



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **120247** (13) **C2**

(51) МПК (2019.01)

C07K 16/30 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2015 06107	(73) Власник(и):	САНОФИ,
(22) Дата подання заявки:	20.11.2013		54 rue la Boétie, F-75008 Paris, France (FR)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	11.11.2019	(74) Представник:	Бочаров Максим Анатолійович, реєстр. №367
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	12306444.6	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	Blumenthal R. et al. Inhibition of adhesion, invasion, and metastasis by antibodies targeting CEACAM6 (NCA-90) and CEACAM5 (carcinoembryonic antigen). Cancer research, 2005, Vol. 65, No. 19, P. 8809-8817
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	20.11.2012		Peng L. et al. The CEA/CD3-bispecific antibody MED1-565 (MT111) binds a nonlinear epitope in the full-length but not a short splice variant of CEA. PLOS ONE, 2012, Vol. 7, No. 5, P. 1-14
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	EP		WO 2012117002 A1, 07.09.2012
(41) Публікація відомостей про заявку:	25.11.2015, Бюл.№ 22		Schmidt M. et al. Kinetics of anti-carcinoembryonic antigen antibody internalization: effects of affinity, bivalency, and stability. Cancer immunology immunotherapy, 2008, Vol. 57, P. 1879-1890
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	11.11.2019, Бюл.№ 21		Oberst M. et al. In vitro pharmacological comparison of a carcinoembryonic antigen (CEA/CD3) bispecific cynomolgus-reactive biosimilar BiTE antibody (CyS111) biosimilar with the clinical candidate MEDI-565 (MT111). Proceedings of the American association for cancer research, Annual meeting, 2009, Vol. 56, P. 786
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/EP2013/074291, 20.11.2013		
(72) Винахідник(и):	Берн П'єр-Франсуа (FR), Бланш Франсіс (FR), Бушар Ерве (FR), Камерон Беатріс (FR), Дабдубі Тарік (FR), Декарі Стефані (FR), Феррарі Поль (FR), Рак Алексєй (FR)		

(54) АНТИТІЛО ДО СЕАСАМ5 І ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ

(57) Реферат:

Винахід стосується виділеного антитіла або його зв'язувального фрагмента, яке зв'язується з доменом АЗ-ВЗ білків СЕАСАМ5 людини і Масаса fascicularis, виділеної нуклеїнової кислоти, вектора, клітини-хазяїна. Винахід також стосується імунокон'югата, що містить дане антитіло, кон'юговане або зв'язане з інгібуючим ріст агентом, фармацевтичної композиції, що містить

UA 120247 C2

антитіло або імунокон'югат, застосування даного антитіла для лікування злоякісного новоутворення, а також застосування антитіла для ex vivo детекції експресії CEACAM5 в біологічному зразку.

Даний винахід стосується антитіл, що специфічно зв'язуються з білками CEACAM5 людини і *Mascas fascicularis*, а також виділених нуклеїнових кислот, векторів і клітин-хазяїнів, що містять послідовності, кодуєчі зазначені антитіла. Винахід також стосується імунокон'югатів, що містять зазначені антитіла, кон'юговані або зв'язані з інгібуючим ріст засобом, і фармацевтичних композицій, що містять антитіла або імунокон'югати за винаходом. Винахід стосується застосування антитіл або імунокон'югатів за винаходом для лікування злоякісних пухлин або у діагностичних цілях.

Раково-ембріональний антиген (PEA) являє собою глікопротеїн, залучений у клітинну адгезію. Уперше PEA ідентифікували в 1965 (Gold and Freedman, J. Exp. Med., 121, 439, 1965) як білок, у нормі експресований зародковим кишечником протягом перших шести місяців вагітності і виявлений в злоякісних пухлинах підшлункової залози, печінки і кишечника. Сімейство PEA належить до імуноглобулінового суперсімейства. Сімейство PEA складається з 18 генів і підрозділяється на дві підгрупи білків: підгрупу споріднених раково-ембріональному антигену молекул клітинної адгезії (CEACAM) і підгрупу специфічного для вагітності глікопротеїну (Kammerer & Zimmermann, BMC Biology 2010, 8:12).

У людей підгрупа CEACAM складається з 7 членів: CEACAM1, CEACAM3, CEACAM4, CEACAM5, CEACAM6, CEACAM7, CEACAM8. Численні дослідження показали, що CEACAM5, ідентичний початково ідентифікованому PEA, високо експресований на поверхні клітин колоректальних пухлин, клітин пухлин шлунка, легень, молочних залоз, передміхурової залози, яєчника, шийки матки і сечового міхура і слабо експресований у невеликій кількості в нормальних епітеліальних тканинах, таких як клітини циліндричного епітелію і бокалоподібні клітини в товстій кишці, слизисті клітини шийки в шлунку і клітини плоского епітелію в стравоході і шийці матки (Hammarstrom et al. 2002, in "Tumor markers, Physiology, Pathobiology, Technology and Clinical Applications" Eds. Diamandis E. P. et al., AACR Press, Washington pp. 375). Таким чином, CEACAM5 може являти собою терапевтичну мішень, придатну для підходів пухлинспецифічної спрямованої доставки, таких як імунокон'югати. Даний винахід стосується моноклональних антитіл до CEACAM5 і демонструє, що їх можна кон'югувати з цитотоксичним засобом для індукції цитотоксичної активності, здатної приводити до знищення пухлинних клітин *in vitro*, і для індукції регресу пухлини *in vivo*.

Позаклітинні домени представників сімейства CEACAM складаються з повторюваних імуноглобуліноподібних (Ig-подібних) доменів, які підрозділяють на 3 типи, A, B і N, залежно від гомології послідовностей. CEACAM5 містить сім таких доменів, а саме N, A1, B1, A2, B2, A3 і B3.

Домени CEACAM5 A1, A2 і A3, з одного боку, і домени CEACAM5 B1, B2 і B3, з іншого боку, демонструють високу гомологію послідовностей, домени A CEACAM5 людини демонструють від 84 до 87 % парної подібності послідовностей і домени B - від 69 до 80 %. Крім того, інші представники CEACAM людини, що містять у своїй структурі домени A і/або B, а саме CEACAM1, CEACAM6, CEACAM7 і CEACAM8, демонструють гомологію з CEACAM5 людини. Зокрема, домени A і B білка CEACAM6 людини демонструють гомологію послідовностей з доменами A1 і A3 і з будь-яким з доменів B1-B3 CEACAM5 людини, відповідно, яка навіть вище, ніж гомологія, спостережувана у доменів A і доменів B CEACAM5 людини.

З метою орієнтованої на PEA діагностики або терапії одержана множина антитіл до PEA. Як проблему в цій галузі завжди вказували специфічність до споріднених антигенів, наприклад Sharkey et al. (1990, Cancer Research 50, 2823). Унаслідок зазначеної вище гомології деякі з раніше описаних антитіл можуть демонструвати зв'язування з повторюваними епітопами CEACAM5, присутніми у різних імуноглобулінових доменах, демонструючи перехресну реактивність з іншими представниками CEACAM, такими як CEACAM1, CEACAM6, CEACAM7 або CEACAM8, з відсутністю специфічності до CEACAM5. Виходячи з орієнтованої на PEA терапії, бажана специфічність антитіл до CEACAM5 так, щоб вони зв'язувалися з експресуючими CEACAM5 людини пухлинними клітинами, але не зв'язувалися з деякими нормальними тканинами, експресуючими інших представників CEACAM. Варто звернути увагу на те, що CEACAM1, CEACAM6 і CEACAM8 описані як експресовані нейтрофілами людини і приматів, що не є людиною (Ebrahimmnejad et al., 2000, Exp. Cell Res., 260, 365; Zhao et al., 2004, J. Immunol. Methods, 293, 207; Strickland et al., 2009, J. Pathol., 218, 380), де показано, що вони регулюють гранулоцитопоез і відіграють певну роль в імунній відповіді.

Описаний кон'югат антитіла до CEACAM6 і лікарського засобу, такий як антитіло до CEACAM6 з майтанзиноїдом, розроблений Genentech (Strickland et al., 2009, J. Pathol., 218, 380), для якого показано, що він індукує залежну від CEACAM6 гематопоетичну токсичність у приматів, що не є людиною. Автори розглядали цю токсичність, пов'язану з накопиченням кон'югата антитіла з лікарським засобом у кістковому мозку й елімінацією гранулоцитів і їх клітин-попередників, як основний фактор небезпеки. Таким чином, більш точно, у

терапевтичних цілях, перехресна реактивність антитіла до CEACAM5 з CEACAM1, CEACAM6, CEACAM7 або CEACAM8 може знижувати терапевтичний індекс сполуки, збільшуючи токсичність для нормальних тканин. Таким чином, від одержання антитіл, специфічно спрямованих до CEACAM5, що перехресно не реагують з іншими молекулами сімейства CEACAM, існує велика користь, особливо для застосування як кон'югата антитіла з лікарським засобом (ADC) або з будь-яким іншим механізмом дії, що приводить до знищення клітини-мішені.

Крім того, оскільки CEACAM5 описаний як експресований, хоча і на низькому рівні, у деяких нормальних клітинних тканинах, необхідно розробити антитіла до CEACAM5, здатні зв'язуватися з CEACAM5 людини, а також з CEACAM5 яванського макака (*Macaca fascicularis*), оскільки такі антитіла можна легко тестувати у доклінічних токсикологічних дослідженнях у яванських макаків з оцінкою їх показників безпеки. Хоча було показано, що ефективність терапевтичних антитіл може залежати від локалізації епітопа в мішені, як у випадку функціональних антитіл (Doern et al. 2009, J. Biol. Chem. 284, 10254), так і у випадку, коли залучені ефекторні функції (Beers et al. Semin. Hematol. 47:107-114), потрібно продемонструвати, що реагуюче перехресно антитіло людини/мави зв'язує епітопи в тих же повторюваних Ig-подібних гомологічних доменах білків людини і яванського макака.

Комбінація необхідності у видовій перехресній реактивності таких антитіл зі специфічністю відносно CEACAM5 людини і *Macaca fascicularis*, наприклад з відсутністю перехресної реактивності з іншими представниками CEACAM *Macaca fascicularis* і людини, додає додатковий рівень складності, враховуючи загальну гомологію послідовностей білків CEACAM людини і *Macaca fascicularis*.

Фактично, загальне парне вирівнювання послідовності CEACAM5 *Macaca fascicularis* з послідовністю CEACAM5 людини (AAA51967.1/GI:180223, 702 амінокислоти) продемонструвало тільки 78,5 % ідентичність. Гени CEACAM1, CEACAM5 і CEACAM6 *Macaca fascicularis* клоновані і проведено загальне вирівнювання доменів A, B і N людини і *Macaca fascicularis*. За допомогою цього вирівнювання попередньо визначено, що існує дуже мало областей, якщо вони взагалі існують, для локалізації ідеального епітопа, який був би загальним для CEACAM5 людини і макака і не був би загальним з іншим представником сімейства. З цих причин очікувалося, що розробка антитіл, які перехресно реагують з CEACAM5 людини і *Macaca fascicularis* без перехресної реактивності з іншими представниками CEACAM людини і *Macaca fascicularis*, буде мати низьку імовірність успіху. Слід зазначити, що раніше описані антитіла до CEACAM5 фактично ніколи не були документально доведені відносно перехресної реактивності у *Macaca fascicularis*, з дуже невеликими виключеннями (MT111, див. нижче).

У клінічних випробуваннях вже використовувалися антитіла до CEACAM5 людини, такі як лабетумаб Immunomedics (також відомий як hMN14, Sharkey et al., 1995, Cancer Research, 55, 5935). Показано, що це антитіло не зв'язується зі спорідненими антигенами, але перехресно не реагує з CEACAM5 *Macaca fascicularis*. Слід зазначити, що антитіло MT111 Micromet (також відоме як антитіло MEDI-565 MedImmune) являє собою біспецифічне антитіло, що зв'язується з CEACAM5 людини і CD3 людини (Peng et al., PLoS ONE, 7(5):e3641; WO 2007/071426). Зазначено, що MT111 одержане за допомогою злиття одноланцюжкового варіабельного фрагмента (scFv) антитіла, що розпізнає CEACAM5 людини і яванського макака, з scFv антитіла, що розпізнає CD3 людини (постер Oberst et al., AACR Annual Meeting April 2009, Denver, CO). Також опубліковано, що MT111 не зв'язується з іншими представниками сімейства CEACAM (Peng et al., PLoS ONE, 7(5):e3641). MT111 зв'язується з конформаційним епітопом у домені A2 CEACAM5 людини. Цей конформаційний епітоп відсутній у варіанті сплайсингу CEACAM5 людини, який, поряд з повнорозмірним CEACAM5, експресований на пухлинах (Peng et al., PLoS ONE, 7(5):e3641). Крім того, доказів, що MT111 зв'язується з тим же епітопом у CEACAM5 *Macaca fascicularis*, немає.

З метою одержання нових антитіл до поверхневого білка CEACAM5 з оптимальними для терапевтичних цілей характеристиками автори винаходу імунізували мишей рекомбінантними білками і пухлинними клітинами. Вони піддали скринінгу сотні гібридом з використанням ELISA на декілька рекомбінантних білків сімейства CEACAM і проточної цитометрії з відповідними лініями клітин для відбору тільки імуноглобулінів (IgG) з переважними характеристиками. Несподівано, вони змогли відібрати гібридомні клони й одержати відповідні зрілі IgG, що мають усі бажані характеристики. Вони з високою афінністю специфічно зв'язуються з доменом A3-B3 CEACAM5 людини і не розпізнають білки CEACAM1, CEACAM6, CEACAM7 і CEACAM8 людини. Відносно клітин ці антитіла демонструють високу афінність відносно пухлинних клітин (у наномолярному діапазоні). Крім того, ці антитіла також зв'язуються з білком CEACAM5 *Macaca fascicularis* з відношенням афінностей у мавпи/людини, що менше або дорівнює 10. Антитіла за

винаходом специфічно зв'язуються з доменом A3-B3 CEACAM5 *Macaca fascicularis* і не розпізнають інших представників CEACAM *Macaca fascicularis*.

Внаслідок націлювання на домен A3-B3 CEACAM5 ці антитіла мають збільшений потенціал до ураження пухлин, оскільки вони мають здатність до зв'язування як з повнорозмірним CEACAM5 людини, так і з його варіантом сплайсингу, ідентифікованим Peng et al. (PLoS ONE, 7(5):e3641).

Нарешті, CEACAM5 описаний у літературі як поверхневий білок, що погано інтерналізується (розглянуто у Schmidt et al., 2008, Cancer Immunol. Immunother. 57, 1879), і, таким чином, не може бути придатною мішенню для кон'югатів антитіл з лікарськими засобами. Незважаючи на те, що було опубліковано на відомому рівні техніки, автори винаходу продемонстрували, що антитіла, які вони одержали, здатні приводити до інтерналізації комплексу CEACAM5-антитіло після зв'язування і при комбінації з цитотоксичним засобом індукувати цитотоксичну активність відносно пухлинних клітин *in vitro*. Ці ж антитіла, комбіновані з цитотоксичним засобом, також здатні до суттєвого інгібування росту пухлини у мишей, що несуть первинні пухлини товстої кишки і шлунка людини.

Визначення

Як використовують у даному описі, "CEACAM5" означає "споріднену раково-ембріональному антигену молекулу клітинної адгезії 5", також відому як "CD66e" (кластер диференціювання 66e) або PEА. CEACAM5 являє собою глікопротеїн, залучений у клітинну адгезію. CEACAM5 високо експресований, зокрема на поверхні клітин колоректальних пухлин, клітин пухлин шлунка, легень і матки.

Еталонна послідовність повнорозмірного CEACAM5 людини, що містить сигнальний пептид (положення 1-34) і пропептид (положення 686-702), доступна в базі даних GenBank під номером доступу AAA51967.1 (SEQ ID NO:52). В європеїдній популяції ідентифіковано п'ять несинонімічних SNP з частотою, більшою 2 %, чотири з них локалізовані в домені N (у положеннях 80, 83, 112, 113) і останній - у домені A2 (у положенні 398) CEACAM5 людини (SEQ ID NO:58). GenBank AAA51967.1 містить основний гаплотип (I80, V83, I112, I113 і E398).

Послідовність позаклітинного домену CEACAM5 *Macaca fascicularis*, клонована авторами винаходу, описана в SEQ ID NO:53.

"Домен" може являти собою будь-яку область білка, як правило, визначувану на основі гомологій послідовностей, і часто належить до конкретної структурної або функціональної структури. Відомо, що представники сімейства CEACAM складаються з Ig-подібних доменів. Термін домен у даному описі, використовують для позначення окремих Ig-подібних доменів, таких як "домен N", або для груп послідовних доменів, таких як "домен A3-B3".

Доменна організація CEACAM5 людини є наступною (на основі послідовності AAA51967.1 GenBank; SEQ ID NO:52):

Домени CEACAM5 людини	Положення в SEQ ID NO:52
Домен N	35-142
Домен A1	143-237
Домен B1	238-320
Домен A2	321-415
Домен B2	416-498
Домен A3	499-593
Домен B3	594-685

Таким чином, домен A3-B3 CEACAM5 людини складається з амінокислот у положеннях 499-685 SEQ ID NO:52.

Доменна організація CEACAM5 *Macaca fascicularis* є наступною (на основі клонованої послідовності позаклітинного домену; SEQ ID NO:53):

Домени CEACAM5 <i>Macaca fascicularis</i>	Положення в SEQ ID NO:53
Домен N-A1-B1	-1-286
Домен A2-B2	-287-464
Домен A3-B3	465-654

Таким чином, домен A3-B3 CEACAM5 *Macaca fascicularis* складається з амінокислот у положеннях 465-654 SEQ ID NO:53.

"Кодуюча послідовність" або послідовність, "кодуюча" продукт експресії, такий як РНК, поліпептид, білок або фермент, являє собою нуклеотидну послідовність, яка при експресії

приводить до продукції цих РНК, поліпептиду, білка або ферменту, тобто нуклеотидна послідовність кодує амінокислотну послідовність цього поліпептиду, білка або ферменту. Кодуюча білок послідовність може містити старт-кодон (як правило, АТГ) і стоп-кодон.

Як використовують у даному описі, указання на конкретні білки (наприклад, антитіла) може включати поліпептид з природною амінокислотною послідовністю, а також варіанти і модифіковані форми незалежно від їх походження або способу одержання. Білок з природною амінокислотною послідовністю являє собою білок з такою ж амінокислотною послідовністю, як одержують із природних джерел. Такі білки з природною послідовністю можна виділяти з природних джерел або можна одержувати стандартними рекомбінантними способами і/або способами синтезу. Білки з природною послідовністю конкретно включають природні укорочені або розчинні форми, варіанти природних форм (наприклад, альтернативно сплайсовані форми), природні алельні варіанти і форми, що включають посттрансляційні модифікації. Білки з природною послідовністю включають білки, що несуть посттрансляційні модифікації, такі як глікозилювання або фосфорилування, або інші модифікації визначених амінокислотних залишків.

Термін "ген" означає послідовність ДНК, кодуючу або відповідну конкретній послідовності амінокислот, яка включає весь або частину одного або декількох білків або ферментів, і може включати або не включати регуляторні послідовності ДНК, такі як промоторні послідовності, що визначають, наприклад, умови, у яких відбувається експресія гена. Деякі гени, що не є структурними генами, можуть транскрибуватися з ДНК у РНК, але не транслюватися в амінокислотну послідовність. Інші гени можуть функціонувати як регулятори структурних генів або як регулятори транскрипції ДНК. Зокрема, термін ген може призначатися для геномної послідовності, кодуючої білок, тобто послідовності, що містить послідовності регулятора, промотору, інтронів і екзонів.

Послідовність, "щонайменше на 85 % ідентична еталонній послідовності", являє собою послідовність, по усій своїй довжині на 85 % або більше, наприклад 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 %, ідентичну зі всією еталонною послідовністю.

