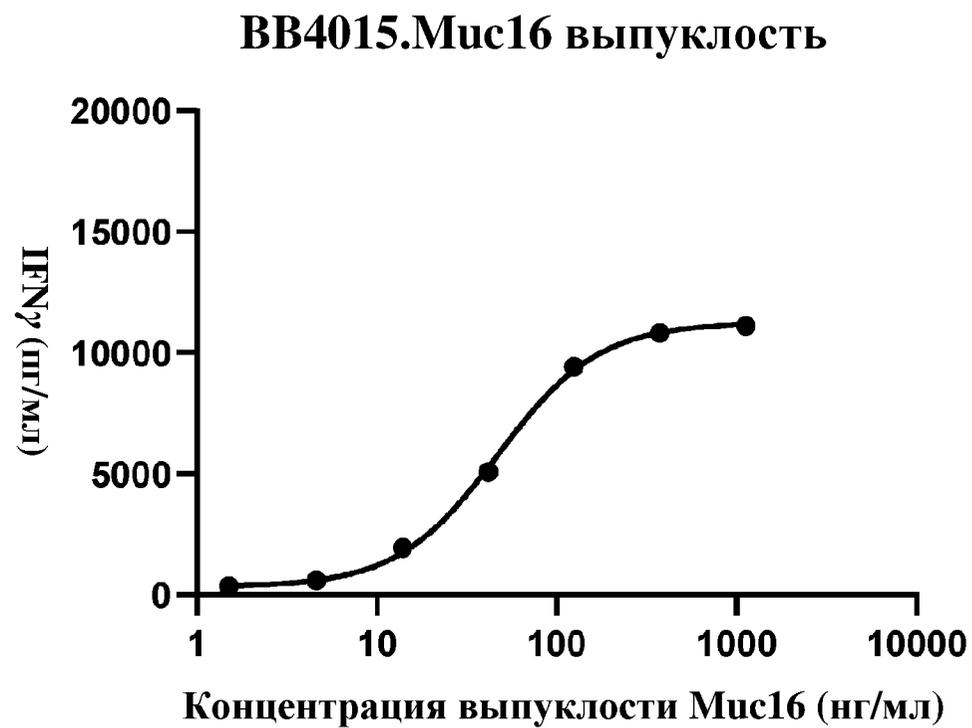
**ФИГ. 8А**



**ФИГ. 8В**

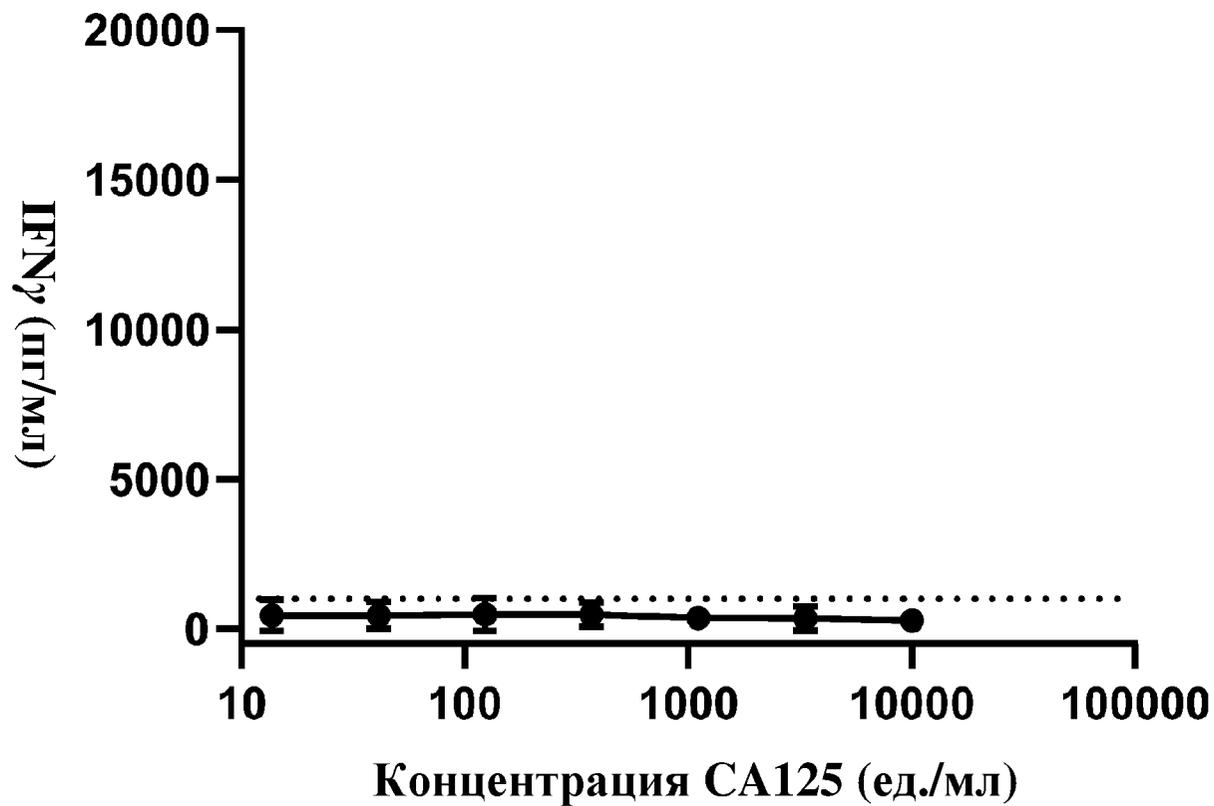


Фиг. 9

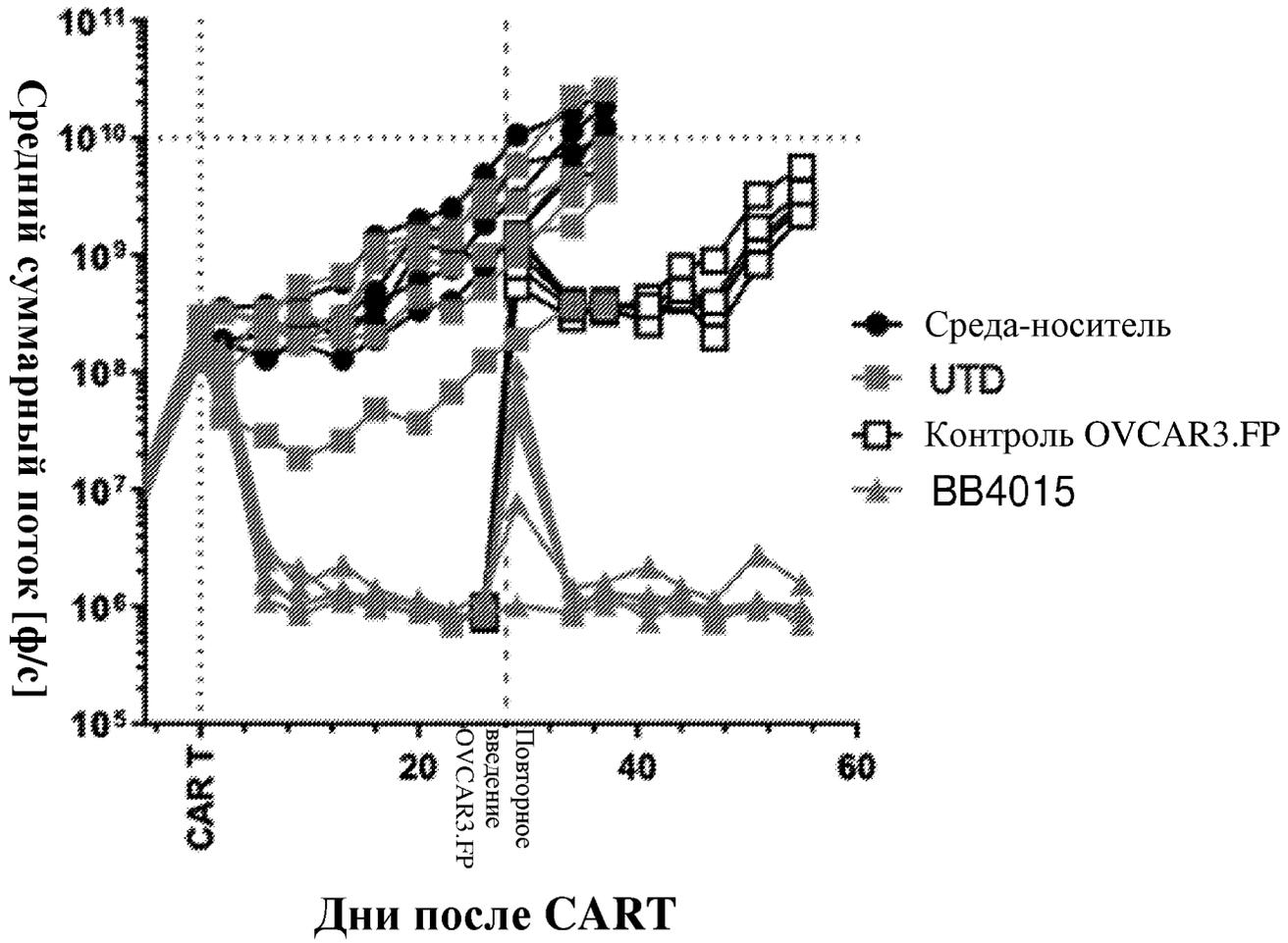


**ФИГ. 10А**