Відсоток "ідентичності послідовностей" можна визначати, порівнюючи дві послідовності, оптимально вирівняні у вікні порівняння, де частина полінуклеотидної або поліпептидної послідовності у вікні порівняння для оптимального вирівнювання двох послідовностей може містити додавання або делеції (тобто пропуски) у порівнянні з еталонною послідовністю (яка не містить додавань або делецій). Відсоток розраховують, визначаючи кількість положень, у яких в обох послідовностях знаходиться ідентичний залишок основи нуклеїнової кислоти або амінокислоти, з одержанням кількості співпадаючих положень, ділячи кількість співпадаючих положень на загальну кількість положень у вікні порівняння і множачи результат на 100 з одержанням відсотка ідентичності послідовностей. Оптимальне вирівнювання послідовностей для порівняння проводять за допомогою глобального парного вирівнювання, наприклад, з використанням алгоритму Нідлмана і Вунша, J. Mol. Biol. 48:443 (1970). Відсоток ідентичності послідовностей можна легко визначати, наприклад, з використанням програми Needle, з матрицею BLOSUM62, і наступних параметрів штраф за створення пропуску=10, штраф за продовження пропуску=0,5.

"Консервативна амінокислотна заміна" являє собою амінокислотну заміну, у якій амінокислотний залишок замінюють іншим амінокислотним залишком з групою R бічного ланцюга з подібними хімічними властивостями (наприклад, зарядом, розміром або гідрофобністю). Як правило, консервативна амінокислотна заміна змінює функціональні властивості білка незначно. Приклади груп амінокислот, що містять бічні ланцюги з подібними хімічними властивостями, включають 1) аліфатичні бічні ланцюги: гліцин, аланін, валін, лейцин і ізолейцин; 2) бічні ланцюги з аліфатичною гідроксильною групою: серин і треонін; 3) бічні ланцюги, що містять амід: аспарагін і глутамін; 4) ароматичні бічні ланцюги: фенілаланін, тирозин і триптофан; 5) основні бічні ланцюги: лізин, аргінін і гістидин; 6) кислотні бічні ланцюги: аспарагінова кислота і глутамінова кислота; і 7) сірковмісні бічні ланцюги: цистеїн і метіонін. Групи для консервативних амінокислотних заміन також можна визначати на основі розміру амінокислот.

"Антитіло" може бути природним або звичайним антитілом, у якому два важкі ланцюги зв'язані один з одним дисульфідними зв'язками і кожен важкий ланцюг зв'язаний дисульфідним зв'язком з легким ланцюгом. Існує два типи легких ланцюгів, лямбда (l) і каппа (k). Існує п'ять основних класів (або ізотипів) важких ланцюгів, що визначають функціональну активність молекул антитіл: IgM, IgD, IgG, IgA і IgE. Кожен ланцюг містить визначену послідовність доменів. Легкий ланцюг містить два домени або області, варіабельний домен (VL) і константний домен (CL). Важкий ланцюг містить чотири домени, варіабельний домен (VH) і три константних домени

(CH1, CH2 і CH3, у сукупності позначувані як CH). Варіабельні області легких (VL) і важких (VH) ланцюгів визначають розпізнавання і специфічність антигену при зв'язуванні. Домени константних областей легких (CL) і важких (CH) ланцюгів забезпечують важливі біологічні властивості, такі як асоціація ланцюгів антитіл, секреція, проходження трансплацентарного бар'єра, зв'язування комплементу і зв'язування з рецепторами Fc (FcR). Фрагмент Fv являє собою N-кінцеву частину фрагмента Fab імуноглобуліну і складається з варіабельних частин одного легкого ланцюга й одного важкого ланцюга. Специфічність антитіла полягає в структурній комплементарності ділянки зв'язування антитіла й антигенної детермінанти. Ділянки зв'язування антитіл складені з залишків, що переважно знаходяться в гіперваріабельних областях або областях, що визначають комплементарність (CDR). Іноді на загальну структуру домену і, таким чином, на ділянку зв'язування впливають залишки з негіперваріабельних або каркасних областей (FR). Таким чином, області, що визначають комплементарність, або CDR, належать до послідовностей амінокислот, які спільно визначають афінність і специфічність зв'язування природної області Fv природних ділянок зв'язування імуноглобулінів. Кожний з легких і важких ланцюгів імуноглобулінів містить три CDR, що позначаються CDR1-L, CDR2-L, CDR3-L і CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H, відповідно. Таким чином, звичайна антигензв'язувальна ділянка антитіла містить шість CDR, що включають набір CDR з кожної області V важкого і легкого ланцюгів.

"Каркасні області" (FR) належать до послідовностей амінокислот, що знаходяться між CDR, тобто до тих частин варіабельних областей легких і важких ланцюгів імуноглобулінів, що є відносно консервативними у різних імуноглобулінів одного виду. Кожний з легких і важких ланцюгів імуноглобуліну містить чотири FR, що позначаються FR1-L, FR2-L, FR3-L, FR4-L і FR1-H, FR2-H, FR3-H, FR4-H, відповідно.

Як використовують у даному описі, "каркасна область людини" являє собою каркасну область, яка по суті ідентична (приблизно на 85 % або більше, наприклад 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 %) каркасній області природного антитіла людини.

У контексті винаходу визначення CDR/FR у легких або важких ланцюгах імуноглобулінів варто проводити на основі визначення IMGT (Lefranc et al. Dev. Comp. Immunol., 2003, 27(1):55-77; www.imgt.org).

Як використовують у даному описі, термін "антитіло" означає звичайні антитіла і їх фрагменти, а також однодоменні антитіла і їх фрагменти, зокрема варіабельні області важких ланцюгів однодоменних антитіл, і химерні, гуманізовані, біспецифічні або поліспецифічні антитіла.

Як використовують у даному описі, антитіло або імуноглобулін також включає "однодоменні антитіла", які описані зовсім нещодавно і які являють собою антитіла, у яких області, що визначають комплементарність, є частиною однодоменного поліпептиду. Приклади однодоменних антитіл включають антитіла з важких ланцюгів, антитіла, позбавлені легких ланцюгів від природи, однодоменні антитіла, одержувані зі звичайних чотириланцюжкових антитіл, сконструйовані однодоменні антитіла. Однодоменні антитіла можна одержувати у будь-яких видів, включаючи, але не обмежуючись ними, мишу, людину, верблюда, ламу, козу, кролика, корову. Однодоменні антитіла можуть являти собою природні однодоменні антитіла, відомі як антитіла з важких ланцюгів, позбавлені легких ланцюгів. Зокрема, антитіла з важких ланцюгів, від природи позбавлені легких ланцюгів, продукують види Camelidae, наприклад верблюд, одnogорбий верблюд, лама, альпака і гуанако. В антитілах з важких ланцюгів сімейства верблюдячих також відсутній домен CH1.

Варіабельна область важкого ланцюга цих однодоменних антитіл, позбавлених легких ланцюгів, відома в даній галузі як "VHH" або "нанотіло". Подібно звичайним доменам VH, VHH містить чотири FR і три CDR. Нанотіла мають визначені переваги над звичайними антитілами: вони приблизно в десять разів менше, ніж молекули IgG, і, як наслідок, правильно згорнуті функціональні нанотіла можна одержувати за допомогою експресії *in vitro*, досягаючи при цьому високого виходу. Крім того, нанотіла є дуже стабільними і стійкими до дії протеаз. Властивості і продукція нанотіл розглянуті в Harmsen and De Haard H.J. (Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007 Nov; 77(1):13-22).

Як використовують у даному описі, термін "моноклональне антитіло", або "mAb", стосується молекули антитіла однієї амінокислотної послідовності, що спрямована до конкретного антигену, і його не слід витлумачувати як потребуючий продукції антитіла яким-небудь конкретним способом. Моноклональне антитіло можна одержувати за допомогою одного клону або В-клітини гібридами, а також воно може бути рекомбінантним, тобто одержаним за допомогою білкової інженерії.

Термін "химерне антитіло" стосується сконструйованого антитіла, яке, у найбільш широкому розумінні, містить одну або декілька областей з одного антитіла й одну або декілька областей з одного або декількох інших антитіл. В одному з варіантів здійснення химерне антитіло містить домен VH і домен VL антитіла, одержаний у тварини, що не є людиною, в асоціації з доменом CH і доменом CL іншого антитіла, в одному з варіантів здійснення антитіла людини. Як тварину, що не є людиною, можна використовувати будь-яку тварину, таку як миша, шур, хом'як, кролик або т. п. Химерне антитіло також може означати поліспецифічне антитіло зі специфічністю щонайменше відносно двох різних антигенів.

Термін "гуманізоване антитіло" стосується антитіла, яке повністю або частково походить від тварини, що не є людиною, і яке модифіковане з заміною визначених амінокислот, наприклад у каркасних областях доменів VH і VL, для уникнення або мінімізації імунної відповіді у людей. Константні домени гуманізованого антитіла здебільшого є доменами CH і CL людини.

"Фрагменти" (звичайних) антитіл містять частину інтактного антитіла, зокрема антигензв'язувальної області або варіабельної області інтактного антитіла. Приклади фрагментів антитіл включають Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, (dsFv)₂, scFv, sc(Fv)₂, діатіла, біспецифічні і поліспецифічні антитіла, одержані з фрагментів антитіл. Фрагмент звичайного антитіла також може бути однодоменим антитілом, таким як антитіло з важкого ланцюга або VHH.

Термін "Fab" означає фрагмент антитіла з молекулярною масою приблизно 50000 і антигензв'язувальною активністю, у якому за допомогою дисульфідного зв'язку зв'язана приблизно половина N-кінцевої ділянки важкого ланцюга і весь легкий ланцюг. Як правило, його одержують із фрагментів за допомогою обробки IgG протеазою папаїном.

Термін "F(ab')₂" стосується фрагмента антитіла з молекулярною масою приблизно 100000 і антигензв'язувальною активністю, яка трохи вище, ніж у 2 ідентичних фрагментів Fab, зв'язаних дисульфідним зв'язком у шарнірній області. Як правило, його одержують із фрагментів, за допомогою обробки IgG протеазою пепсином.

Термін "Fab" стосується фрагмента антитіла з молекулярною масою приблизно 50000 і антигензв'язувальною активністю, який одержують за допомогою руйнування дисульфідного зв'язку F(ab')₂ у шарнірній області.

Поліпептид одноланцюжкового Fv ("scFv") являє собою ковалентно зв'язаний гетеродимер VH:VL, який, як правило, експресований зі злиттям генів, що містять кодуючі VH і VL гени, зв'язані кодуючим пептид лінкером. Фрагмент scFv людини за винаходом містить CDR, які утримуються в належній конформації, наприклад, з використанням способів генетичної рекомбінації. Двовалентні і полівалентні фрагменти антитіл, такі як двовалентні sc(Fv)₂, можуть формуватися або спонтанно, за допомогою асоціації одновалентних scFv, або їх можна одержувати, зв'язуючи одновалентні scFv пептидним лінкером. "dsFv" являє собою гетеродимер VH:VL, стабілізований дисульфідним зв'язком. "(dsFv)₂" означає два dsFv, зв'язані пептидним лінкером.

Термін "біспецифічне антитіло" або "BsAb" означає антитіло, у якому в одній молекулі скомбіновані антигензв'язувальні ділянки двох антитіл. Таким чином, BsAb здатні зв'язувати два різні антигени одночасно. Для конструювання, модифікації і продукції антитіл або похідних антитіл з бажаним набором властивостей зв'язування і ефекторних функцій зі зростаючою частотою використовували генну інженерію, як описано наприклад, у EP 2050764 A1.

Термін "поліспецифічне антитіло" означає антитіло, у якому в одній молекулі скомбіновані антигензв'язувальні ділянки двох або більше антитіл.

Термін "діатіла" стосується невеликих фрагментів антитіл з двома антигензв'язувальними ділянками, де ці фрагменти містять варіабельний домен важкого ланцюга (VH), зв'язаний з варіабельним доменом легкого ланцюга (VL) в одному поліпептидному ланцюзі (VH-VL). Використовуючи лінкер, що є занадто коротким, щоб дозволити спарювання двох доменів одного і того ж ланцюга, домени примушують спарюватися з комплементарними доменами іншого ланцюга й одержують дві антигензв'язувальні ділянки.

Термін "гібридома" означає клітину, яку одержують, піддаючи В-клітину, одержану за допомогою імунізації ссавця, що не є людиною, антигеном, клітинному злиттю з мієломною клітиною, одержаною у миші, або т. п., яка продукує бажане моноклональне антитіло з антигенною специфічністю.

Під "очищеним" і "виділеним" мають на увазі, коли вони стосуються поліпептиду (тобто антитіла за винаходом) або нуклеотидної послідовності, що зазначена молекула присутня по суті за відсутності інших біологічних макромолекул того ж типу. Як використовують у даному описі, термін "очищений" означає, що присутньо щонайменше 75 %, 85 %, 95 %, 96 %, 97 % або 98 % по масі біологічних макромолекул одного типу. "Виділена" молекула нуклеїнової кислоти,

кодує конкретний поліпептид, стосується молекули нуклеїнової кислоти, що по суті не містить інших молекул нуклеїнової кислоти, які не кодує зазначений поліпептид; однак молекула може містити деякі додаткові основи або групи, які не здійснюють несприятливого впливу на основні характеристики композиції.

5 Як використовують у даному описі, термін "індивідуум" означає ссавця, такого як гризун, кішка, собака і примат. Крім того, індивідуум за винаходом являє собою людину.

Антитіла

Автори винаходу домоглися успіху в одержанні, скринінгу і відборі специфічних відносно CEACAM5 антитіл миші, які демонструють високу афінність відносно білка CEACAM5 людини і Macaca fascicularis і які по суті перехресно не реагують з білками CEACAM1, CEACAM6, 10 CEACAM7 і CEACAM8 людини і з білками CEACAM1, CEACAM6 і CEACAM8 Macaca fascicularis.

Автори винаходу визначили послідовність варіабельних областей важких і легких ланцюгів таких моноклональних антитіл, так званих антитіл MAb1, MAb2, MAb3, MAb4 і MAb5.

Так називане "антитіло MAb1" містить:

15 варіабельний домен важкого ланцюга, що складається з послідовності EVMLVESGGGLVKGPGGSLKLSAASGFTFSSYAMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGSYIYYLDSVKG RFTISRDNANKNTLYLQMSSLRSEDAMYYCARPAYGPNAMPDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO:31, де CDR представлені напівжирними символами), у якому FR1-H охоплює положення амінокислот 1-25, CDR1-H охоплює положення амінокислот 26-33 (SEQ ID NO:1), FR2-H 20 охоплює положення амінокислот 34-50, CDR2-H охоплює положення амінокислот 51-58 (SEQ ID NO:2), FR3-H охоплює положення амінокислот 59-96, CDR3-H охоплює положення амінокислот 97-109 (SEQ ID NO:3) і FR4-H охоплює положення амінокислот 110-120, і

20 варіабельний домен легкого ланцюга, що складається з послідовності DILMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSASYRYSVGPDRFTGSG SGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYNSYPLYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO:32, де CDR представлені напівжирними символами), у якому FR1-L охоплює положення амінокислот 1-26, CDR1-L охоплює положення амінокислот 27-32 (SEQ ID NO:4), FR2-L охоплює положення амінокислот 33-49, CDR2-L охоплює положення амінокислот 50-52, FR3-L охоплює положення амінокислот 53-88, CDR3-L охоплює положення амінокислот 89-98 (SEQ ID NO:6) і FR4-L охоплює 30 положення амінокислот 99-108.

Так називане "антитіло MAb2" містить:

30 варіабельний домен важкого ланцюга, що складається з послідовності EVQLQESGGVLVKGPGGSLKLSAASGFVFSSYDMSWVRQTPEKRLEWVAYISSGGGITYFPDVTQQG RFTVSRDNANKNTLYLQMNSLKSSEDATYYCAAHYFGSSGPFAYWGQGTSLTVSA (SEQ ID NO:33, де CDR представлені напівжирними символами), у якому FR1-H охоплює положення амінокислот 1-25, CDR1-H охоплює положення амінокислот 26-33 (SEQ ID NO:7), FR2-H охоплює положення амінокислот 34-50, CDR2-H охоплює положення амінокислот 51-58 (SEQ ID NO:8), FR3-H охоплює положення амінокислот 59-96, CDR3-H охоплює положення амінокислот 97-109 (SEQ ID NO:9) і FR4-H охоплює положення амінокислот 110-120, і

40 варіабельний домен легкого ланцюга, що складається з послідовності DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIFSYLAWYQQKQKSPQLLVYNTKTLAEGVPSRFSGSGS GTQFSLKINSLQPEDFGSYCYQHNYGTPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO:34, де CDR представлені напівжирними символами), у якому FR1-L охоплює положення амінокислот 1-26, CDR1-L охоплює положення амінокислот 27-32 (SEQ ID NO:10), FR2-L охоплює положення амінокислот 33-49, CDR2-L охоплює положення амінокислот 50-52, FR3-L охоплює положення амінокислот 53-88, CDR3-L охоплює положення амінокислот 89-97 (SEQ ID NO:12) і FR4-L охоплює 45 положення амінокислот 98-107.

Також одержаний варіант антитіла MAb2, за допомогою внесення в CDR2-L заміни K52R. Цей варіант, що у даному описі позначений "Mab2_{K52R}", має по суті таку ж афінність відносно CEACAM5 людини і Macaca fascicularis, як і MAb2.

Так називане "антитіло MAb3" містить:

50 варіабельний домен важкого ланцюга, що складається з послідовності EVKLVESGGGLVKGPGGSLTLPCAASGFTFSRYAMSWVRQTPEKRLEWVASISSGGDTYYPDVSKGR FTVSRDNARNILFLQMSSLRSEDGMYYCARVNYDDSSFLDWWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:35, де CDR представлені напівжирними символами), у якому FR1-H охоплює положення амінокислот 1-25, CDR1-H охоплює положення амінокислот 26-33 (SEQ ID NO:13), FR2-H охоплює положення амінокислот 34-50, CDR2-H охоплює положення амінокислот 51-57 (SEQ ID NO:14), FR3-H охоплює положення амінокислот 58-95, CDR3-H охоплює положення амінокислот 96-108 (SEQ ID NO:15) і FR4-H охоплює положення амінокислот 109-119, і

варіабельний домен легкого ланцюга, що складається з послідовності DIVMTQSQRFMSTLEGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKALIYSASYRSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYNNYPLYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO:36, де CDR представлені напівжирними символами), у якому FR1-L охоплює положення амінокислот 1-26, CDR1-L охоплює положення амінокислот 27-32 (SEQ ID NO:16), FR2-L охоплює положення амінокислот 33-49, CDR2-L охоплює положення амінокислот 50-52, FR3-L охоплює положення амінокислот 53-88, CDR3-L охоплює положення амінокислот 89-98 (SEQ ID NO:18) і FR4-L охоплює положення амінокислот 99-108.

Так називане "антитіло MAb4" містить:

варіабельний домен важкого ланцюга, що складається з послідовності EVQLVESGGGLVKGPGGSLKLSAASGFTFSSYDMSWVRQTPEKRLEWVAFISSYGGRTYYADTVKG RFTISRDNANTLYLQMSLKSSEDAMFYCAAHYFGTSGPFAYWGQGLTVTVSA (SEQ ID NO:37, де CDR представлені напівжирними символами), у якому FR1-H охоплює положення амінокислот 1-25, CDR1-H охоплює положення амінокислот 26-33 (SEQ ID NO:19), FR2-H охоплює положення амінокислот 34-50, CDR2-H охоплює положення амінокислот 51-58 (SEQ ID NO:20), FR3-H охоплює положення амінокислот 59-96, CDR3-H охоплює положення амінокислот 97-109 (SEQ ID NO:21) і FR4-H охоплює положення амінокислот 110-120, і

варіабельний домен легкого ланцюга, що складається з послідовності DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYFAWYQQKQKSPQLLVYNAKILAEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSIQPEDFGTYQCQHHYGIPFTFGSGTKLELK (SEQ ID NO:38, де CDR представлені напівжирними символами), у якому FR1-L охоплює положення амінокислот 1-26, CDR1-L охоплює положення амінокислот 27-32 (SEQ ID NO:22), FR2-L охоплює положення амінокислот 33-49, CDR2-L охоплює положення амінокислот 50-52, FR3-L охоплює положення амінокислот 53-88, CDR3-L охоплює положення амінокислот 89-97 (SEQ ID NO:24) і FR4-L охоплює положення амінокислот 98-107.