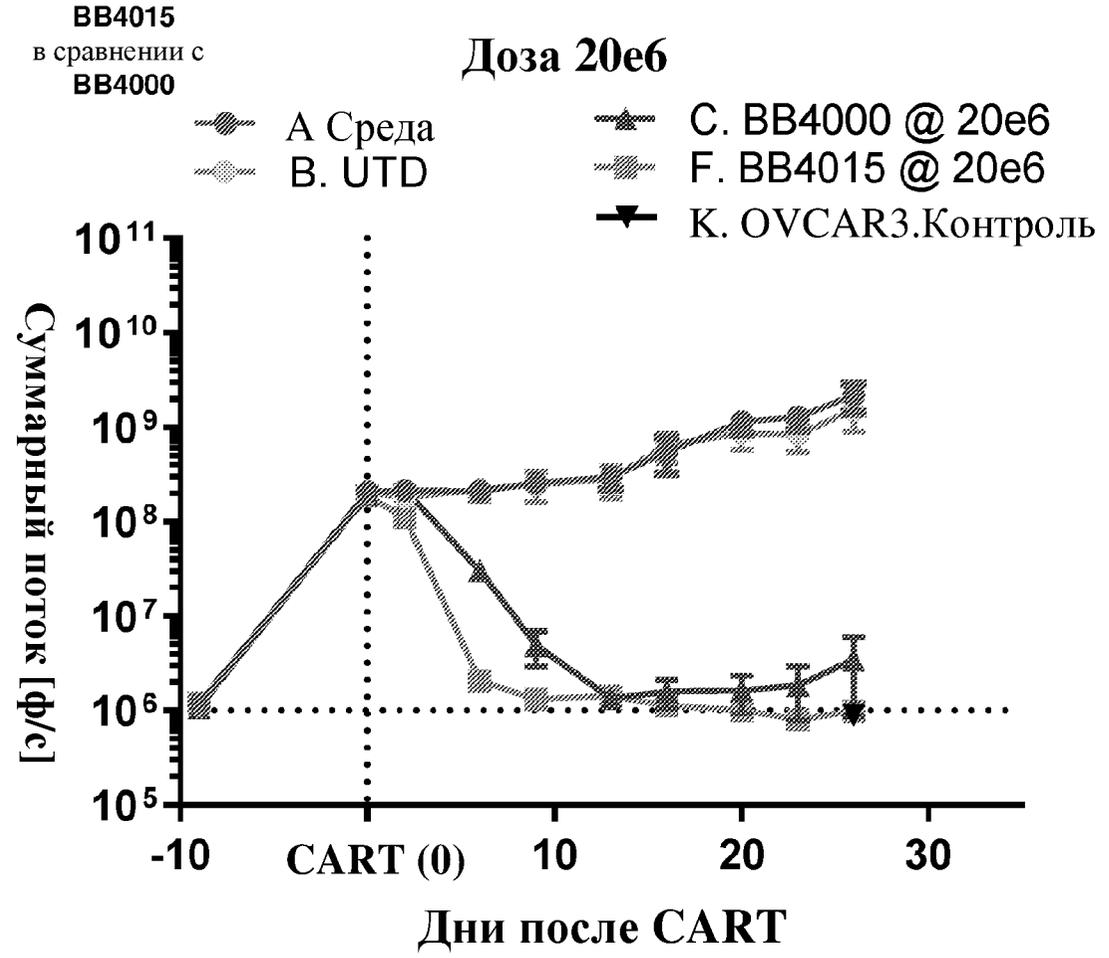
# BB4015.CA125



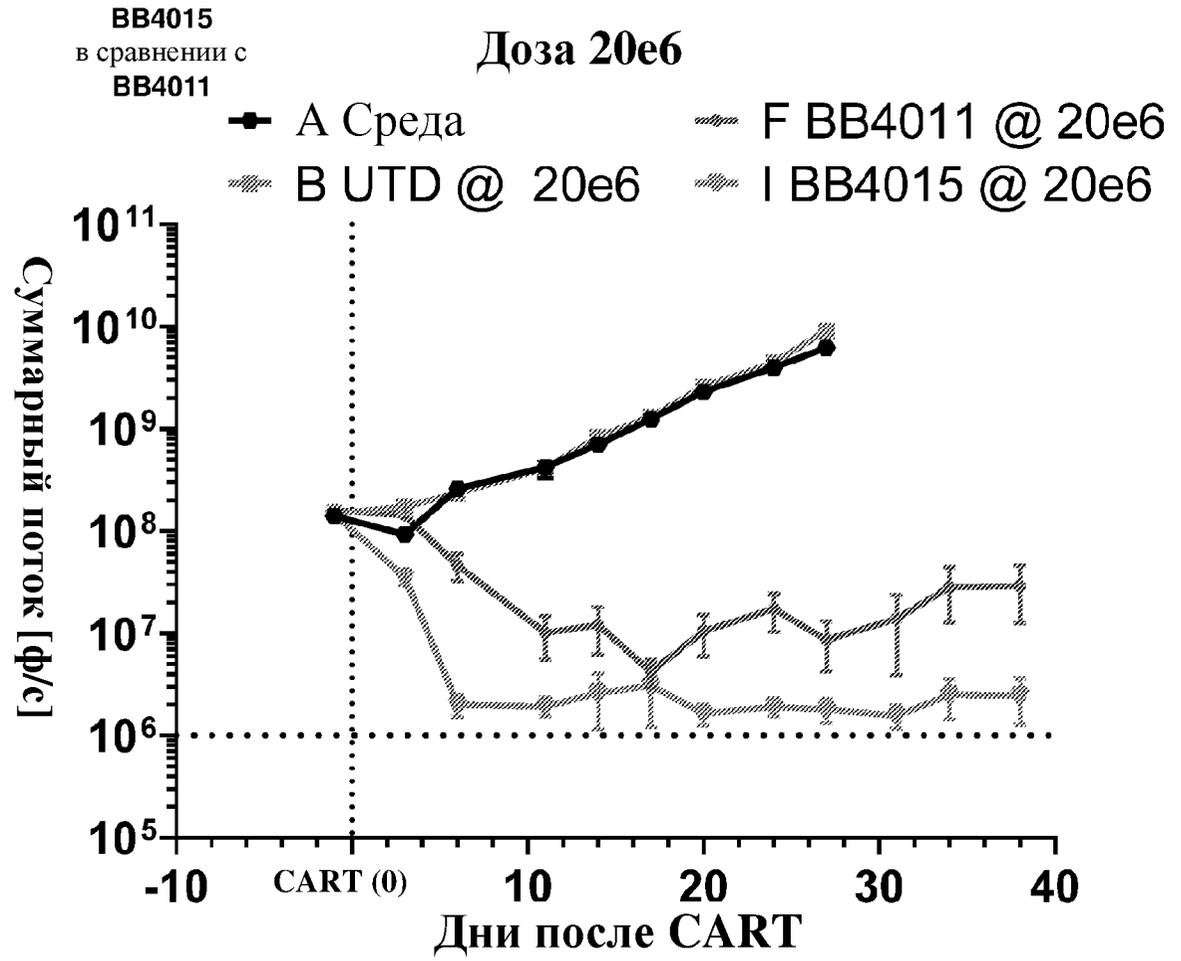