Так називане "антитіло MAb5" містить:

варіабельний домен важкого ланцюга, що складається з послідовності ELQLVESGGVLVKGPGGSLKLSAASGFAFSSYDMSWVRQTPEKRLEWVITYINSGGGITYYPDTVKGRFTISRDNARNNTLYLQMSLKSSEDATIIYCTAHYFGSSGPFAYWGQGLTVTVSA (SEQ ID NO:39, де CDR представлені напівжирними символами), у якому FR1-H охоплює положення амінокислот 1-25, CDR1-H охоплює положення амінокислот 26-33 (SEQ ID NO:25), FR2-H охоплює положення амінокислот 34-50, CDR2-H охоплює положення амінокислот 51-58 (SEQ ID NO:26), FR3-H охоплює положення амінокислот 59-96, CDR3-H охоплює положення амінокислот 97-109 (SEQ ID NO:27) і FR4-H охоплює положення амінокислот 110-120, і

варіабельний домен легкого ланцюга, що складається з послідовності DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLAWYQQKQKSPQLLVYNAKTLTEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSIQPEDFGSYQCQHHYGTPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO:40, де CDR представлені напівжирними символами), у якому FR1-L охоплює положення амінокислот 1-26, CDR1-L охоплює положення амінокислот 27-32 (SEQ ID NO:28), FR2-L охоплює положення амінокислот 33-49, CDR2-L охоплює положення амінокислот 50-52, FR3-L охоплює положення амінокислот 53-88, CDR3-L охоплює положення амінокислот 89-97 (SEQ ID NO:30) і FR4-L охоплює положення амінокислот 98-107.

Таким чином, винахід стосується антитіла, яке зв'язується з CEACAM5 людини і *Mascara fascicularis*.

В одному з варіантів здійснення антитіла за винаходом зв'язується з доменами A3-B3 CEACAM5 людини і *Mascara fascicularis*. Більш конкретно, антитіло може зв'язуватися з доменами A3-B3 людини і *Mascara fascicularis* незалежно від того, чи експресовані вони у виділеній формі або знаходяться в розчинному позаклітинному домені або в заякореному у мембрані повнорозмірному білку CEACAM5.

Специфічність антитіл до домену A3-B3 CEACAM5 людини є вигідною, оскільки в європеїдній популяції в цьому домені не повідомлялося ні про один SNP з частотою, більшою 2 %, що мінімізує ризик того, що у частині популяції епітоп(и) антитіла в CEACAM5 змінені.

Винахід також стосується антитіла, що конкурує за зв'язування з доменом A3-B3 білків CEACAM5 людини і *Mascara fascicularis* з антитілом, що містить варіабельні області важких і легких ланцюгів антитіла, вибраного з групи, що складається з так званих антитіл MAb1, MAb2, MAb2_{K52R}, MAb3, MAb4 і MAb5, тобто вибраних із групи, що складається з:

а) антитіла, що містить варіабельний домен важкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:31 і варіабельний домен легкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:32;

б) антитіла, що містить варіабельний домен важкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:33 і варіабельний домен легкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:34;

с) антитіла, що містить варіабельний домен важкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:33 і варіабельний домен легкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:34, у якому К у положенні 52 замінений на R;

5 д) антитіла, що містить варіабельний домен важкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:35 і варіабельний домен легкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:36;

е) антитіла, що містить варіабельний домен важкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:37 і варіабельний домен легкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:38; і

ф) антитіла, що містить варіабельний домен важкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:39 і варіабельний домен легкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:40.

10 Здатність антитіла-кандидата конкурувати за зв'язування з доменом A3-B3 білків CEACAM5 людини і *Macaca fascicularis* з антитілом, що містить варіабельні області важких і легких ланцюгів антитіла, вибраного з групи, що складається з антитіл MAb1, MAb2, MAb3, MAb4 і MAb5 (далі позначувані як "еталонне" антитіло), можна легко оцінювати, наприклад, за допомогою конкурентного ELISA, де антиген (тобто домен A3-B3 CEACAM5 людини або *Macaca fascicularis* або поліпептид, який містить або складається з фрагмента CEACAM5 людини або *Macaca fascicularis*, що містить домен A3-B3, зокрема позаклітинний домен CEACAM5 людини або *Macaca fascicularis*) зв'язаний з твердою підкладкою, і додають два розчини, що містять антитіло-кандидат і еталонне антитіло, відповідно, і антитілам дають можливість конкурувати за зв'язування з антигеном. Потім можна вимірювати кількість еталонного антитіла, зв'язаного з антигеном, і порівнювати з кількістю еталонного антитіла, зв'язаного з антигеном, коли її вимірюють відносно негативного контролю (наприклад, розчину, що не містить антитіла). Кількість зв'язаного еталонного антитіла в присутності антитіла-кандидата, зменшена в порівнянні з кількістю зв'язаного еталонного антитіла в присутності негативного контролю, означає, що антитіло-кандидат конкурувало з еталонним антитілом. З метою зручності еталонне антитіло для полегшення детекції зв'язаного еталонного антитіла можна мітити (наприклад, флуоресцентно). Можна проводити повторні вимірювання з серійними розведеннями антитіла-кандидата і/або еталонного антитіла.

Відповідно до одного з варіантів здійснення, таке антитіло і, наприклад, антитіло, що конкурує за зв'язування з доменом A3-B3 білків CEACAM5 людини і *Macaca fascicularis* з антитілом, як визначено в b), c), e) і f) вище, зв'язується з двома областями домену A3-B3 білка CEACAM5 людини, що складаються з амінокислот у положеннях 109-115 (SEQ ID NO:76) і амінокислот у положеннях 131-143 (SEQ ID NO:77) домену A3-B3 білка CEACAM5 людини, відповідно. Фактично, ідентифіковано, що конформаційний епітоп для антитіла MAb2 лежить в областях 109-115 і 131-143 домену A3-B3 білка CEACAM5 людини, і, оскільки MAb2, MAb4 і MAb5 є структурно близькоспорідненими, автори винаходу вважають, що зазначені антитіла зв'язуються з одним і тим же епітопом.

Відповідно до одного з варіантів здійснення, антитіло за винаходом специфічне до поверхневих білків CEACAM5 людини і *Macaca fascicularis*. В одному з варіантів здійснення антитіло за винаходом не зв'язується або по суті перехресно не реагує з білками CEACAM1 людини, CEACAM6 людини, CEACAM7 людини, CEACAM8 людини, CEACAM1 *Macaca fascicularis*, CEACAM6 *Macaca fascicularis* і CEACAM8 *Macaca fascicularis*.

Зокрема, антитіло не зв'язується або по суті перехресно не реагує з позаклітинним доменом зазначених вище білків CEACAM людини і *Macaca fascicularis*.

45 Повнорозмірний білок CEACAM1 людини доступний у базі даних GenBank під номером доступу NP_001703.2 (SEQ ID NO:11). Позаклітинний домен CEACAM1 людини складається з амінокислот у положеннях 35-428 SEQ ID NO:11. Повнорозмірний білок CEACAM6 людини доступний у базі даних GenBank під номером доступу NP_002474.3 (SEQ ID NO:71). Позаклітинний домен CEACAM6 людини складається з амінокислот у положеннях 35-327 SEQ ID NO:71.

50 Повнорозмірний білок CEACAM7 людини доступний у базі даних GenBank під номером доступу NP_008821.1 (SEQ ID NO:72). Позаклітинний домен CEACAM7 людини складається з амінокислот у положеннях 36-248 SEQ ID NO:72.

Повнорозмірний білок CEACAM8 людини доступний у базі даних GenBank під номером доступу NP_001807.2 (SEQ ID NO:73). Позаклітинний домен CEACAM8 людини складається з амінокислот у положеннях 35-332 SEQ ID NO:73.

Позаклітинний домен CEACAM1 *M.fascicularis* складається з амінокислот у положеннях 35-428 повнорозмірного білка, тобто амінокислот 1-394 SEQ ID NO:57.

Позаклітинний домен CEACAM6 *M.fascicularis* складається з амінокислот у положеннях 35-327 повнорозмірного білка, тобто амінокислот 1-293 SEQ ID NO:61.

Позаклітинний домен CEACAM8 *M.fascicularis* складається з амінокислот у положеннях 35-332 повнорозмірного білка, тобто амінокислот 1-298 SEQ ID NO:63.

"Афінність" у теорії визначають рівноважною асоціацією цілого антитіла й антигену. Її можна експериментально оцінити рядом відомих способів, таких як вимірювання швидкостей асоціації і дисоціації з використанням поверхневого плазмонного резонансу або вимірювання EC_{50} (або уявної K_D) у імунохімічному аналізі (ELISA, FACS). У цих аналізах EC_{50} являє собою концентрацію антитіла, яка індукує відповідь посередині між вихідним рівнем і максимумом після визначеного часу експозиції при визначеній концентрації антигену при ELISA (твердофазному імуноферментному аналізі) або клітин, експресуючих антиген, при FACS (активоване флуоресценцією сортування клітин).

Моноклональне антитіло, що зв'язується з антигеном 1 (Ag1), "перехресно реагує" з антигеном 2 (Ag2), коли EC_{50} знаходяться в подібному діапазоні для обох антигенів. У даному описі моноклональне антитіло, що зв'язується з Ag1, перехресно реагує з Ag2, коли відношення афінності відносно Ag2 до афінності відносно Ag1 дорівнює або менше 10 (наприклад, 5, 2, 1 або 0,5), де афінність відносно обох антитіл вимірюють одним і тим же способом.

Моноклональне антитіло, що зв'язується з Ag1, "не є по суті перехресно реагуючим" з Ag2, коли афінності відносно двох антигенів відрізняються дуже сильно. Якщо зв'язування є занадто низьким, афінність відносно Ag2 може бути невимірною. У даному описі моноклональне антитіло, що зв'язується з Ag1, не є по суті перехресно реагуючим з Ag2, коли зв'язування моноклонального антитіла з Ag2 складає менше 5 % від зв'язування того ж моноклонального антитіла з Ag1 у тих же експериментальних умовах і при тій же концентрації антитіла. На практиці використовувана концентрація антитіла повинна являти собою EC_{50} або концентрацію, необхідну для досягнення плато насичення, одержуваного при використанні Ag1.

Моноклональне антитіло "специфічно зв'язується з" або "специфічне відносно" Ag1, коли воно по суті перехресно не реагує з Ag2. Таким чином, антитіло за винаходом має відношення афінності відносно CEACAM5 людини до афінності відносно CEACAM5 *Macaca fascicularis*, що складає ≤ 10 , наприклад ≤ 5 , ≤ 2 , ≤ 1 або $\leq 0,5$. Таким чином, поліпептид за винаходом можна використовувати в токсикологічних дослідженнях, проведених у мавп, оскільки профіль токсичності, спостережуваний у мавп, буде відповідати передбачуваним потенційним несприятливим впливам у людей.

Варіант здійснення винаходу має афінність відносно CEACAM5 людини або CEACAM5 *Macaca fascicularis*, або того й іншого, котра складає ≤ 10 нМ, наприклад ≤ 5 нМ, ≤ 3 нМ, ≤ 1 нМ або $\leq 0,1$ нМ, наприклад афінність від 0,01 нМ до 5 нМ і/або афінність від 0,1 нМ до 5 нМ або від 0,1 нМ до 1 нМ.

Афінність відносно CEACAM5 людини або відносно CEACAM5 *Macaca fascicularis* можна визначити як значення EC_{50} у ELISA з використанням як іммобілізованого антигену розчинного рекомбінантного CEACAM5.

Антитіло за винаходом також може мати уявну константу дисоціації (уявну K_D), як можна визначити за допомогою аналізу FACS на лінії пухлинних клітин MKN45 (DSMZ, ACC 409) або на ксенотрансплантаті пухлинних клітин, одержаних у пацієнта (CR-IGR-034P доступно в Oncodesign Biotechnology, колекція пухлин CReMEC), що складає ≤ 25 нМ, наприклад ≤ 20 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 5 нМ, ≤ 3 нМ або ≤ 1 нМ. Уявна K_D може знаходитися в діапазоні 0,01-20 нМ або може знаходитися в діапазоні 0,1-20 нМ, 0,1-10 нМ або 0,1-5 нМ.

Крім того, показано, що антитілами за винаходом можна детектувати експресію CEACAM5 за допомогою імуногістохімії в заморожених і фіксованих у формаліні і занурених у парафін (FFPE) тканинних зрізах.

На фіг. 7 представлені вирівнювання послідовностей областей VH і VL антитіл MAb1, MAb2, MAb3, MAb4 і MAb5. Порівняння послідовностей CRD-H і CDR-L свідчить, що структурно MAb2, MAb4 і MAb5, з одного боку, і MAb1 і MAb3, з іншого боку, є близькоспорідненими, причому зазначені антитіла, імовірно, зв'язуються з одним і тим же епітопом. Порівняння послідовностей CRD-H і CDR-L додатково установило положення CDR, які у двох групах антитіл є строго консервативними і які, таким чином, вважають важливими для специфічності, тоді як інші положення можна піддавати замінам.

Авторами винаходу додатково ідентифіковано, що залишки в положеннях 101-109 VH MAb2 (тобто залишки CDR3-H) і залишки в положеннях 47-54 і 88-104 VL MAb2 (тобто області, що містять CDR2-L і CDR3-L, відповідно) складають частину або формують паратоп антитіла для домену A3B3 CEACAM5 людини.

Крім того, за допомогою заміни одиничних кислот залишки в положеннях 27, 28, 29, 31, 51, 52, 89, 90, 93, 94, 96 і 97 VL MAb2 (тобто в межах CDR1-L, CDR2-L і CDR3-L) і залишки в положеннях 26-31, 51-58, 97, 103, 104, 107 і 109 VH MAb2 (тобто в межах CDR1-H, усієї CDR2-H

і в межах CDR3-H) ідентифіковані як нейтральні відносно зв'язування з позаклітинними доменами CEACAM5 людини і яванського макака. Крім того, показано, що залишки в положеннях 30 і 92 VL MAb2 (тобто в межах CDR1-L і CDR3-L) і залишки в положеннях 98 і 100 VH MAb2 (тобто в межах CDR3-H) допускають консервативну заміну. Оскільки MAb2, MAb4 і MAb5 несуть один і той же набір 6 CDR або дуже близькоспоріднених CDR, вважають, що варіації в одних і тих же положеннях MAb4 або MAb5 у послідовностях VH або VL, або як VH, так і CL, також приводять до варіантів антитіл, що зберігають специфічність і/або афінність зв'язування відносно CEACAM5 людини і яванського макака.

Слід зазначити, що, оскільки всі залишки CDR2-H ідентифіковані як нейтральні відносно зв'язування з позаклітинним доменом CEACAM5 людини і яванського макака, автори винаходу вважають, що CDR2-H може не брати участь у взаємодії. Таким чином, в антитілах за винаходом CDR2-H може мати будь-яку послідовність з 6-10 амінокислот, що є характерною довжиною послідовностей CDR2-H в антитілах людини.

Таким чином, антитіло за винаходом містить:

а) CDR1-H, що складається з послідовності $X_1X_2X_3X_4X_5X_6YD$ (SEQ ID NO:83), де кожний з X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 і X_6 являє собою будь-яку амінокислоту; і

CDR2-H, що складається з послідовності довжиною 6-10 амінокислот, переважно послідовності довжиною 8 амінокислот, у якій у будь-якому положенні може знаходитися будь-яка амінокислота; і

CDR3-H, що складається з послідовності $X_1X_2HX_3FGX_4X_5GPX_6AX_7$ (SEQ ID NO:84), де кожний з X_1 , X_4 , X_5 , X_6 , і X_7 являє собою будь-яку амінокислоту, X_2 являє собою A або S, і X_3 являє собою Y, F або W; і/або

б) CDR1-L, що складається з послідовності $X_1X_2X_3X_4X_5Y$ (SEQ ID NO:85), де кожний з X_1 , X_2 , X_3 і X_5 являє собою будь-яку амінокислоту, і X_4 являє собою Y, F або W; і

CDR2-L, що складається з послідовності NX_1X_2 , де кожний з X_1 і X_2 являє собою будь-яку амінокислоту; і

CDR3-L, що складається з послідовності $X_1X_2HX_3X_4X_5PX_6X_7$ (SEQ ID NO:86), де кожний з X_1 , X_2 , X_4 , X_5 , X_6 і X_7 являє собою будь-яку амінокислоту, X_3 являє собою Y, F або W.

В одному з варіантів здійснення CDR1-H складається з послідовності $X_1X_2X_3X_4X_5X_6YD$ (SEQ ID NO:83), де X_1 являє собою G або X_2 являє собою F, або X_3 являє собою T, A або V, або X_4 являє собою F, або X_5 являє собою S, або X_6 являє собою S, або будь-яку їх комбінацію.

В одному з варіантів здійснення CDR2-H складається з послідовності $IX_1SX_2GGX_3T$ (SEQ ID NO:79), де X_1 являє собою S або N (зокрема S), X_2 являє собою Y або G (зокрема G), X_3 являє собою R або I. У додатковому варіанті здійснення X_3 являє собою I.

В одному з варіантів здійснення CDR3-H складається з послідовності $X_1X_2HX_3FGX_4X_5GPX_6AX_7$ (SEQ ID NO:84), X_1 являє собою A або T або X_4 являє собою T або S, або X_5 являє собою S, або X_6 являє собою F, або X_7 являє собою Y, або будь-яку їх комбінацію.

В одному з варіантів здійснення CDR1-L складається з послідовності $X_1X_2X_3X_4X_5Y$ (SEQ ID NO:85), де X_1 являє собою E або X_2 являє собою N, або X_3 являє собою I, або X_5 являє собою S, або будь-яку їх комбінацію.

В одному з варіантів здійснення CDR2-L складається з послідовності NX_1X_2 , де X_1 являє собою A або T, і X_2 являє собою K або R.

В одному з варіантів здійснення CDR3-L складається з послідовності $X_1X_2HX_3X_4X_5PX_6X_7$ (SEQ ID NO:86), де X_1 являє собою Q або X_2 являє собою H, або X_4 являє собою G, або X_5 являє собою T, або X_6 являє собою F, або X_7 являє собою T, або будь-яку їх комбінацію. Відповідно до одного з варіантів здійснення антитіло за винаходом містить:

а) CDR1-H, що складається з послідовності GFX_1FSSYD (SEQ ID NO:78), де X_1 являє собою T, A або V; і

CDR2-H, що складається з послідовності $IX_1SX_2GGX_3T$ (SEQ ID NO:79), де X_1 являє собою S або N (зокрема S), X_2 являє собою Y або G (зокрема G), X_3 являє собою R або I; і

CDR3-H, що складається з послідовності $X_1AHYFGX_2SGPFAY$ (SEQ ID NO:80), де X_1 являє собою A або T (зокрема A), і X_2 являє собою T або S; і/або

б) CDR1-L, що складається з послідовності $ENIFSY$ (SEQ ID NO:10) або $ENIYSY$ (SEQ ID NO:22); і

CDR2-L, що складається з послідовності NX_1X_2 , де X_1 являє собою A або T, і X_2 являє собою K або R, зокрема R; зокрема CDR2-L, що складається з NAK, NTK і NTR; і

CDR3-L, що складається з послідовності $QHNYGTPFT$ (SEQ ID NO:12) або $QHNYGIPFT$ (SEQ ID NO:24).

Відповідно до одного з варіантів здійснення, у CDR2-H X_1 являє собою S або N, X_2 являє собою G, і X_3 являє собою I.

Відповідно до одного з варіантів здійснення, CDR2-H складається з ISSGGGIT (SEQ ID NO:8), ISSYGGRT (SEQ ID NO:20) або INSGGGIT (SEQ ID NO:26).

Відповідно до одного з варіантів здійснення, у CDR3-H X_1 являє собою А або Т, і X_2 являє собою S.

5 Відповідно до одного з варіантів здійснення, CDR3-H складається з AAHYFGSSGPFAY (SEQ ID NO:9), AAHYFGTSGPFAY (SEQ ID NO:21) або TAYHYFGSSGPFAY (SEQ ID NO:27).

Будь-яка комбінація цих варіантів здійснення включена у винахід.

Альтернативно, антитіло за винаходом містить:

10 а) CDR1-H, що складається з послідовності GFTFSX₁YX₂ (SEQ ID NO:81), де X_1 являє собою R або S, зокрема S, і X_2 являє собою А або D; і

CDR2-H, що складається з послідовності ISSGGX₁X₂X₃ (SEQ ID NO:82), де X_1 відсутній, являє собою S або G (зокрема G), X_2 являє собою D, Y або I, і X_3 являє собою Т або I; і

CDR3-H, що складається з послідовності ARPAYYGNPAMDY (SEQ ID NO:3) або ARVNYYDSSFLDW (SEQ ID NO:15); і/або

15 б) CDR1-L, що складається з послідовності QNVGTN (SEQ ID NO:4); і

CDR2-L, що складається з послідовності SAS; і

CDR3-L, що складається з послідовності QQYNSYPLYT (SEQ ID NO:6) або QQYNNYPLYT (SEQ ID NO:18).

20 Відповідно до одного з варіантів здійснення, CDR2-H складається з послідовності ISSGGSYI (SEQ ID NO:2) або ISSGGDT (SEQ ID NO:14).

Відповідно до одного з варіантів здійснення, CDR2-H складається з послідовності ISSGGSYI (SEQ ID NO:2), і CDR3-H складається з послідовності ARPAYYGNPAMDY (SEQ ID NO:3).

Відповідно до одного з варіантів здійснення, CDR2-H складається з послідовності ISSGGDT (SEQ ID NO:14), і CDR3-H складається з послідовності ARVNYYDSSFLDW (SEQ ID NO:15).

25 Відповідно до одного з варіантів здійснення, антитіло за винаходом містить послідовності CDR важких і/або легких ланцюгів одного з так званих антитіл до CEACAM5 MAb1, MAb2, MAb2_{K52R}, MAb3, MAb4 і MAb5.

Таким чином, винахід стосується антитіла, що містить:

30 а) CDR1-H з послідовністю GFTFSSYA (SEQ ID NO:1) або з послідовністю, що відрізняється від SEQ ID NO:1 однією заміною амінокислоти; CDR2-H з послідовністю ISSGGSYI (SEQ ID NO:2) або з послідовністю, що відрізняється від SEQ ID NO:2 однією або декількома замінами амінокислот; CDR3-H з послідовністю ARPAYYGNPAMDY (SEQ ID NO:3) або з послідовністю, що відрізняється від SEQ ID NO:3 однією заміною амінокислоти; CDR1-L з послідовністю QNVGTN (SEQ ID NO:4) або з послідовністю, що відрізняється від SEQ ID NO:4 однією заміною амінокислоти; CDR2-L з послідовністю SAS або з послідовністю, що відрізняється від SAS однією заміною амінокислоти, і CDR3-L з послідовністю QQYNSYPLYT (SEQ ID NO:6) або з послідовністю, що відрізняється від SEQ ID NO:6 однією заміною амінокислоти; або

35 б) CDR1-H з послідовністю GFVFSSYD (SEQ ID NO:7) або з послідовністю, що відрізняється від SEQ ID NO:7 однією заміною амінокислоти; CDR2-H з послідовністю ISSGGGIT (SEQ ID NO:8) або з послідовністю, що відрізняється від SEQ ID NO:8 однією або декількома замінами амінокислот; CDR3-H з послідовністю AAHYFGSSGPFAY (SEQ ID NO:9) або з послідовністю, що відрізняється від SEQ ID NO:9 однією або декількома замінами амінокислот; CDR1-L з послідовністю ENIFSY (SEQ ID NO:10) або з послідовністю, що відрізняється від SEQ ID NO:10 однією заміною амінокислоти; CDR2-L з послідовністю NTK або NTR або з послідовністю, що відрізняється від NTK або NTR однією заміною амінокислоти, і CDR3-L з послідовністю QNHYGTPFT (SEQ ID NO:12) або з послідовністю, що відрізняється від SEQ ID NO:12 однією заміною амінокислоти; або

40 в) CDR1-H з послідовністю GFTFSRYA (SEQ ID NO:13) або з послідовністю, що відрізняється від SEQ ID NO:13 однією заміною амінокислоти; CDR2-H з послідовністю ISSGGDT (SEQ ID NO:14) або з послідовністю, що відрізняється від SEQ ID NO:14 однією або декількома замінами амінокислот; CDR3-H з послідовністю ARVNYYDSSFLDW (SEQ ID NO:15) або з послідовністю, що відрізняється від SEQ ID NO:15 однією заміною амінокислоти; CDR1-L з послідовністю QNVGTN (SEQ ID NO:16) або з послідовністю, що відрізняється від SEQ ID NO:16 однією заміною амінокислоти; CDR2-L з послідовністю SAS або з послідовністю, що відрізняється від SAS однією заміною амінокислоти, і CDR3-L з послідовністю QQYNNYPLYT (SEQ ID NO:18) або з послідовністю, що відрізняється від SEQ ID NO:18 однією заміною амінокислоти; або

45 д) CDR1-H з послідовністю GFTFSSYD (SEQ ID NO:19) або з послідовністю, що відрізняється від SEQ ID NO:19 однією заміною амінокислоти; CDR2-H з послідовністю ISSYGGRT (SEQ ID NO:20) або з послідовністю, що відрізняється від SEQ ID NO:20 однією або

декількома замінами амінокислот; CDR3-H з послідовністю AAHYFGTSGPFAY (SEQ ID NO:21) або з послідовністю, що відрізняється від SEQ ID NO:21 однією або декількома замінами амінокислот; CDR1-L з послідовністю ENIYSY (SEQ ID NO:22) або з послідовністю, що відрізняється від SEQ ID NO:22 однією заміною амінокислоти; CDR2-L з послідовністю NAK або з послідовністю, що відрізняється від NAK однією або декількома замінами амінокислот, і CDR3-L з послідовністю QHHYGIPFT (SEQ ID NO:24) або з послідовністю, що відрізняється від SEQ ID NO:24 однією заміною амінокислоти; або

е) антитіла, що містить CDR1-H з послідовністю GFAFSSYD (SEQ ID NO:25) або з послідовністю, що відрізняється від SEQ ID NO:25 однією заміною амінокислоти; CDR2-H з послідовністю INSGGGIT (SEQ ID NO:26) або з послідовністю, що відрізняється від SEQ ID NO:26 однією або декількома замінами амінокислот; CDR3-H з послідовністю TAHYFGSSGPFAY (SEQ ID NO:27) або з послідовністю, що відрізняється від SEQ ID NO:27 однією або декількома замінами амінокислот; CDR1-L з послідовністю ENIYSY (SEQ ID NO:28) або з послідовністю, що відрізняється від SEQ ID NO:28 однією заміною амінокислоти; CDR2-L з послідовністю NAK або з послідовністю, що відрізняється від NAK однією або декількома замінами амінокислот, і CDR3-L з послідовністю QHHYGTPFT (SEQ ID NO:30) або з послідовністю, що відрізняється від SEQ ID NO:30 однією заміною амінокислоти.

Одну або декілька окремих амінокислот в одній або декількох із зазначених вище послідовностей CDR можна змінювати за допомогою заміни, зокрема за допомогою консервативної заміни. Така зміна може призначатися, наприклад, для видалення ділянки глікозилування або ділянки дезамідування в зв'язку з гуманізацією антитіла.

На основі вирівнювань послідовностей областей VH і VL MAb1, MAb2, MAb3, MAb4 і MAb5 і на основі одиночних замін амінокислот у варіанті антитіла MAb2, амінокислоту можна замінити:

у CDR1-H в одному або декількох положеннях 1-6, наприклад у положенні 3 CDR1-H з послідовністю GFVFSSYD (SEQ ID NO:7), GFTFSSYD (SEQ ID NO:19) або GFAFSSYD (SEQ ID NO:25) або в положенні 6 CDR1-H з послідовністю GFTFSSYA (SEQ ID NO:1) або GFTFSRYA (SEQ ID NO:13); і/або

у CDR2-H в одному або декількох будь-яких положеннях або в одному, двох або трьох положеннях 2, 4 і 7 CDR2-H з послідовністю INSGGGIT (SEQ ID NO:8), ISSYGGRT (SEQ ID NO:20) або INSGGGIT (SEQ ID NO:26), або в одному, двох або трьох положеннях 6, 7 і 8 (де послідовність складається з 8 амінокислот) CDR2-H з послідовністю ISSGGSYI (SEQ ID NO:2) або ISSGGDT (SEQ ID NO:14); і/або див. вище;

у CDR3-H в одному або декількох положеннях 1, 7, 8, 11 і 13, наприклад в одному або двох положеннях 1 і 7 CDR3-H з послідовністю AAHYFGSSGPFAY (SEQ ID NO:9), AAHYFGTSGPFAY (SEQ ID NO:21) або TAHYFGSSGPFAY (SEQ ID NO:27), або в положенні 3, 4, 7, 8, 9, 10 або 11 послідовностей ARPAYYGNPAMDY (SEQ ID NO:3) або ARVNYDSSFLDW (SEQ ID NO:15); і/або

у CDR1-L в одному або декількох положеннях 1-5, зокрема в одному або декількох положеннях 1, 2, 3 і 5 або в положенні 4 CDR1-L з послідовністю ENIFSY (SEQ ID NO:10) або ENIYSY (SEQ ID NO:28); і/або

у CDR2-L у положеннях 2 і/або 3 послідовності NAK, NTK або NTR, зокрема щонайменше в положенні 3, якщо є присутнім К. У такому випадку, наприклад, К у положенні 3 CDR2-L можна замінити на R; і/або

у CDR3-L в одному або декількох положеннях 1, 2, 5, 6, 8 і 9, наприклад у положенні 6 CDR3-L з послідовністю QHHYGIPFT (SEQ ID NO:24) або QHHYGTPFT (SEQ ID NO:30), або в положенні 5 CDR3-L з послідовністю QQYNSYPLYT (SEQ ID NO:6) або QQYNNYPLYT (SEQ ID NO:18).

Відповідно до одного з варіантів здійснення, в антитілах за винаходом:

положення 5 CDR3-H з послідовністю AAHYFGSSGPFAY (SEQ ID NO:9), AAHYFGTSGPFAY (SEQ ID NO:21) або TAHYFGSSGPFAY (SEQ ID NO:27) і/або

положення 6 CDR1-L з послідовністю ENIFSY (SEQ ID NO:10) або ENIYSY (SEQ ID NO:28); і/або

положення 3 CDR3-L з послідовністю QHHYGIPFT (SEQ ID NO:24) або QHHYGTPFT (SEQ ID NO:30)

є немодифікованим(и).

Відповідно до одного з варіантів здійснення, у CDR1-H з послідовністю GFVFSSYD (SEQ ID NO:7), GFTFSSYD (SEQ ID NO:19) або GFAFSSYD (SEQ ID NO:25) амінокислота, на яку замінюють амінокислоту в положенні 3 CDR1-H, вибрана з групи, що складається з Т, А або V.

Відповідно до одного з варіантів здійснення, у CDR1-H з послідовністю GFTFSSYA (SEQ ID NO:1) або GFTFSRYA (SEQ ID NO:13) амінокислота, на яку замінюють амінокислоту в положенні 6 CDR1-H, являє собою R або S.

Відповідно до одного з варіантів здійснення, у CDR3-H з послідовністю AAHYFGSSGPFAY (SEQ ID NO:9), AAHYFGTSGPFAY (SEQ ID NO:21) або TAHYFGSSGPFAY (SEQ ID NO:27) амінокислота, на яку заміняють амінокислоту в положенні 1 CDR3-H, являє собою А або Т, і/або амінокислота, на яку заміняють амінокислоту в положенні 7 CDR3-H, являє собою Т або С.

5 Відповідно до одного з варіантів здійснення, у CDR3-H з послідовністю ARPAYYGNPAMDY (SEQ ID NO:3) або ARVNYDSSFLDW (SEQ ID NO:15) амінокислота, на яку заміняють амінокислоту в положенні 3 CDR3-H, являє собою V або P, у положенні 4 являє собою А або N, у положенні 7 являє собою D або G, у положенні 8 являє собою S або N, у положенні 9 являє собою S або P, у положенні 10 являє собою F або А або в положенні 11 являє собою W або Y.

10 Відповідно до одного з варіантів здійснення, амінокислота, на яку заміняють амінокислоту в положенні 4 CDR1-L, являє собою Y або F.

Відповідно до одного з варіантів здійснення, у CDR2-L з послідовністю NAK, NTK або NTR амінокислота, на яку заміняють амінокислоту в положенні 2 CDR2-L, являє собою А або Т.

15 Відповідно до одного з варіантів здійснення, у CDR3-L з послідовністю QQYNSYPLYT (SEQ ID NO:6) або QQYNNYPLYT (SEQ ID NO:18) амінокислота, на яку заміняють амінокислоту в положенні 5 CDR3-L, являє собою N або S.

Відповідно до одного з варіантів здійснення, у CDR3-L з послідовністю QHHYGIPFT (SEQ ID NO:24) або QHHYGTPFT (SEQ ID NO:30) амінокислота, на яку заміняють амінокислоту в положенні 6 CDR3-L, являє собою I або T.

20 Будь-яка комбінація зазначених вище варіантів здійснення включена у винахід.

В одному з варіантів здійснення антитіло за винаходом являє собою звичайне антитіло, таке як звичайне моноклональне антитіло або фрагмент антитіла, біспецифічне або поліспецифічне антитіло.

25 В одному з варіантів здійснення антитіло за винаходом містить або складається з IgG або його фрагмента.

Винахід також стосується антитіл, як визначено вище, що додатково містить щонайменше варіабельний домен важкого ланцюга і/або варіабельний домен легкого ланцюга одного з п'яти так званих антитіл до CEACAM5 MAb1, MAb2, MAb3, MAb4 і MAb5.

Таким чином, один з варіантів здійснення винаходу стосується антитіла, що містить:

30 а) варіабельний домен важкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO:31 або з послідовністю, щонайменше на 85 % ідентичною їй, і/або варіабельний домен легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO:32 або з послідовністю, щонайменше на 85 % ідентичною їй; або

35 б) варіабельний домен важкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO:33 або з послідовністю, щонайменше на 85 % ідентичною їй, і/або варіабельний домен легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO:34 або з послідовністю, щонайменше на 85 % ідентичною їй; або

с) варіабельний домен важкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO:35 або з послідовністю, щонайменше на 85 % ідентичною їй, і/або варіабельний домен легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO:36 або з послідовністю, щонайменше на 85 % ідентичною їй; або

40 д) варіабельний домен важкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO:37 або з послідовністю, щонайменше на 85 % ідентичною їй, і/або варіабельний домен легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO:38 або з послідовністю, щонайменше на 85 % ідентичною їй; або

е) варіабельний домен важкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO:39 або з послідовністю, щонайменше на 85 % ідентичною їй, і/або варіабельний домен легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO:40 або з послідовністю, щонайменше на 85 % ідентичною їй.

45 Наприклад, послідовність варіабельного домену важкого або легкого ланцюга при необхідності може відрізнятись від еталонної послідовності SEQ ID NO:31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 або 40 однією або декількома замінами амінокислот, зокрема однією або декількома консервативними замінами амінокислот і/або замінами на канонічні залишки. В одному з варіантів здійснення послідовність варіабельного домену важкого або легкого ланцюга може відрізнятись від еталонної послідовності SEQ ID NO:31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 або 40 тільки консервативними замінами амінокислот.

По суті, в одній або декількох з каркасних областей FR1-L, FR2-L, FR3-L, FR4-L і/або FR1-H, FR2-H, FR3-H, FR4-H у порівнянні з послідовністю SEQ ID NO:31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 або 40 присутні зміни послідовності.

55 Однак також можливі заміни амінокислот в одній або декількох CDR. В одному з варіантів здійснення послідовність варіабельного домену легкого ланцюга може відрізнятись від послідовності SEQ ID NO:34 щонайменше заміною K на R у положенні 52 SEQ ID NO:34 (у CDR2-L).

60 Антитіло за винаходом і його фрагмент можуть відповідно являти собою антитіло миші і фрагмент антитіла миші.

Антитіло також може являти собою химерне антитіло і в одному з варіантів здійснення антитіло миші/людини, наприклад антитіло, що містить варіабельні домени важких і легких ланцюгів миші і домен CH і домен CL антитіла людини. Поліпептид може являти собою фрагмент такого антитіла.

Відповідно до одного з варіантів здійснення, антитіло за винаходом являє собою:

а) химерне антитіло, що містить або складається з важкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO:41 або з послідовністю, щонайменше на 85 % ідентичною їй, або легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO:42 або з послідовністю, щонайменше на 85 % ідентичною їй (тобто важкого і/або легкого ланцюга chMAb1, як описано в прикладі 5); або з важкого ланцюга і легкого ланцюга, або

б) химерне антитіло, що містить або складається з важкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO:43 або з послідовністю, щонайменше на 85 % ідентичною їй, або легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO:44 або з послідовністю, щонайменше на 85 % ідентичною їй (тобто важкого і/або легкого ланцюга chMAb2, як описано в прикладі 5); або з важкого ланцюга і легкого ланцюга, або

с) химерне антитіло, що містить або складається з важкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO:45 або з послідовністю, щонайменше на 85 % ідентичною їй, або легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO:46 або з послідовністю, щонайменше на 85 % ідентичною їй (тобто важкого і/або легкого ланцюга chMAb3, як описано в прикладі 5); або з важкого ланцюга і легкого ланцюга, або

д) химерне антитіло, що містить або складається з важкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO:47 або з послідовністю, щонайменше на 85 % ідентичною їй, або легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO:48 або з послідовністю, щонайменше на 85 % ідентичною їй (тобто важкого і/або легкого ланцюга chMAb4, як описано в прикладі 5); або з важкого ланцюга і легкого ланцюга, або

е) химерне антитіло, що містить або складається з важкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO:49 або з послідовністю, щонайменше на 85 % ідентичною їй, або легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO:50 або з послідовністю, щонайменше на 85 % ідентичною їй (тобто важкого і/або легкого ланцюга chMAb5, як описано в прикладі 5); або з важкого ланцюга і легкого ланцюга, або

ф) фрагмент химерного антитіла, визначеного в а), б), с), d) або е).

Антитіло також може являти собою гуманізоване антитіло або фрагмент гуманізованого антитіла. В одному з варіантів здійснення антитіло за винаходом може являти собою результат гуманізації будь-якого з химерних антитіл, визначених вище в а), б), с), d), е) або ф).

У даній галузі відома множина способів гуманізації послідовності антитіла; див. наприклад, огляд Almagro & Fransson (2008), Front Biosci. 13:1619-1633. Одним із широко використовуваних способів є щеплення CDR або реконструкція антитіл, що включає щеплення послідовностей CDR донорного антитіла, як правило антитіла миші, у каркас антитіла людини з різною специфічністю. Оскільки щеплення CDR може знижувати специфічність і афінність зв'язування і, таким чином, біологічну активність антитіла, що не належить людині, з щепленою CDR, в вибраних положеннях антитіла з щепленою CDR можна вносити зворотні мутації для збереження специфічності й афінності зв'язування вихідного антитіла. Ідентифікацію положення для можливих зворотних мутацій можна проводити з використанням інформації, доступної в літературі й у базах даних антитіл. Амінокислотні залишки, що є кандидатами для зворотних мутацій, як правило, є залишками, що розташовані на поверхні молекул антитіл, тоді як залишки, які знаходяться усередині або які мають низьку міру поверхневої експозиції, звичайно не замінюють. Альтернативним щепленню CDR і зворотним мутаціям способом гуманізації є зміна поверхні, при якому не розташовані на поверхні залишки, які походять з антитіла, що не належить людині, зберігають, тоді як поверхневі залишки змінюють на залишки, що належать антитілу людини. Інший альтернативний спосіб відомий як "спрямовуваний відбір" (Jespersen et al. (1994), Biotechnology, 12, 899) і його можна використовувати для одержання з антитіла миші антитіла, яке повністю належить людині, що зберігає епітоп і характеристики зв'язування вихідного антитіла.

У химерних антитіл гуманізація, як правило, включає модифікацію каркасних областей послідовностей варіабельних областей.