*ФИГ. 10В*



ФИГ. 11



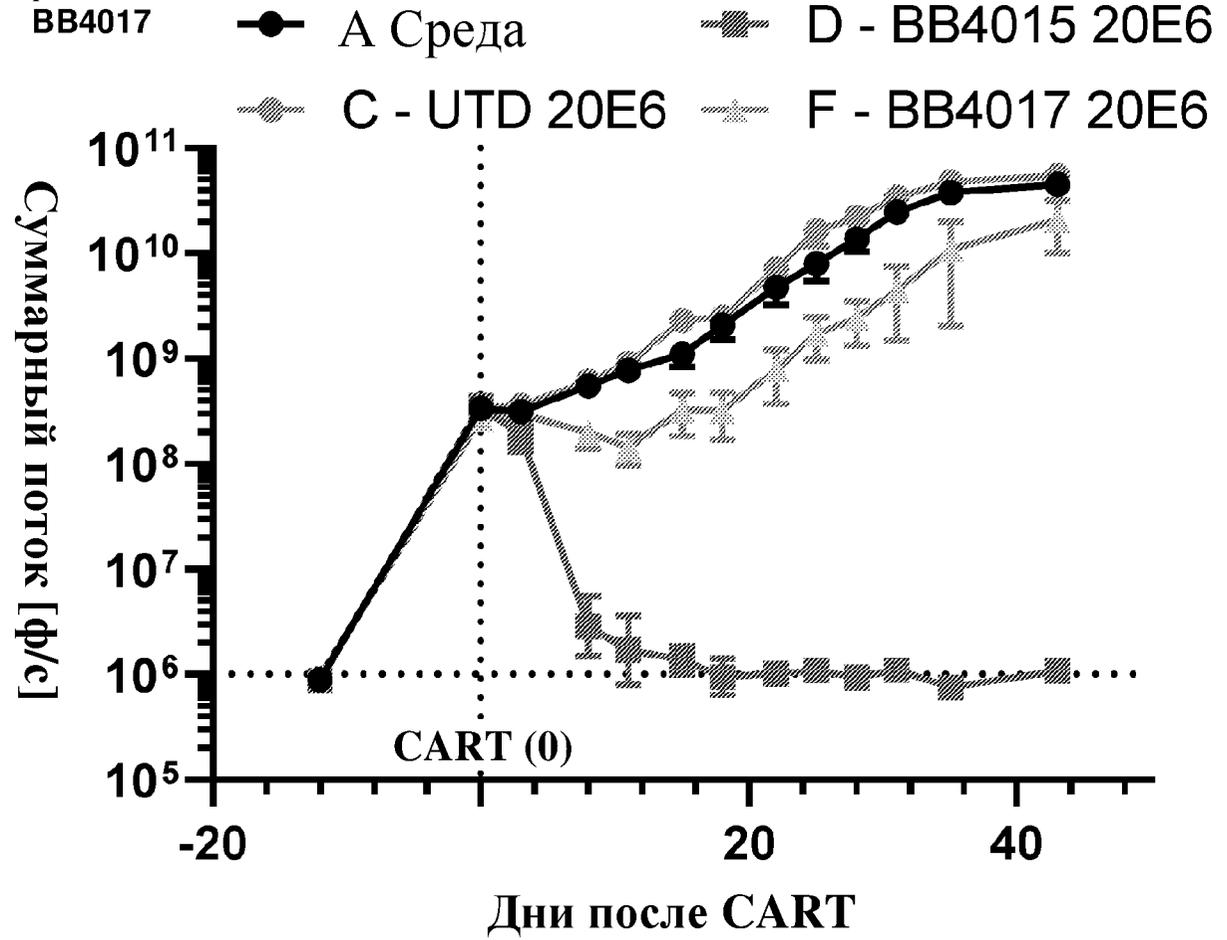
ФИГ. 12А