Амінокислотні залишки, що є частиною CDR, як правило, у зв'язку з гуманізацією не змінюють, хоча у визначених випадках змінювати окремі амінокислотні залишки CDR може бути бажаним, наприклад, для видалення ділянки глікозилування, ділянки дезамідування або небажаного залишку цистеїну. N-зв'язане глікозилування відбувається за допомогою приєднання олігосахаридного ланцюга до залишку аспарагіну в трипептидній послідовності Asn-

X-Ser або Asn-X-Thr, де X може являти собою будь-яку амінокислоту за винятком Pro. Видалення N-зв'язаної ділянки глікозилування можна досягати за допомогою мутування залишків Asn або Ser/Thr в інші залишки, наприклад, за допомогою консервативної заміни. Дезамідування залишків аспарагіну і глутаміну може відбуватися залежно від таких факторів, як рН і поверхнева експозиція. Особливо чутливі до дезамідування залишки аспарагіну, переважно, коли вони знаходяться в послідовності Asn-Gly і меншою мірою в інших дипептидних послідовностях, таких як Asn-Ala. Таким чином, коли в послідовності CDR присутня така ділянка дезамідування, наприклад Asn-Gly, може бути бажано видалити цю ділянку, як правило, за допомогою консервативної заміни з видаленням одного з залишків-учасників. Заміна в послідовності CDR з видаленням одного з залишків-учасників також призначена для включення в даний винахід.

Беручи як приклад так називане "антитіло MAb2", гуманізоване антитіло або його фрагмент у варіабельній області важкого ланцюга може містити наступні мутації: Р замість G у положенні 9 і/або G замість V у положенні 10; і/або S замість K у положенні 19; і/або R замість K у положенні 43; і/або G замість R у положенні 44; і/або A замість F у положенні 60; і/або S замість D у положенні 62; і/або K замість Q у положенні 65; і/або T замість K у положенні 87; і/або V замість I у положенні 89; і/або S замість A у положенні 113; де положення наведені відповідно до SEQ ID NO:33.

Також розглядаючи так називане "антитіло MAb2" як приклад, гуманізоване антитіло або його фрагмент у варіабельній області легкого ланцюга може містити наступні мутації: D замість E у положенні 17 і/або R замість T у положенні 18; і/або P замість Q у положенні 40; і/або K замість Q у положенні 45; і/або R замість K у положенні 52; і/або D замість Q у положенні 70; і/або T замість K у положенні 74; і/або S замість N у положенні 76; і/або A замість G у положенні 84; і/або T замість S у положенні 85; де положення наведені відповідно до SEQ ID NO:34.

В одному з варіантів здійснення антитіло за винаходом являє собою гуманізоване антитіло, яке містить або складається з важкого ланцюга, що містить зазначені нижче мутації, де положення наведені відповідно до SEQ ID NO:33:

а) Р замість G у положенні 9 і G замість V у положенні 10; і S замість K у положенні 19; і R замість K у положенні 43; і S замість D у положенні 62; і K замість Q у положенні 65; і T замість K у положенні 87; або

б) Р замість G у положенні 9 і G замість V у положенні 10; і S замість K у положенні 19; і R замість K у положенні 43; і G замість R у положенні 44; і A замість F у положенні 60; і S замість D у положенні 62; і K замість Q у положенні 65; і T замість K у положенні 87; і V замість I у положенні 89; і S замість A у положенні 113; і/або

гуманізоване антитіло, яке містить легкий ланцюг, що містить зазначені нижче мутації, де положення наведені відповідно до SEQ ID NO:34:

с) D замість E у положенні 17 і Р замість Q у положенні 40; і K замість Q у положенні 45; і T замість K у положенні 74; і S замість N у положенні 76; або

д) D замість E у положенні 17 і R замість T у положенні 18; і Р замість Q у положенні 40; і K замість Q у положенні 45; і D замість Q у положенні 70; і T замість K у положенні 74; і S замість N у положенні 76; і A замість G у положенні 84; і T замість S у положенні 85; або

е) D замість E у положенні 17 і R замість T у положенні 18; і Р замість Q у положенні 40; і K замість Q у положенні 45; і R замість K у положенні 52; і D замість Q у положенні 70; і T замість K у положенні 74; і S замість N у положенні 76; і A замість G у положенні 84; і T замість S у положенні 85.

В одному з варіантів здійснення антитіло за винаходом являє собою гуманізоване антитіло, одержане за допомогою щеплення CDR антитіла за винаходом в каркасні області альтернативного антитіла, більш конкретно в каркасні області, що належать людині. Узяття як прикладу MAb2, 6 щеплених CDR MAb2_{K52R} у каркас, який належить людині, що складається з генівIGHV3-23 і IGKV1D-39, і проведення трьох зворотних мутацій, що відповідають положенням 34 і 53 у VL (SEQ ID NO:34) і положенню 50 у VH (SEQ ID NO:33), привело до одержання антитіла, що містить варіабельний домен важкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO:74 і варіабельний домен легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO:75.

В одному з варіантів здійснення антитіло за винаходом являє собою гуманізоване антитіло, що містить або складається з важкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:5 або SEQ ID NO:74 або з послідовністю, щонайменше на 85 % ідентичною їй; і/або легкого ланцюга з послідовністю SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:55 або SEQ ID NO:75 або з послідовністю, щонайменше на 85 % ідентичною їй (гуманізовані варіабельні домени важких і легких ланцюгів MAb2).

В одному з варіантів здійснення антитіло за винаходом являє собою гуманізоване антитіло, яке містить важкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO:51 або з послідовністю, щонайменше на 85 % ідентичною їй, і легкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO:17 або з послідовністю, щонайменше на 85 % ідентичною їй, або важкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO:5 або з послідовністю, щонайменше на 85 % ідентичною їй, і легкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO:23 або з послідовністю, щонайменше на 85 % ідентичною їй, або важкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO:5 або з послідовністю, щонайменше на 85 % ідентичною їй, і легкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO:29 або з послідовністю, щонайменше на 85 % ідентичною їй, або важкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO:51 або з послідовністю, щонайменше на 85 % ідентичною їй, і легкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO:55 або з послідовністю, щонайменше на 85 % ідентичною їй, або важкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO:74 або послідовністю, щонайменше на 85 % ідентичною їй, і легкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO:75 або послідовністю, щонайменше на 85 % ідентичною їй.

У зазначеному гуманізованому антитілі або його фрагменті варіабельні домени важких і легких ланцюгів можуть містити акцепторні каркасні області, що належать людині. Гуманізоване антитіло додатково містить константні домени важких і легких ланцюгів людини, коли вони присутні.

В одному з варіантів здійснення антитіло за винаходом являє собою антитіло huMAb2-3 або його варіант, тобто виділене антитіло, яке зв'язується з доменом A3-B3 білків CEACAM5 людини і *Macaca fascicularis* і яке містить:

а) важкий ланцюг, що складається з послідовності SEQ ID NO:87 або з послідовності, щонайменше на 85 % ідентичної їй; або

б) легкий ланцюг, що складається з послідовності SEQ ID NO:88 або з послідовності, щонайменше на 85 % ідентичної їй, або важкий ланцюг і легкий ланцюг.

В одному з варіантів здійснення антитіло за винаходом являє собою антитіло huMAb2-4 (MAb2_VL1d VH1-IgG1) або його варіант, тобто виділене антитіло, яке зв'язується з доменом A3-B3 білків CEACAM5 людини і *Macaca fascicularis* і яке містить:

с) важкий ланцюг, що складається з послідовності SEQ ID NO:89 або з послідовності, щонайменше на 85 % ідентичної їй; і/або

д) легкий ланцюг, що складається з послідовності SEQ ID NO:90 або з послідовності, щонайменше на 85 % ідентичної їй.

Антитіло за винаходом також може являти собою однодоменне антитіло або його фрагмент. В одному з варіантів здійснення винаходу фрагмент однодоменого антитіла може складатися з варіабельної області важкого ланцюга (VHH), що містить CDR1-H, CDR2-H і CDR3-H антитіл, як описано вище. Антитіло також може являти собою антитіло з важкого ланцюга, тобто антитіло, позбавлене легкого ланцюга, що може містити або не містити домен CH1.

Однодоменне або антитіло його фрагмент також може містити каркасні області однодоменого антитіла верблюдячих і необов'язково константний домен однодоменого антитіла верблюдячих.

Антитіло за винаходом також може являти собою фрагмент антитіла, наприклад фрагмент гуманізованого антитіла, вибраний із групи, що складається з Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, (dsFv)₂, scFv, sc(Fv)₂ і діатіла.

Антитіло також може являти собою біспецифічне або поліспецифічне антитіло, одержане з фрагментів антитіл, де щонайменше один фрагмент антитіла являє собою фрагмент антитіла за винаходом. Поліспецифічні антитіла являють собою полівалентні білкові комплекси, як описано, наприклад, у EP 2050764 A1 або US 2005/0003403 A1.

Біспецифічні або поліспецифічні антитіла за винаходом можуть мати специфічність (а) відносно епітопа A3-B3 на CEACAM5 людини/*Macaca fascicularis*, що є мішенню одного з так званих антитіл MAb1, MAb2, MAb3, MAb4 і MAb5, і (б) щонайменше відносно одного іншого антигену. Відповідно до одного з варіантів здійснення, щонайменше один інший антиген не є представником сімейства CEACAM людини або *Macaca fascicularis*, і в одному з варіантів здійснення щонайменше жодним або не всіма з CEACAM1 людини і *Macaca fascicularis*, CEACAM6 людини і *Macaca fascicularis*, CEACAM7 людини і *Macaca fascicularis* і CEACAM8 людини і *Macaca fascicularis*. Відповідно до іншого варіанта здійснення, щонайменше один інший антиген може являти собою епітоп на CEACAM5 людини і *Macaca fascicularis*, відмінний від зазначеного епітопа A3-B3, що є мішенню одного з так званих антитіл MAb1, MAb2, MAb3, MAb4 і MAb5.

Зазначені антитіла можна одержувати будь-яким способом, добре відомим у даній галузі. В одному з варіантів здійснення зазначені антитіла одержують способами, описаними нижче в даному документі.

Антитіла і їх фрагменти за винаходом можна використовувати у виділеній (наприклад, очищеній) формі, або вони можуть знаходитися у векторі, такому як мембранний або ліпідний носій (наприклад, ліпосома).

Нуклеїнові кислоти, вектори і рекомбінантні клітини-хазяїни

5 Додатковим об'єктом винаходу є послідовність нуклеїнової кислоти, яка містить або складається з послідовності, кодуєної антитіло за винаходом, як визначено вище.

Як правило, зазначена нуклеїнова кислота являє собою молекулу ДНК або РНК, яку можна ввести в будь-який придатний вектор, такий як плазміда, косміда, епісома, штучна хромосома, фаговий або вірусний вектор.

10 Терміни "вектор", "клонуючий вектор" і "експресуючий вектор" означають носій, за допомогою якого послідовність ДНК або РНК (наприклад, чужорідний ген) можна вводити в клітину-хазяїна, щоб трансформувати хазяїна і стимулювати експресію (наприклад, транскрипцію і трансляцію) введеної послідовності.

15 Таким чином, додатковим об'єктом винаходу є вектор, який містить нуклеїнову кислоту за винаходом.

Такі вектори можуть містити регуляторні елементи, такі як промотор, енхансер, термінатор і т. п., що викликають або контролюють експресію зазначеного поліпептиду після введення індивідууму. Приклади промоторів і енхансерів, використовуваних у експресуючому векторі для тваринної клітини, включають ранній промотор і енхансер SV40 (Mizukami T. et al. 1987), промотор і енхансер LTR вірусу лейкозу Молоні мишей (Kuwana Y et al. 1987), промотор (Mason J.O. et al. 1985) і енхансер (Gillies S.D. et al. 1983) Н-ланцюга імуноглобуліну і т. п.

Можна використовувати будь-який експресуючий вектор для клітин тварин, за умови, що можна вбудувати і експресувати ген, кодуєний С-область антитіла людини. Приклади придатних векторів включають pAGE107 (Miyaji H. et al. 1990), pAGE103 (Mizukami T. et al. 1987), pHSG274 (Brady G. et al. 1984), pKCR (O'Hare K. et al. 1981), pSG1 бета d2-4- (Miyaji H. et al. 1990) і т. п.

Інші приклади плазмід включають плазмідні, що реплікуються, які містять ділянку початку реплікації, або плазмідні, що інтегруються, наприклад, такі як pUC, pcDNA, pBR і т. п.

Інші приклади вірусних векторів включають аденовірусні, ретровірусні вектори, вектори на основі вірусу герпесу і AAV. Такі рекомбінантні віруси можна одержувати способами, відомими в даній галузі, такими як трансфекція упаковуваних клітин або транзиторна трансфекція плазмідами- або вірусами-помічниками. Типові приклади упаковуваних вірусів клітин включають клітини PA317, клітини PsiCRIP, клітини GPenV+, клітини 293 і т. д. Докладні протоколи одержання таких дефектних по реплікації рекомбінантних вірусів можна знайти, наприклад, у WO 95/14785, WO 96/22378, US 5882877, US 6013516, US 4861719, US 5278056 і WO 94/19478.

35 Додатковим об'єктом даного винаходу є клітина, трансфікована, інфікована або трансформована нуклеїновою кислотою і/або вектором за винаходом.

Термін "трансформація" означає введення "чужорідного" (тобто не власного) гена, послідовності ДНК або РНК у клітину-хазяїна так, що клітина-хазяїн починає експресувати введений ген або послідовність з одержанням бажаної речовини, як правило білка або ферменту, кодованої геном або послідовністю, що вводиться. Клітина-хазяїн, яка одержала і експресує ДНК або РНК, що вводиться, є "трансформованою".

Нуклеїнові кислоти за винаходом можна використовувати для одержання рекомбінантного антитіла за винаходом в придатній експресуючій системі. Термін "експресуюча система" означає клітину-хазяїна і сумісний вектор в умовах, придатних, наприклад, для експресії білка, кодованого чужорідною ДНК, що переноситься вектором і введена в клітину-хазяїна.

Типові експресуючі системи включають клітини-хазяїни E. coli і плазмідні вектори, клітини-хазяїни комах і бакуловірусні вектори і клітини-хазяїни ссавців і вектори. Інші приклади клітин-хазяїнів включають, але не обмежуючись ними, прокаріотичні клітини (такі як бактерії) і еукаріотичні клітини (такі як дріжджові клітини, клітини ссавців, клітини комах, клітини рослин і т. д.). Конкретні приклади включають E. coli, дріжджі Kluyveromyces або Saccharomyces, лінії клітин ссавців (наприклад, клітини Vero, клітини CHO, клітини 3T3, клітини COS і т. д.), а також первинні або стабілізовані культури клітин ссавців (наприклад, одержувані з лімфобластів, фібробластів, ембріональних клітин, епітеліальних клітин, нервових клітин, адипоцитів і т. д.). Приклади також включають клітини SP2/0-Ag14 миші (ATCC CRL1581), клітини P3X63-Ag8.653 миші (ATCC CRL1580), клітини CHO з дефектним геном дигідрофолатредуктази (далі в даному описі позначуваним як "ген DHFR") (Urlaub G. et al. 1980), клітини YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 щура (ATCC CRL1662, далі в даному описі позначувані як "клітини YB2/0") і т. п. В одному з варіантів здійснення використовують клітини YB2/0, через посилення активності ADCC химерних або гуманізованих антитіл при експресії в цих клітинах.

Для експресії гуманізованого антитіла експресуючий вектор може бути вектором такого типу, де ген, кодуючий важкий ланцюг антитіла, і ген, кодуючий легкий ланцюг антитіла, знаходяться на окремих векторах, або типу, де обидва гени знаходяться на одному і тому ж векторі (тандемного типу). Відносно простоти конструювання експресуючого гуманізованого антитіла вектора, простоти введення в клітини тварин і балансу між рівнем експресії ланцюгів H і L антитіл у клітинах тварин, експресуючий гуманізоване антитіло вектор являє собою вектор тандемного типу (Shitara K. et al. J. Immunol. Methods. 1994 Jan. 3; 167(1-2):271-8). Приклади експресуючого гуманізованого антитіло вектора тандемного типу включають pKANTEX93 (WO 97/10354), pEE18 і т. п.

Даний винахід також стосується способу одержання рекомбінантної клітини-хазяїна, експресуючої антитіло за винаходом, де зазначений спосіб включає стадії: (i) введення рекомбінантної нуклеїнової кислоти або вектора, як описано вище, у компетентні клітини-хазяїни *in vitro* або *ex vivo*, (ii) культивування одержаних рекомбінантних клітин-хазяїнів *in vitro* або *ex vivo*, і (iii) необов'язкового відбору клітин, експресуючих і/або секретуючих зазначене антитіло.

Такі рекомбінантні клітини-хазяїни можна використовувати для одержання антитіл за винаходом.

Способи одержання антитіл за винаходом

Антитіла за винаходом можна одержувати будь-яким способом, відомим у даній галузі, але без обмежень, таким як будь-який хімічний, біологічний, генетичний або ферментативний спосіб, окремо або в комбінації.

Знаючи амінокислотну послідовність бажаної послідовності, фахівець у даній галузі може легко одержувати зазначені антитіла або ланцюги імуноглобулінів стандартними способами одержання поліпептидів. Наприклад, їх можна синтезувати добре відомим способом твердофазного синтезу з використанням комерційно доступного пристрою для пептидного синтезу (такого, як виробляє Applied Biosystems, Foster City, California) і інструкцій виробника. Альтернативно, антитіла і ланцюги імуноглобулінів за винаходом можна синтезувати за допомогою технологій рекомбінантних ДНК, як добре відомо в даній галузі. Наприклад, ці фрагменти можна одержувати як продукти експресії ДНК після введення послідовностей ДНК, кодуючих бажаний (полі)пептид у експресуючі вектори і введення таких векторів придатним еукаріотичним або прокаріотичним хазяїнам, які експресують бажаний поліпептид, з яких їх пізніше можна виділяти добре відомими способами.

Крім того винахід стосується способу одержання антитіла за винаходом, де спосіб включає стадії: (i) культивування трансформованих клітин-хазяїнів за винаходом; (ii) експресії зазначеного антитіла або поліпептиду, і (iii) відновлення зазначеного антитіла або поліпептиду.

Антитіла за винаходом придатним способом виділяють із середовища для культивування загальноприйнятими способами очищення імуноглобулінів, такими як, наприклад, білок А-сефароза, хроматографія на гідроксіапатиті, електрофорез у гелі, діаліз або афінна хроматографія.

В одному з варіантів здійснення гуманізоване химерне антитіло за даним винаходом можна продукувати одержанням послідовності нуклеїнових кислот, кодуючих гуманізовані домени VL і VH, як описано вище, конструюючи експресуючий химерне антитіло людини вектор, вставляючи їх у експресуючий вектор для клітин тварин, що несе гени, кодуючі CH антитіла людини і CL антитіла людини, і експресуючи кодуючу послідовність, вводячи експресуючий вектор у клітину тварини.

Відносно домену CH химерного антитіла людини, він може являти собою будь-яку область, що належить важким ланцюгам імуноглобулінів людини, але придатними є області класу IgG, а також можна використовувати будь-який з підкласів, що належать класу IgG, таких як IgG1, IgG2, IgG3 і IgG4. Також відносно CL химерного антитіла людини, він може являти собою будь-яку область, що належить легким ланцюгам імуноглобулінів людини, і можна використовувати області класу каппа або класу лямбда.

Способи одержання гуманізованих або химерних антитіл включають загальноприйняті способи рекомбінантних ДНК і трансфекції генів, що добре відомі в даній галузі (див. Morrison S.L. et al. (1984) і патентні документи US 5202238 і US 5204244).

Способи одержання гуманізованих антитіл на основі загальноприйнятих способів рекомбінантних ДНК і трансфекції генів добре відомі в даній галузі (див., наприклад, Riechmann L. et al. 1988; Neuberger M.S. et al. 1985). Антитіла можна гуманізувати рядом способів, відомих у даній галузі, включаючи, наприклад, спосіб, описаний у заявці WO 2009/032661, щеплення CDR (EP 239400; публікація PCT WO91/09967; патенти США №№ 5225539; 5530101 і 5585089), вінірування або зміну поверхні (EP 592106; EP 519596; Padlan E.A. (1991); Studnicka G.M. et al.

(1994); Roguska M.A. et al. (1994)) і перестановку ланцюгів (патент США № 5565332). Загальна технологія рекомбінантних ДНК для одержання таких антитіл також відома (див. Європейську патентну заявку EP 125023 і міжнародну патентну заявку WO 96/02576).

5 Fab за даним винаходом можна одержувати, обробляючи антитіло, що специфічно реагує з SEACAM5, протеазою, такою як папаїн. Також Fab можна одержувати, вставляючи послідовності ДНК, кодуючі ланцюги антитіла Fab, у вектор для експресії у прокаріот або для експресії у еукаріот і вводячи вектор у прокаріотичні або еукаріотичні клітини (за необхідності) з експресією Fab.

10 $F(ab')_2$ за даним винаходом можна одержувати, обробляючи антитіло, що специфічно реагує з SEACAM5, протеазою пепсином. Також $F(ab')_2$ можна одержувати, зв'язуючи Fab', описані нижче, за допомогою тіоефірного зв'язку або дисульфідного зв'язку.

Fab' за даним винаходом можна одержувати, обробляючи $F(ab')_2$, що специфічно реагує з SEACAM5, відновником, таким як дитіотреїтол. Також Fab' можна одержувати, вставляючи послідовності ДНК, кодуючі ланцюги антитіла Fab', у вектор для експресії у прокаріот або у вектор для експресії у еукаріот і вводячи вектор у прокаріотичні або еукаріотичні клітини (за необхідності) з проведенням його експресії.

20 scFv за даним винаходом можна одержувати, беручи послідовності CDR або доменів VH і VL, як описано вище, конструюючи ДНК, кодуючу фрагмент scFv, вставляючи ДНК у прокаріотичний або еукаріотичний експресуючий вектор і потім вводячи експресуючий вектор у прокаріотичні або еукаріотичні клітини (за необхідності) з експресією scFv. Для одержання гуманізованого фрагмента scFv, можна використовувати добре відому технологію, названу щеплення CDR, що включає вибір областей, що визначають комплементарність (CDR), за винаходом і щеплення їх на каркас фрагмента scFv людини відомої тривимірної структури (див., наприклад, WO 98/45322; WO 87/02671; US 5859205; US 5585089; US 4816567; EP 0173494).

25 Модифікація антитіл за винаходом

Передбачена модифікація(ї) послідовності амінокислот антитіл, описаних у даному документі. Наприклад, може бути бажаним поліпшити афінність зв'язування і/або інші біологічні властивості антитіл. Відомо, що, коли гуманізоване антитіло одержують тільки простим щепленням CDR з VH і VL антитіла, одержаного у тварини, що не є людиною, у FR VH і VL антитіла людини, можна відновлювати антигензв'язувальну активність порівняно з активністю вихідного антитіла, одержаного у тварини, що не є людиною. Вважають, що з антигензв'язувальною активністю прямо або опосередковано може бути асоційовано декілька амінокислотних залишків VH і VL антитіла, що не належить людині, не тільки в CDR, але також і в FR. Таким чином, заміна цих амінокислотних залишків іншими амінокислотними залишками, 35 що походять з FR VH і VL антитіла людини, буде знижувати активність зв'язування. Для вирішення цієї проблеми в антитілах людини з щепленими CDR, що не належать людині, варто починати спроби ідентифікувати в амінокислотних послідовностях FR VH і VL антитіл людини амінокислотний залишок, який безпосередньо асоційований зі зв'язуванням антитіла або який взаємодіє з амінокислотним залишком CDR, або який підтримує тривимірну структуру антитіла і який безпосередньо асоційований зі зв'язуванням з антигеном. Знижену антигензв'язувальну активність можна підвищувати, замінюючи ідентифіковані амінокислоти амінокислотними залишками вихідного антитіла, одержаного у тварини, що не є людиною.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу шість CDR антитіла миші за винаходом і три амінокислоти з його каркаса прищеплювали на каркас, що належить людині, що приводило до одержання гуманізованого антитіла (MAb2_VLg5VHg2) з важким ланцюгом з послідовністю SEQ ID NO:74 і легким ланцюгом з послідовністю SEQ ID NO:75, яке зберігало характеристики зв'язування з SEACAM5 людини і яванського макака.

У структурах антитіл за даним винаходом й в кодуючих їх послідовностях ДНК можна проводити модифікації і зміни і, проте, одержувати функціональне антитіло або поліпептид з бажаними характеристиками.

50 При внесенні змін в амінокислотні послідовності поліпептиду, варто враховувати індекс гідрофобності амінокислот. У даній галузі в основному зрозуміла важливість індексу гідрофобності амінокислот у забезпеченні функції біологічної взаємодії білка. Загальновідомо, що відносно гідрофобний характер амінокислоти додає внесок у вторинну структуру одержуваного білка, що у свою чергу визначає взаємодію білка з іншими молекулами, наприклад ферментами, субстратами, рецепторами, ДНК, антитілами, антигенами і т. п. У кожній амінокислоті визначений індекс гідрофобності на основі її гідрофобності і характеристик заряду, вони являють собою: ізолейцин (+4,5); валін (+4,2); лейцин (+3,8); фенілаланін (+2,8); цистеїн/цистин (+2,5); метіонін (+1,9); аланін (+1,8); гліцин (-0,4); треонін (-0,7); серин (-0,8);

триптофан (-0,9); тирозин (-1,3); пролін (-1,6); гістидин (-3,2); глутамінат (-3,5); глутамін (-3,5); аспартат (-3,5); аспарагін (-3,5); лізин (-3,9) і аргінін (-4,5).

Додатковим об'єктом за даним винаходом є варіанти поліпептидів за даним винаходом зі збереженням функції.

Наприклад, визначені амінокислоти в структурі білка можна замінити іншими амінокислотами без суттєвої втрати активності. Оскільки здатність до взаємодії і характер білка визначають його біологічну функціональну активність, можна проводити визначені заміни амінокислот у послідовності білка і, звичайно, в кодуючій його послідовності ДНК, однак при цьому одержуючи білок з подібними властивостями. Таким чином, передбачено, що в послідовностях антитіл за винаходом або у відповідних послідовностях ДНК, кодуючих зазначені поліпептиди, можна проводити різні зміни без суттєвої втрати їх біологічної активності.

У даній галузі відомо, що визначені амінокислоти можна замінити іншими амінокислотами з подібним індексом або показником гідрофобності і, проте, одержувати білок з подібною біологічною активністю, тобто як і раніше одержувати біологічно функціонально еквівалентний білок. Для ідентифікації в антитілі або поліпептиді за винаходом всіх амінокислот, які можна замінити без значної втрати зв'язування з антигеном, також можна використовувати добре відомі способи, такі як спосіб зі скануванням аланіном. Такі залишки можна кваліфікувати як нейтральні, оскільки вони не залучені в зв'язування антигену або в підтримання структури антитіла. Одне або декілька цих нейтральних положень можна заміщати аланіном або іншою амінокислотою без змін основних характеристик антитіла або поліпептиду за винаходом.

Це проілюстровано в даному винаході за допомогою способу зі скануванням аланіном, проведеного на CDR MAb2_{K52R}, який продемонстрував, що декілька положень цих CDR, очевидно, є нейтральними, оскільки аланін фактично можна замінити без достовірного впливу на зв'язування з CEACAM5 людини і яванського макака. Таким чином, очікують, що варіанти антитіл, одержані після таких нейтральних заміни, залишаться функціонально ідентичними вихідному антитілу. У прикладі 6.4, що наводиться, проводили заміни в гуманізованому варіанті MAb2, але передбачувано, що подібні варіації також будуть зберігати біологічну функцію при введенні в будь-який варіант MAb2, Mab4 або Mab5, оскільки всі ці споріднені антитіла несуть один і той же набір з 6 CDR або дуже близькоспоріднених CDR. Нейтральні положення можна визначити як залишки 27, 28, 29, 31, 51, 52, 89, 90, 93, 94, 96, 97 у послідовностях VL цього сімейства антитіл (SEQ ID NO:34 або SEQ ID NO:38, або SEQ ID NO:40, або SEQ ID NO:17, або SEQ ID NO:23, або SEQ ID NO:29, або SEQ ID NO:55, або SEQ ID NO:75) і залишки 26-31, 51-58, 97, 103, 104, 107, 109 у послідовностях VH цього сімейства антитіл (SEQ ID NO:33 або SEQ ID NO:37, або SEQ ID NO:39, або SEQ ID NO:5, або SEQ ID NO:51, або SEQ ID NO:74).

Нейтральні положення можна представити як положення, де в CDR Mab2, Mab4 або Mab5 можна проводити будь-яку заміну амінокислоти. Фактично, у принципі сканування аланіном аланін вибраний, оскільки цей залишок не несе особливих структурних або хімічних властивостей. Загальновізнано, що, якщо аланіном можна замінити конкретну амінокислоту без зміни властивостей білка, багато інших заміни, якщо не всі заміни, амінокислот, з великою імовірністю, також будуть нейтральними. У іншому випадку, коли аланін є амінокислотою дикого типу, якщо показано, що конкретна заміна є нейтральною, з великою імовірністю інші заміни також будуть нейтральними.

У наведеному прикладі 6.4 у CDR Mab2, Mab4 або Mab5 також ідентифіковані чотири положення, для яких виявлено, що вони не є нейтральними відносно сканування аланіном, але де заміни амінокислот консервативного типу мають нейтральну дію (залишки 30 і 92 у послідовностях VL і залишки 98 і 100 у послідовностях VH цього сімейства антитіл).

Також очікують, що дві або більше нейтральних мутацій в різних положеннях у будь-якій або в обох послідовностях антитіла при комбінації, як правило, приведуть до антитіла, яке значною мірою зберігає функціональну активність вихідного антитіла. Це проілюстровано, наприклад, на комбінованих замінах LC_T51A і LC_T94A, VL_S31A і VH_G54Y або VL_T53I і VH_S53A в MAb2_VLg5VHg2.

Як викладено вище, заміни амінокислот, таким чином, як правило, основані на відносній подібності замісників бічних ланцюгів амінокислот, наприклад на їх гідрофобності, гідрофільності, заряді, розмірі і т. п. Ілюстративні заміни, що враховують будь-яку з зазначених вище характеристик, добре відомі фахівцям у даній галузі і включають: аргінін і лізин; глутамінат і аспартат; серин і треонін; глутамін і аспарагін і валін, лейцин і ізолейцин.

Також може бути бажано модифікувати антитіло за винаходом відносно ефекторної функції, наприклад, щоб підсилити обумовлену антигеном опосередковану клітинами цитотоксичність (ADCC) і/або обумовлену комплементом цитотоксичність (CDC) антитіла. Цього можна досягти

за допомогою проведення однієї або декількох заміни амінокислот у Fc-області антитіла. Альтернативно або додатково, у Fc-область можна вводити залишок(ки) цистеїну, таким чином, забезпечуючи формування в цій області дисульфідного зв'язку між ланцюгами. Одержане, таким чином, гомодимерне антитіло може мати поліпшену здатність до інтерналізації і/або посилене, обумовлене комплементом, знищення клітин і/або антитілозалежну клітинну цитотоксичність (ADCC) (Caron P.C. et al. 1992; i Shopes B. 1992).

Інший тип модифікації амінокислот антитіла за винаходом може бути придатний для зміни вихідного профілю глікозилювання антитіла, тобто за допомогою видалення однієї або декількох вуглеводних груп, що знаходяться в антитілі, і/або додавання однієї або декількох ділянок глікозилювання, що не представлені в антитілі. Присутність будь-якої з трипептидних послідовностей аспарагін-Х-серин і аспарагін-Х-треонін, де Х являє собою будь-яку амінокислоту за винятком проліну, створює потенційну ділянку глікозилювання. Додавання або видалення ділянки глікозилювання в антитілі придатним чином проводять, змінюючи послідовність амінокислот так, щоб вона містила одну або декілька описаних вище трипептидних послідовностей (для N-зв'язаних ділянок глікозилювання).

Інший тип модифікації включає видалення послідовностей, *in silico* або експериментально визначених, як такі, що потенційно приводять до продуктів руйнування або гетерогенності препаратів антитіл. Як приклади, залежно від таких факторів, як pH і поверхнева експозиція, може відбуватися дезамідування залишків аспарагіну і глутаміну. Особливо чутливі до дезамідування залишки аспарагіну, переважно, коли вони знаходяться в послідовності Asn-Gly, і в меншій мірі в інших дипептидних послідовностях, таких як Asn-Ala. Таким чином, коли в антитілі або поліпептиді за винаходом присутня така ділянка дезамідування, зокрема Asn-Gly, може бути бажано видалити цю ділянку, як правило, за допомогою консервативної заміни з видаленням одного з залишків-учасників. Такі заміни в послідовності з видаленням одного з залишків-учасників також призначені для включення в даний винахід.

Інший тип ковалентної модифікації включає хімічне або ферментативне зв'язування з антитілом глікозидів. Ці способи переважні тим, що вони не вимагають одержання антитіла в клітині-хазяїні, що має здатність до глікозилювання, для N- або O-зв'язаного глікозилювання. Залежно від використовуваного способу зв'язування, цукор(ри) можна приєднувати до (a) аргініну і гістидину, (b) вільних карбоксильних груп, (c) вільних сульфгідрильних груп, таких як групи цистеїну, (d) вільних гідроксильних груп, таких як групи серину, треоніну або гідроксипроліну, (e) ароматичних залишків, таких як залишки фенілаланіну, тирозину або триптофану, або (f) амідної групи глутаміну. Наприклад, такі способи описані в WO 87/05330.

Видалення будь-якої вуглеводної групи, що знаходиться на антитілі, можна проводити хімічно або ферментативно. Хімічне деглікозилювання вимагає впливу на антитіло сполуки трифторметансульфонової кислоти або еквівалентної сполуки. Ця обробка приводить до відщиплення більшості або всіх цукрів за винятком зв'язувального цукру (N-ацетилглюкозамін або N-ацетилгалактозамін), залишаючи антитіло інтактним. Хімічне деглікозилювання описане в Sojahr H. et al. (1987) і в Edge A.S. et al. (1981). Ферментативне відщиплення вуглеводних груп від антитіла можна проводити з використанням ряду ендо- і екzogлікозидаз, як описано в Thotakura N.R. et al. (1987).

Інший тип ковалентної модифікації антитіла включає зв'язування антитіла з одним з ряду небілкових полімерів, наприклад з поліетиленгліколем, поліпропіленгліколем або поліоксіалкіленами, способом, зазначеним у патентах США №№ 4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192 або 4179337.

Імунокон'югати

Даний винахід також стосується цитотоксичних кон'югатів або імунокон'югатів, або кон'югатів антитіло-лікарський засіб, або кон'югатів. Як використовують у даному описі, усі ці терміни мають одне і те ж значення і є взаємозамінними.

Антитіла миші, MAб1, MAб2, MAб3, MAб4 і MAб5, кон'югували з майтанзиноїдом (DM4) за допомогою лінкера SPDB (N-сукцинімідилпіридилдитіобутират). Виявлено, що одержані кон'югати антитіло-лікарський засіб (ADC) мають цитотоксичну активність на клітини раку шлунка MKN45 людини зі значеннями $IC_{50} \leq 1$ нМ.

Подібним чином одержували кон'югати антитіло-SPDB-DM4 на основі химерної форми кожного з MAб1, MAб2, MAб4 і MAб5. Одержані chMAб1-SPDB-DM4, chMAб2-SPDB-DM4, chMAб3-SPDB-DM4 і chMAб4-SPDB-DM4 оцінювали в двох дозах відносно первинних пухлин товстого кишечника CR-IGR-034P, що піддаються вимірюванню, п/ш імплантованих самкам мишей SCID. Аналіз зміни об'єму пухлини для кожної обробленої і контрольної тварини і % регресу пухлини продемонстрували, що chMAб2-SPDB-DM4, chMAб4-SPDB-DM4 і chMAб5-SPDB-DM4 були високоактивними, щонайменше при найбільшій оцінюваній дозі, і що chMAб2-

SPDB-DM4 був активний в обох оцінюваних дозах. Зокрема, одержували до 82 % регресу пухлини.

Кон'югати антитіло-SPDB-DM4 також одержували з використанням гуманізованих варіантів MAb2 (huMAb2-1-SPDB-DM4, huMAb2-2-SPDB-DM4 і huMAb2-3-SPDB-DM4). ADC, що містять химерні (chMAb2-SPDB-DM4) або гуманізовані варіанти MAb2, порівнювали з кон'югатом неспоріднене антитіло-SPDB-DM4 відносно цитотоксичної активності для клітин MKN45. Усі ADC з химерними і гуманізованими варіантами MAb2 демонстрували значення $IC_{50} \leq 1$ нМ, тобто значення IC_{50} у 53-35 разів менше, ніж виміряна цитотоксична активність кон'югата DM4 з неспорідненим антитілом, що, таким чином, свідчить про опосередковану CEACAM5 цитотоксичну активність кон'югатів з антитілами до CEACAM5.

Оцінювали протипухлинну активність huMAb2-3-SPDB-DM4 і huMAb2-4-SPDB-DM4 і порівнювали з chMAb2-SPDB-DM4 відносно вимірних первинних пухлин товстого кишечника CR-IGR-034P, п/ш імплантованих самкам голих мишей CD-1. Усі кон'югати були високоактивними при найбільшій оцінюваній дозі (10 мг/кг).

Додатково оцінювали протипухлинну активність huMAb2-3-SPDB-DM4 і huMAb2-3-сульфо-SPDB-DM4 відносно вимірних первинних пухлин товстого кишечника CR-IGR-034P, п/ш імплантованих самкам мишей SCID. huMAb2-3-SPDB-DM4 був активний при 5 і 2,5 мг/кг, huMAb2-3-сульфо-SPDB-DM4 був високоактивний при 5 мг/кг і активний при 2,5 мг/кг.

Додатково оцінювали протипухлинну активність huMAb2-3-SPDB-DM4 відносно вимірних первинних пухлин легень LUN-NIC-0014, п/ш імплантованих самкам мишей SCID, і виявлено, що вони були високоактивними при 10 і 5 мг/кг.

Кожен кон'югат з DM4 містив середню кількість молекул DM4 (або "відношення лікарський засіб-до-антитіла" або "DAR" знаходилося) у діапазоні від 2 до 5.

Таким чином, винахід стосується "імунокон'югатів", що містять антитіло за винаходом, зв'язане або кон'юговане щонайменше з одним інгібуючим ріст засобом, таким як цитотоксичний засіб або радіоактивний ізотоп.

"Інгібуючий ріст засіб" або "антипроліферативний засіб", який можна використовувати незалежно, належить до сполуки або композиції, яка інгібує ріст клітин, особливо пухлинних клітин, *in vitro* або *in vivo*.

Як використовують у даному описі, термін "цитотоксичний засіб" стосується речовини, що інгібує або попереджує функціонування клітин і/або викликає руйнування клітин. Термін "цитотоксичний засіб" призначений для включення хіміотерапевтичних засобів, ферментів, антибіотиків і токсинів, таких як низькомолекулярні токсини або ферментативно активні токсини бактеріального, грибового, рослинного або тваринного походження, включаючи їх фрагменти і/або варіанти, і різних протипухлинних засобів або засобів проти злоякісних пухлин, описаних нижче. У деяких варіантах здійснення цитотоксичний засіб являє собою таксоїд, алкалоїд барвінку, майтанзиноїд або аналог майтанзиноїду, такий як DM1 або DM4, низькомолекулярний лікарський засіб, томаміцин або похідне піролобензодіазепіну, похідне криптофіцину, похідне лептопіцину, ауристин або аналог доластатину, пролікарський засіб, інгібітори топоізомерази II, алкілюючий ДНК засіб, антитубуліновий засіб, CC-1065 або аналог CC-1065.

Як використовують у даному описі, "майтанзиноїди" означають мایتанзиноїди й аналоги мایتанзиноїдів. Мایتанзиноїди являють собою лікарські засоби, які інгібують формування мікротрубочок і які є високотоксичними для клітин ссавців.

Приклади придатних мایتанзиноїдів включають мایتанзинол і аналоги мایتанзинолу.