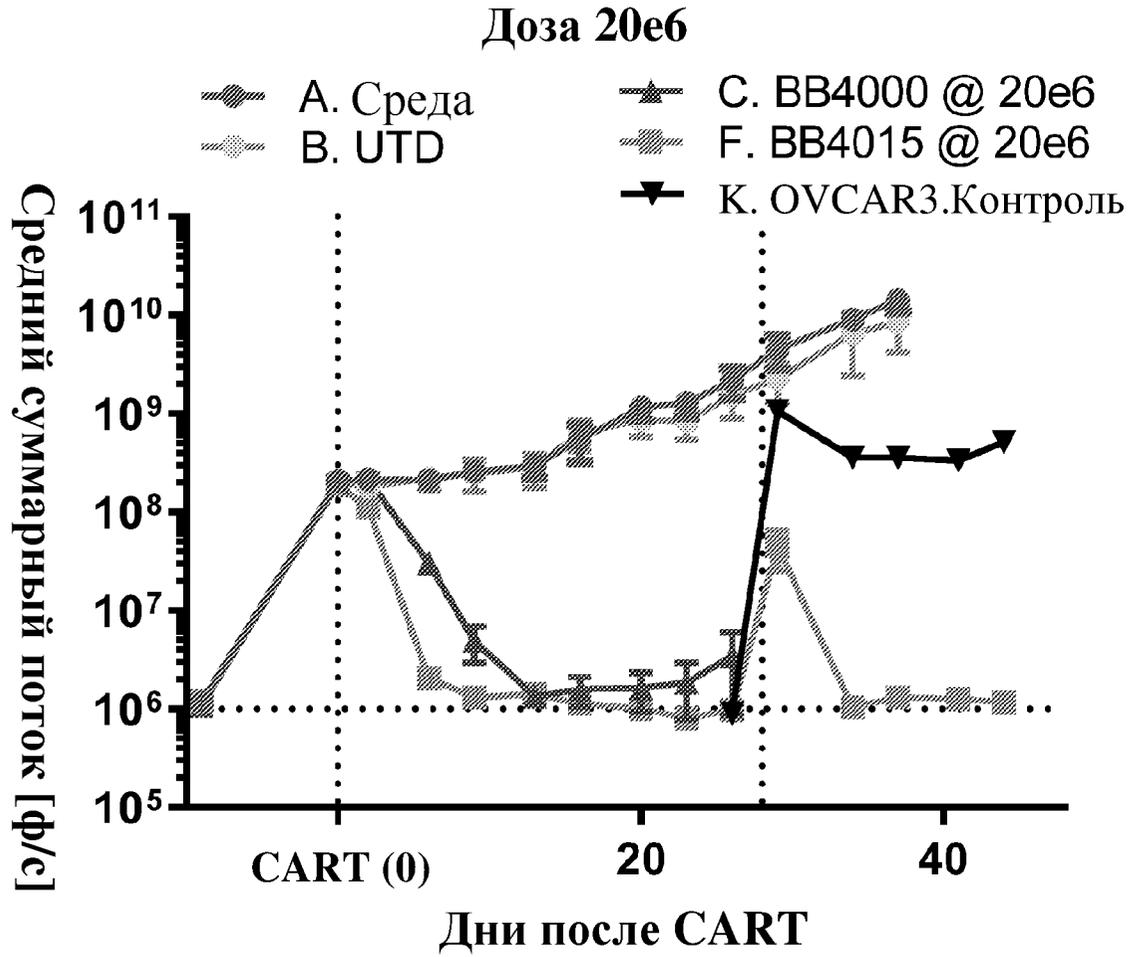
**ФИГ. 12В**

# Дозы 20е6

ВВ4015  
в сравнении с  