Приклади придатних аналогів мایتанзинолу включають аналоги мایتанзинолу з модифікованим ароматичним кільцем і аналоги мایتанзинолу з модифікаціями в інших положеннях. Такі придатні мایتанзиноїди описані в патентах США №№ 4424219; 4256746; 4294757; 4307016; 4313946; 4315929; 4331598; 4361650; 4362663; 4364866; 4450254; 4322348; 4371533; 6333410; 5475092; 5585499 і 5846545.

Конкретні приклади придатних аналогів мایتанзинолу з модифікованим ароматичним кільцем включають:

(1) C-19-дехлор (патент США № 4256746) (одержаний за допомогою відновлення ЛАН ансамітоцину Р2);

(2) C-20-гідрокси-(або C-20-деметил)+/-C-19-дехлор (патенти США №№ 4361650 і 4307016) (одержаний за допомогою деметилування з використанням *Streptomyces* або *Actinomyces* або дехлорування з використанням ЛАН); і

(3) C-20-деметокси, C-20-ацилокси (-OCOR), +/-дехлор (патент США № 4294757) (одержаний за допомогою ацилювання з використанням ацилхлоридів).

Конкретні приклади придатних аналогів мایتанзинолу з модифікаціями в інших положеннях включають:

(1) C-9-SH (патент США № 4424219) (одержаний за допомогою реакції майтанзінолу з H_2S або P_2S_5);

(2) C-14-алкоксиметил (деметокси/ CH_2OR) (патент США № 4331598);

(3) C-14-гідроксиметил або ацилоксиметил (CH_2OH або CH_2OAc) (патент США № 4450254) (одержаний у *Nocardia*);

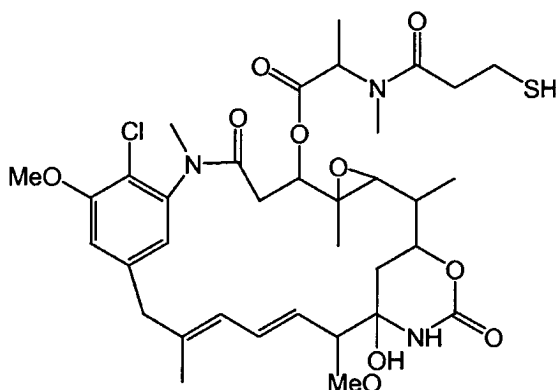
(4) C-15-гідрокси/ацилокси (патент США № 4364866) (одержаний за допомогою перетворення майтанзінолу *Streptomyces*);

(5) C-15-метокси (патенти США №№ 4313946 і 4315929) (виділений з *Trewia nudiflora*);

(6) C-18-н-деметил (патенти США №№ 4362663 і 4322348) (одержаний за допомогою деметилювання майтанзінолу *Streptomyces*); і

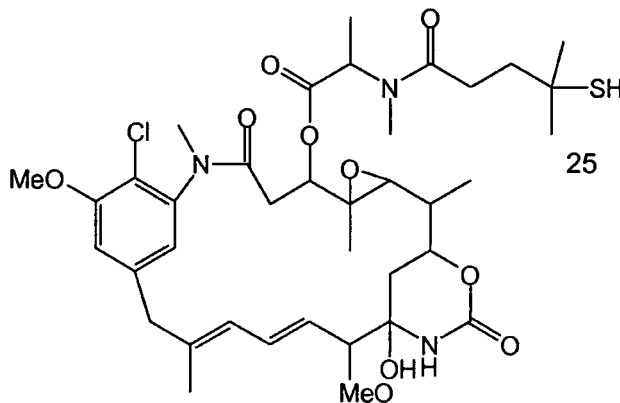
(7) 4,5-дезоксид (патент США № 4371533) (одержаний за допомогою відновлення майтанзінолу трихлоридом титану/ LAH).

В одному з варіантів здійснення винаходу в цитотоксичних кон'югатах за даним винаходом як цитотоксичний засіб використовують тіолвмісний майтанзіноїд (DM1), формально називаний $N^{2'}$ -деацетил- $N^{2'}$ -(3-меркапто-1-оксопропіл)майтанзин. DM1 представлений наступною структурною формулою (I):



(I).

В іншому варіанті здійснення в цитотоксичних кон'югатах за даним винаходом як цитотоксичний засіб використовують тіолвмісний майтанзіноїд DM4, формально називаний $N^{2'}$ -деацетил- $N^{2'}$ -(4-метил-4-меркапто-1-оксопентил)майтанзин. DM4 представлений наступною структурною формулою (II):



(II)

У додаткових варіантах здійснення винаходу можна використовувати інші майтанзини, включаючи тіол- і дисульфідвмісні майтанзіноїди, що містять моно- або діалкільну заміну на атомі вуглецю, що несе атом сірки. Вони включають майтанзіноїд, що містить у C-3, C-14-гідроксиметил, C-15-гідрокси або C-20-дезметил, бічний ланцюг ацилованої амінокислоти з ацильною групою, що несе просторово утруднену сульфгідрильну групу, де атом вуглецю ацильної групи, що несе тільки функціональну групу, містить один або два замісники, де зазначені замісники являють собою CH_3 , C_2H_5 , лінійний або розгалужений алкіл або алкеніл, що містить від 1 до 10 реагентів, і в розчині може бути присутнім будь-який агрегат.

Приклади цих цитотоксичних засобів і способів кон'югації додатково наведені в заявці WO 2008/010101, що включена за допомогою посилання.

Термін "радіоактивний ізотоп" призначений для включення радіоактивних ізотопів, придатних для лікування злоякісних пухлин, таких як At^{211} , Bi^{212} , Er^{169} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , In^{111} , P^{32} ,

Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Sr⁸⁹ і радіоактивні ізотопи Lu. Як правило, такі радіоактивні ізотопи в основному випромінюють бета-випромінювання. В одному з варіантів здійснення радіоактивний ізотоп являє собою ізотоп, що випромінює альфа-випромінювання, більш конкретно торій-227, який випромінює альфа-випромінювання. Імунокон'югати за даним винаходом можна одержувати, як описано в заявці WO 2004/091668.

У деяких варіантах здійснення антитіла за даним винаходом ковалентно, напряду або за допомогою розщеплюваного або нерозщеплюваного лінкера, зв'язані щонайменше з одним інгібуючим ріст засобом.

Як використовують у даному описі, "лінкер" означає хімічну молекулу, яка містить ковалентний зв'язок або ланцюг атомів, що ковалентно зв'язують поліпептид з молекулою лікарського засобу.

Кон'югати можна одержувати способами *in vitro*. Для зв'язування лікарського засобу або пролікарського засобу з антитілом використовують лінкерну групу. Придатні лінкерні групи добре відомі в даній галузі і включають дисульфідні групи, тїоефірні групи, кислотолабільні групи, фототлабільні групи, пептидазоллабільні групи і естеразоллабільні групи. Кон'югацію антитіла за винаходом з цитотоксичними засобами або інгібуючими ріст засобами можна проводити з використанням ряду біфункціональних засобів, що зв'язують білки, включаючи, але не обмежуючись ними, N-сукцинімідилпіридилдитіобутират (SPDB), 4-[(5-нітро-2-піридиніл)дитіо]-2,5-діоксо-1-піролідиніловий ефір бутанової кислоти (нітро-SPDB), 4-(піридин-2-їлдисульфаніл)-2-сульфомасляну кислоту (сульфо-SPDB), N-сукцинімідил(2-піридилдитіо)пропіонат (SPDP), сукцинімідил(N-малеїмідометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), імінотіолан (IT), біфункціональні похідні складних імідоефірів (такі як диметиладипімідат HCL), активні складні ефіри (такі як дисукцинімідилсуберат), альдегіди (такі як глутаровий альдегід), бісазидосполуки (такі як біс-(п-азидобензоїл)гександіамін), похідні бісдіазонію (такі як біс-(п-діазонійбензоїл)етилендіамін), діізоціанати (такі як толуол-2,6-діізоціанат) і сполуки бісактивного фтору (такі як 1,5-дифтор-2,4-динітробензол). Наприклад, можна одержувати рициновий імунотоксин, як описано в Vitetta et al. (1987). Ілюстративним хелатуючим засобом для кон'югації радіонуклеотиду з антитілом є мічена по вуглецю 1-ізоціанатобензилметилдіетилентриамінпентаоцтова кислота (MX-DTPA) (WO 94/11026).

Лінкер може являти собою "розщеплюваний лінкер", що полегшує вивільнення цитотоксичного засобу або інгібуючого ріст засобу в клітині. Наприклад, можна використовувати кислотолабільний лінкер, чутливий до пептидаз лінкер, естеразоллабільний лінкер, фототлабільний лінкер або дисульфідвмісний лінкер (наприклад, див. патент США № 5208020). Також лінкер може бути "нерозщеплюваним лінкером" (наприклад, лінкер SMCC), що в деяких випадках може приводити до кращої переносимості.

Альтернативно, за допомогою рекомбінантних способів або пептидного синтезу можна одержувати злитий білок, що містить антитіло за винаходом і цитотоксичний або інгібуючий ріст поліпептид. Послідовність ДНК може містити відповідні області, кодуєчі дві частини кон'югата, або одну поруч з іншою, або розділені областю, кодуєчою лінкерний пептид, що не порушує бажані властивості кон'югата.

Антитіла за даним винаходом також можна використовувати в залежній опосередкованій ферментами терапії пролікарськими засобами за допомогою кон'югації поліпептиду з активуючим пролікарський засіб ферментом, що перетворює пролікарський засіб (наприклад, пептидильний хіміотерапевтичний засіб, див. WO 81/01145) в активний протираковий лікарський засіб (див., наприклад, WO 88/07378 і патент США № 4975278). Ферментативний компонент імунокон'югата, придатний для ADEPT, включає будь-який фермент, здатний діяти на пролікарський засіб таким чином, щоб перетворювати його в більш активну, цитотоксичну форму. Ферменти, що придатні в способі за даним винаходом, включають, але не обмежуючись ними, лужну фосфатазу, придатну для перетворення у вільні лікарські засоби фосфатвмісних пролікарських засобів; арилсульфатазу, придатну для перетворення у вільні лікарські засоби сульфатвмісних пролікарських засобів; цитозиндезаміназу, придатну для перетворення в протираковий лікарський засіб 5-фторурацил, нетоксичний фторцитозин; протеази, такі як протеаза Serratia, термолізін, субтилізін, карбоксипептидази і катепсини (такі як катепсини B і L), які придатні для перетворення у вільні лікарські засоби пептидвмісних пролікарських засобів; D-аланілкарбоксипептидази, придатні для перетворення пролікарських засобів, що містять замісники D-амінокислот; розщеплюючі вуглеводи ферменти, такі як O-галактозидаза і нейрамінідаза, придатні для перетворення у вільні лікарські засоби глікозилованих пролікарських засобів; Р-лактамазу, придатну для перетворення у вільні лікарські засоби лікарських засобів, дериватизованих Р-лактамами; і пеніцилінамідази, такі як пеніцилін V амідаза або пеніцилін G амідаза, придатні для перетворення у вільні лікарські засоби лікарських

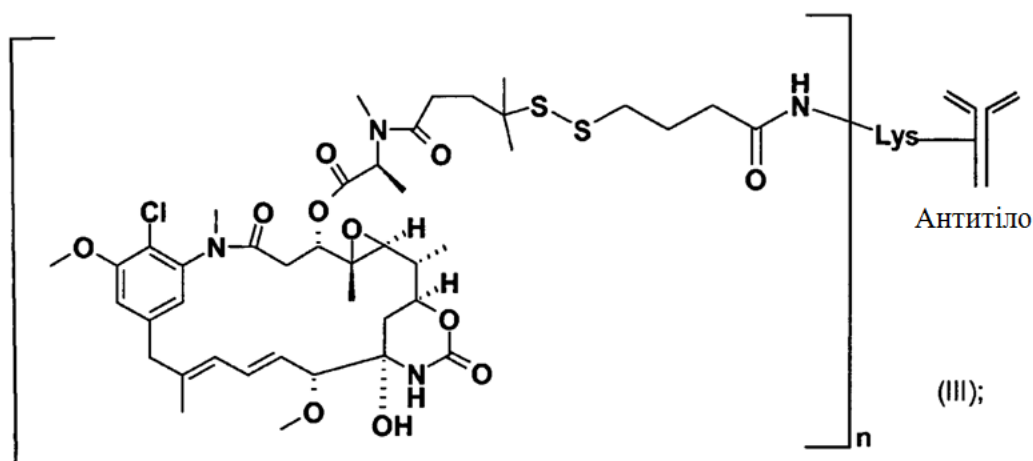
засобів, дериватизованих по їх атомах азоту амінів феноксіацетильними або фенілацетильними групами, відповідно. Ферменти можна ковалентно зв'язувати з поліпептидами за винаходом способами, добре відомими в даній галузі, такими як використання гетеробіфункціональних зшивальних реагентів, описаних вище.

5 Відповідно до одного з варіантів здійснення, інгібуючий ріст засіб у кон'югаті за винаходом являє собою майтанзиноїд, в одному з варіантів здійснення DM1 або DM4.

У зазначеному кон'югаті антитіло кон'юговане з зазначеним щонайменше одним інгібуючим ріст засобом за допомогою лінкерної групи. В одному з варіантів здійснення зазначена лінкерна група являє собою розщеплюваний або нерозщеплюваний лінкер, такий як SPDB, сульфо-SPDB або SMCC.

10 Кон'югат можна вибирати з групи, що складається з:

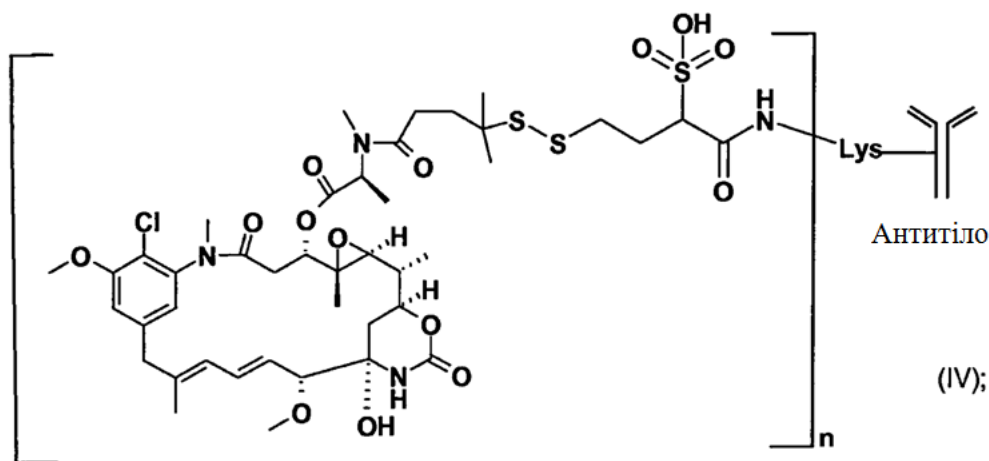
i) кон'югата антитіло-SPDB-DM4 формули (III):



Ab-SPDB-DM4

15

ii) кон'югата антитіло-сульфо-SPDB-DM4 формули (IV):

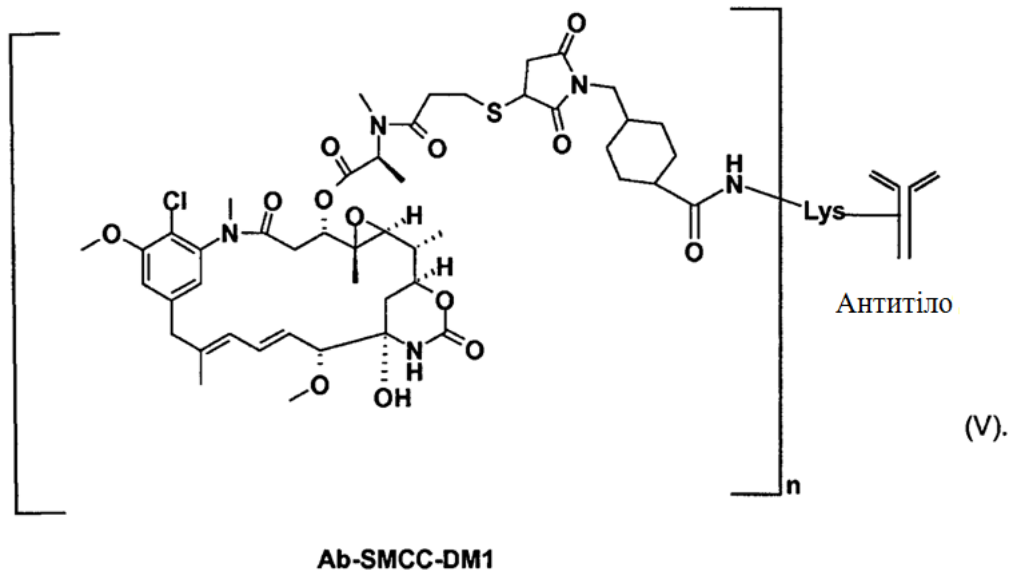


Ab-SulfoSPDB-DM4

i

20

iii) кон'югата антитіло-SMCC-DM1 формули (V):



У зазначеному варіанті здійснення антитіла, яке включається в кон'югат, вибране з групи, що складається з:

- 5 i) гуманізованого антитіла, що містить важкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO:51 і легкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO:17,
- ii) гуманізованого антитіла, що містить важкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO:5 і легкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO:23,
- 10 iii) гуманізованого антитіла, що містить важкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO:5 і легкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO:29, і
- iv) гуманізованого антитіла, що містить важкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO:51 і легкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO:55.

В одному з варіантів здійснення кон'югат являє собою кон'югат формули (III), (IV) або (V), як визначено вище, у якому антитіло являє собою гуманізоване антитіло, що містить важкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO:5 і легкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO:29.

Як правило, кон'югат можна одержувати способом, який включає стадії:

- (i) приведення необов'язково забуференого водного розчину зв'язуючого клітини засобу (наприклад, антитіла за винаходом) у контакт із розчинами лінкера і цитотоксичної сполуки;
- 20 (ii) наступного необов'язкового відділення кон'югата, що утворюється в (i), від зв'язуючого клітини засобу, що не прореагував.

Водний розчин зв'язуючого клітини засобу можна буферувати такими буферами, як, наприклад, фосфат, ацетат, цитрат калію або N-2-гідроксіетилпіперазин-N'-2-етансульфонова кислота (буфер Hepes). Буфер залежить від характеру зв'язуючого клітини засобу. Цитотоксична сполука знаходиться в розчині в органічному полярному розчиннику, наприклад у диметилсульфоксиді (ДМСО) або диметилацетаміді (DMA).

Температура реакції, як правило, складає від 20 до 40 °C. Час реакції може варіювати від 1 до 24 годин. Реакцію між зв'язуючим клітини засобом і цитотоксичним засобом можна контролювати за допомогою ексклюзивної хроматографії (SEC) з використанням рефрактометричного і/або УФ-детектора. Якщо вихід кон'югата є занадто низьким, можна збільшити час реакції.

Для проведення розділення на стадії (ii) фахівець у даній галузі може використовувати ряд різних методів хроматографії: наприклад, кон'югат можна очищати за допомогою SEC, адсорбційної хроматографії (такої як іонообмінна хроматографія, IEC), гідрофобної хроматографії (HIC), афінної хроматографії, хроматографії зі змішаною підкладкою, такої як хроматографія на гідроксіапатиті, або високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Також можна використовувати очищення за допомогою діалізу або діалізації.

Як використовують у даному описі, термін "агрегати" означає асоціати, що можуть формуватися між двома або більше зв'язуючими клітини засобами, де зазначені засоби є модифікованими, або не за допомогою кон'югації. Агрегати можуть утворюватися під впливом великої кількості параметрів, таких як висока концентрація зв'язуючого клітини засобу в розчині, рН розчину, високе напруження зсуву, кількість зв'язаних димерів і їх характер гідрофобності, температура (див. Wang & Gosh, 2008, J. Membrane Sci., 318: 311-316, і цитовані там

посилання); слід зазначити, що відносний вплив деяких з цих параметрів точно не встановлений. У випадку білків і антитіл, фахівець у даній галузі може звернутися до Cromwell et al. (2006, AAPS Journal, 8(3):E572-E579). Вміст агрегатів можна визначати добре відомим фахівцям способом, таким як SEC (див. Walter et al., 1993, Anal. Biochem., 212(2):469-480).