ВВ4017

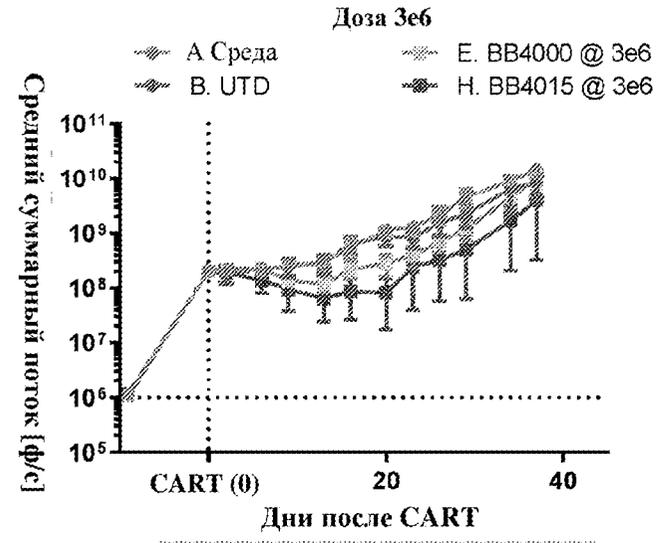


ФИГ. 12С

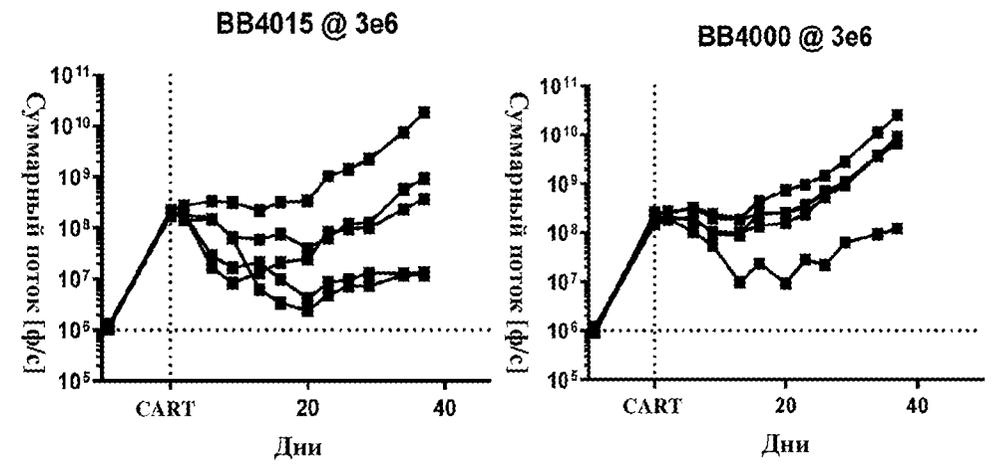


**ФИГ. 13А**





*Кривые опухолей отдельных мышечей*



ФИГ. 13С