Після стадії (i) або (ii), розчин, що містить кон'югат, може бути підданий додатковій стадії (iii) хроматографії, ультрафільтрації і/або діалізації.

Після проведення цих стадій кон'югат відновлюють у водному розчині.

Відповідно до одного з варіантів здійснення, кон'югат за винаходом характеризується "відношенням лікарського засобу до антитіла" (або "DAR") у діапазоні від 1 до 10, наприклад від 2 до 5, зокрема від 3 до 4. Як правило, це являє собою випадок кон'югатів, що містять молекули майтанзиноїдів.

Ця величина DAR може варіювати залежно від характеру використовуваного антитіла і лікарського засобу (тобто інгібуючого рід засобу) поряд з експериментальними умовами, використовуваними для кон'югації (подібних до відношення інгібуючого рід засобу/антитіла, часу реакції, характеру розчинника і співрозчинника, якщо він присутній). Таким чином, контакт антитіла і інгібуючого рід засобу приводить до одержання суміші, яка містить декілька кон'югатів, що відрізняються один від одного різними відношеннями лікарського засобу до антитіла; необов'язково чистого антитіла; необов'язково агрегатів. Таким чином, визначуване DAR є середнім значенням.

Спосіб, який можна використовувати для визначення DAR, полягає в спектрофотометричному вимірюванні відношення оптичної густини розчину значною мірою очищеного кон'югата при λ_D і 280 нм. 280 нм являє собою довжину хвилі, як правило, використовувану для вимірювання концентрації білка, такої як концентрація антитіла. Довжина хвилі λ_D вибрана так, щоб забезпечити відмінність лікарського засобу від антитіла, тобто, як абсолютно зрозуміло фахівцю, λ_D являє собою довжину хвилі, при якій лікарський засіб має високу оптичну густину, і λ_D досить далека від 280 нм для уникнення суттєвого перекривання піків оптичної густини лікарського засобу й антитіла. У випадку молекул майтанзиноїдів, λ_D можна вибирати величиною 252 нм. Спосіб розрахунку DAR можна знайти в Antony S. Dimitrov (ed), LLC, 2009, Therapeutic Antibodies and Protocols, vol. 525, 445, Springer Science:

Оптичні густини кон'югата при λ_D (A_{λ_D}) і при 280 нм (A_{280}) вимірюють в аналізі мономерних піків при ексклюзійній хроматографії (SEC) (що дозволяє розрахувати параметр "DAR(SEC)") або з використанням класичного спектрофотометричного пристрою (що дозволяє розрахувати параметр "DAR(UV)"). Оптичні густини можна виразити наступним чином:

$$A_{\lambda_D} = (C_D \times \epsilon_{D\lambda_D}) + (C_A \times \epsilon_{A\lambda_D}),$$

$$A_{280} = (C_D \times \epsilon_{D280}) + (C_A \times \epsilon_{A280}),$$

де:

C_D і C_A відповідно являють собою концентрації лікарського засобу й антитіла в розчині,

$\epsilon_{D\lambda_D}$ і ϵ_{D280} відповідно являють собою молярні коефіцієнти екстинкції лікарського засобу при λ_D і 280 нм,

$\epsilon_{A\lambda_D}$ і ϵ_{A280} відповідно являють собою молярні коефіцієнти екстинкції антитіла при λ_D і 280 нм. Розв'язання цих двох рівнянь із двома невідомими приводить до наступних рівнянь:

$$C_D = [(\epsilon_{A280} \times A_{\lambda_D}) - (\epsilon_{A\lambda_D} \times A_{280})] / [(\epsilon_{D\lambda_D} \times \epsilon_{A280}) - (\epsilon_{A\lambda_D} \times \epsilon_{D280})],$$

$$C_A = [A_{280} - (C_D \times \epsilon_{D280})] / \epsilon_{A280}.$$

Потім на основі відношення концентрації лікарського засобу до концентрації антитіла розраховують середнє DAR: $DAR = C_D / C_A$.

Фармацевтичні композиції

Антитіла або імунокон'югати за винаходом для одержання терапевтичних композицій можна комбінувати з фармацевтично прийнятними ексципієнтами і необов'язково матриксами з тривалим вивільненням, такими як біорозкладані полімери.

Таким чином, інший об'єкт винаходу являє собою фармацевтичну композицію, яка містить антитіло або імунокон'югат за винаходом і фармацевтично прийнятний носій або ексципієнт.

Винахід також стосується поліпептиду або імунокон'югата за винаходом для застосування як лікарського засобу.

"Фармацевтично" або "фармацевтично прийнятний" стосується молекулярних структур і композицій, які не приводять до шкідливих, алергічних або інших несприятливих реакцій, коли їх, за необхідності, вводять ссавцю, особливо людині. Фармацевтично прийнятний носій або ексципієнт стосується нетоксичного твердого, напівтвердого або рідкого наповнювача, розріджувача, інкапсулюючої речовини або складу допоміжного засобу будь-якого типу.

Як використовують у даному описі, "фармацевтично прийнятні носії" включає будь-який і всі розчинники, диспергуючі середовища, покриття, антибактеріальні і протигрибкові засоби і т. п.,

які є фізіологічно сумісними. Приклади придатних носіїв, розріджувачів і/або ексципієнтів включають одне або декілька з води, амінокислот, фізіологічного розчину, забуференого фосфатом сольового буфера, фосфатного, ацетатного, цитратного, сукцинатного буферів; амінокислот і їх похідних, таких як гістидин, аргінін, гліцин, пролін, гліцилгліцин; неорганічних солей NaCl, хлориду кальцію; цукрів або поліспиртів, таких як декстроза, гліцерин, етанол, сахароза, трегалоза, маніт; поверхнево-активних речовин, таких як полісорбат 80, полісорбат 20, полоксамер 188 і т. п., а також їх комбінації. У багатьох випадках, у композицію переважно включати засоби надання ізотонічності, такі як цукри, поліспирти або хлорид натрію, а також склад може містити антиоксидант, такий як триптамін, і стабілізатор, такий як Tween-20.

Зрозуміло, що форма фармацевтичних композицій, шлях введення, дозування і схема лікування залежать від стану, що підлягає лікуванню, тяжкості захворювання, віку, маси і статі пацієнта і т. д.

Фармацевтичні композиції за винаходом можна формулювати для топічного, перорального, парентерального, інтраназального, внутрішньовенного, внутрішньом'язового, підшкірного або внутрішньоочного введення і т. п.

В одному з варіантів здійснення фармацевтичні композиції містять носії, які є фармацевтично прийнятними для ін'єктованого складу. Вони можуть являти собою ізотонічні, стерильні, сольові розчини (моно- або дифосфат натрію, хлорид натрію, калію, кальцію або магнію і т. п. або суміші таких солей солі) або сухі, особливо ліофілізовані композиції, що при додаванні, залежно від випадку, стерилізованої води або фізіологічного розчину забезпечують склад ін'єктованих розчинів.

Фармацевтичну композицію можна вводити за допомогою пристроїв для комбінування лікарських засобів.

Дози, використовувані для введення, можна встановлювати як функцію різних параметрів, наприклад як функцію застосовуваного способу введення, відповідної патології або, альтернативно, бажаної тривалості лікування.

Для одержання фармацевтичних композицій ефективну кількість антитіла або імунокон'югата за винаходом можна розчиняти або диспергувати у фармацевтично прийнятному носії або водному середовищі.

Фармацевтичні форми, придатні для застосування як ін'єкцій, включають стерильні водні розчини або дисперсії; склади, що містять кунжутну олію, арахісову олію або водний пропіленгліколь; і стерильні порошки для негайного приготування стерильних ін'єктованих розчинів або дисперсій. В усіх випадках, форма повинна бути стерильною і ін'єктованою за допомогою придатного пристрою або системи для доставки без руйнування. Вона повинна бути стабільна в умовах одержання і зберігання, і її необхідно захищати від забруднюючої дії мікроорганізмів, таких як бактерії і гриби.

Розчини активних сполук можна одержувати у вигляді вільних основ або фармакологічно прийнятних солей у воді, придатним чином змішуючи з поверхнево-активною речовиною. Також можна одержувати дисперсії в гліцерині, рідких поліетиленгліколях і їх сумішах і в оліях. У звичайних умовах зберігання і застосування ці препарати містять консервант для запобігання росту мікроорганізмів.

Поліпептид, антитіло або імунокон'югат за винаходом можна формулювати в композицію в нейтральній формі або у формі солі. Фармацевтично прийнятні солі включають кислотно-адитивні солі (формовані з вільними аміногрупами білка), що сформовані з неорганічними кислотами, такими як, наприклад, хлористоводнева або фосфорна кислота, або такими органічними кислотами як оцтова, щавлева, винна, мигдальна і т. п. Також можна одержувати солі, формовані вільними карбоксильними групами з неорганічними основами, наприклад, такими як гідроксиди натрію, калію, амонію, кальцію або заліза, і з такими органічними основами як ізопропіламін, триметиламін, гліцин, гістидин, прокаїн і т. п.

Носій також може являти собою розчинник або диспергуюче середовище, що містить, наприклад, воду, етанол, поліол (наприклад, гліцерин, пропіленгліколь і рідкий поліетиленгліколь, і т. п.), їх придатні суміші і рослинні олії. Придатну плинність можна підтримувати, наприклад, використовуючи такі покриття, як лецитин, підтримуючи необхідний розмір частинок, у випадку дисперсії, і використовуючи поверхнево-активні речовини. Запобігання дії мікроорганізмів можна здійснювати різними антибактеріальними і протигрибковими засобами, наприклад парабенами, хлорбутанолом, фенолом, сорбіновою кислотою, тимеросалом і т. п. У багатьох випадках переважно включати засоби надання ізотонічності, наприклад цукри або хлорид натрію. Пролонгування всмоктування ін'єктованих композицій можна здійснювати, використовуючи в композиціях засоби, що затримують всмоктування, наприклад моностеарат алюмінію і желатин.

Стерильні ін'єктовані розчини одержують за допомогою додавання необхідної кількості активної сполуки в придатний розчинник, за необхідності, з будь-яким з інших інгредієнтів, перерахованих вище, з наступною стерилізацією фільтруванням. Як правило, дисперсії одержують, додаючи різні стерилізовані активні інгредієнти в стерильний носій, що містить основне диспергуюче середовище й інші необхідні інгредієнти з перерахованих вище. У випадку стерильних порошків, для одержання стерильних ін'єктованих розчинів переважні способи одержання являють собою методи вакуумного сушіння і ліофілізації, якими одержують порошок активного інгредієнта і будь-якого бажаного додаткового інгредієнта з їх попередньо простерилізованого фільтруванням розчину.

Також передбачене одержання більш концентрованих або висококонцентрованих розчинів для прямої ін'єкції, де передбачене використання як розчинника ДМСО для забезпечення екстремально швидкого проникнення, доставки високих концентрацій активних засобів у малу область пухлини.

Після складання розчини вводять способом, що відповідає дозованому складу й у такій кількості, що є терапевтично ефективною. Склади легко водити в ряді лікарських форм, таких як тип ін'єктованих розчинів, описаний вище, а також можна використовувати вивільняючі лікарський засіб капсули і т. п.

Наприклад, для парентерального введення у водному розчині розчин, якщо необхідно, потрібно відповідним чином буферизувати і спочатку зробити рідкий розріджувач ізотонічним достатньою кількістю сольового розчину або глюкози. Ці водні розчини особливо придатні для внутрішньовенного, внутрішньом'язового, підшкірного і інтраперитонеального введення. У зв'язку з цим, з урахуванням даного опису, стерильні водні середовища, які можна використовувати, відомі фахівцям у даній галузі. Наприклад, одне дозування можна розводити в 1 мл ізотонічного розчину NaCl і доводити до 1000 мл рідиною для підшкірного введення або ін'єкувати у ділянку, призначену для інфузії (див. наприклад, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, pp. 1035-1038 and 1570-1580). Залежно від стану індивідуума, що піддається лікуванню, обов'язково проводять визначені зміни дозування. У будь-якому випадку, відповідну дозу для індивідуума визначає фахівець, відповідальний за введення.

Антитіло або імунокон'югат за винаходом можна формулювати в терапевтичній суміші так, щоб вона містила приблизно від 0,01 до 100 міліграмів на дозу або приблизно стільки.

На додаток до антитіла або імунокон'югата, формульованого для парентерального введення, такого як внутрішньовенна або внутрішньом'язова ін'єкція, інші фармацевтично прийнятні форми включають, наприклад, таблетки або інші тверді форми для перорального введення; капсули з уповільненим вивільненням і будь-яку іншу форму, використовувану на даний час.

У визначених варіантах здійснення для введення поліпептидів у клітини-хазяїни передбачене використання ліпосом і/або наночастинок. Одержання і використання ліпосом і/або наночастинок відоме фахівцям у даній галузі.

Як правило, нанокапсули можуть утримувати сполуки стабільним і відтворюваним способом. Щоб уникнути побічних ефектів унаслідок надлишку внутрішньоклітинних полімерів, такі ультрадисперсні частинки (з розміром приблизно 0,1 мкм), як правило, розробляють з використанням полімерів, здатних до руйнування *in vivo*. Для застосування за даним винаходом передбачені біорозкладані поліалкілціаноакрилатні наночастинок або біорозкладані наночастинок з полілактиду або зі співполімеру полілактиду і гліколіду, що задовольняють ці вимоги, і такі частинки можуть бути легко одержані.

Ліпосоми одержують з фосфоліпідів, що дисперговані у водному середовищі і спонтанно формують багаточарові концентричні двошарові везикули (також називані багаточаровими везикулами (MLV)). Як правило, діаметр MLV складає від 25 нм до 4 мкм. Обробка MLV ультразвуком приводить до формування малих одношарових везикул (SUV) з діаметром у діапазоні від 200 до 500 Å, що містять у серцевині водний розчин. Фізичні характеристики ліпосом залежать від pH, іонної сили і присутності двовалентних катіонів.

Терапевтичні способи і застосування

Автори винаходу продемонстрували, що п'ять антитіл, які вони одержали, здатні забезпечувати інтерналізацію комплексу CEACAM5-антитіло після зв'язування. Крім того, вони продемонстрували, що ці антитіла, комбіновані з цитотоксичним майтанзиноїдом (DM4), індують цитотоксичну активність відносно пухлинних клітин MKN45 людини *in vitro*. Також вони продемонстрували, що ці імунокон'югати на мишачій моделі одержаних у пацієнтів ксенотрансплантатів первинної пухлини товстого кишечника людини індують суттєву протипухлинну активність *in vivo* при використанні в дозі 5 мг/кг і 2,5 мг/кг з однією ін'єкцією на добу 14 після імплантації пухлини.

Таким чином, поліпептиди, антитіла, імунокон'югати або фармацевтичні композиції за винаходом можуть бути корисні для лікування злоякісних пухлин.

Злоякісна пухлина для лікування антитілами, імунокон'югатами або фармацевтичними композиціями за винаходом являє собою злоякісну пухлину, експресуючу CEACAM5, зокрема надекспресуючу CEACAM5 у порівнянні з нормальними (тобто непухлинними) клітинами того ж тканинного походження. Експресію CEACAM5 злоякісними клітинами можна легко оцінити, наприклад, з використанням антитіла за винаходом, як описано в наведеному нижче розділі "Діагностичні застосування", і, зокрема, імуногістохімічним способом, наприклад, як описано в прикладі 8.

В одному з варіантів здійснення злоякісна пухлина може являти собою колоректальний рак, рак шлунка, легень, шийки матки, підшлункової залози, стравоходу, яєчника, щитовидної залози, сечового міхура, ендометрія, молочної залози, печінки (наприклад, холангіокарциному), передміхурової залози або шкіри. Скринінг панелі пухлин людини за допомогою імуногістохімії з використанням антитіла миші до CEACAM5 людини за винаходом фактично продемонстрував забарвлення антитілами в цих типах злоякісних пухлин, як більш докладно описано прикладі 8.

Антитіла або імунокон'югати за винаходом можна використовувати окремо або в комбінації з будь-яким придатним інгібуючим ріст засобом.

Антитіла за винаходом можна кон'югувати або зв'язувати з інгібуючим ріст засобом, цитотоксичним засобом або з активуючим пролікарський засіб ферментом, як описано вище. Фактично, антитіла за винаходом можуть бути придатні для спрямування зазначених інгібуючого ріст засобу, цитотоксичного засобу або пролікарського засобу в злоякісні клітини, експресуючі або надекспресуючі на своїх поверхнях CEACAM5.

Також добре відомо, що терапевтичні моноклональні антитіла можуть приводити до виснаження клітин, що несуть антиген, специфічно розпізнаваний антитілом. Це виснаження можуть опосередковувати щонайменше три механізми: опосередковувана антитілами клітинна цитотоксичність (ADCC), залежний від комплементу лізис і пряме протипухлинне інгібування росту пухлини внаслідок сигналів, що подаються антигеном, до якого спрямоване антитіло.

"Обумовлена комплементом цитотоксичність", або "CDC", стосується лізису клітини-мішені в присутності комплементу. При зв'язуванні першого компонента системи комплементу з антитілами, що зв'язані з упізнаванням ними антигеном, відбувається ініціація активації класичного шляху комплементу. Для оцінки активації комплементу можна проводити аналіз CDC, наприклад, як описано в Gazzano-Santoro et al. (1997).

"Антитілозалежна клітинна цитотоксичність", або "ADCC", стосується форми цитотоксичності, при якій секретовані антитіла зв'язуються з рецепторами Fc (FcR), представленими на визначених цитотоксичних клітинах (наприклад, на клітинах природних кілерів (NK), нейтрофілах і макрофагах), забезпечуючи специфічне зв'язування цих цитотоксичних ефекторних клітин з клітинами-мішенями, що несуть антиген, і потім знищення клітин-мішеней. Для оцінки активності ADCC молекули, що представляє інтерес, можна проводити аналіз ADCC in vitro, такий як аналіз, описаний у патентах США №№ 5821337 або 5821337.

Таким чином, об'єктом винаходу є спосіб лікування злоякісної пухлини, який включає введення потребуючому цього індивідууму терапевтично ефективної кількості поліпептиду, антитіла, імунокон'югата або фармацевтичної композиції за винаходом.

У контексті винаходу, як використовують у даному описі, термін "лікування" означає обернення, зменшення, інгібування прогресування або запобігання порушенню або патологічному стану, відносно якого застосовують такий термін, або одному або декільком симптомам такого порушення або стану. Як використовують у даному описі, під терміном "лікування злоякісної пухлини" мають на увазі інгібування росту злоякісних клітин пухлини і/або прогресування метастазів зазначеної пухлини. Також таке лікування може приводити до обернення росту пухлини, тобто зменшення розміру вимірюваної пухлини. Зокрема, таке лікування приводить до повного регресу пухлини або метастазів.

У контексті винаходу термін "пацієнт" або "потребуючий цього пацієнт" призначений для позначення людини або ссавця, що не є людиною, ураженого або ймовірно ураженого злоякісною пухлиною. Зокрема, зазначений пацієнт може являти собою пацієнта, якого визначили як сприйнятливий до терапевтичного засобу, націленого на CEACAM5, зокрема до антитіла або імунокон'югата за винаходом, наприклад, способом, як описано нижче в даному документі.

Під "терапевтично ефективною кількістю" поліпептиду за винаходом мають на увазі достатню кількість поліпептиду для лікування зазначеного злоякісного захворювання, з прийнятним співвідношенням користь/ризик, придатним для будь-якого медичного лікування.

Однак варто розуміти, що загальне добове використання поліпептидів і композицій за даним винаходом знаходиться на розсуді лікуючого лікаря в обсязі озвученого лікарського рішення. Конкретний рівень терапевтично ефективної дози для будь-якого конкретного пацієнта залежить від ряду факторів, включаючи порушення, що підлягає лікуванню, і тяжкість цього порушення; активність конкретного застосовуваного поліпептиду; конкретну застосовувану композицію, вік, масу тіла, загальний стан здоров'я, стать і дієту пацієнта; час введення, шлях введення і швидкість виведення конкретного застосовуваного поліпептиду; тривалість лікування; використовувані в комбінації або одночасно з конкретним застосовуваним поліпептидом лікарські засоби і подібні фактори, добре відомі в галузі медицини. Наприклад, фахівцям у даній галузі добре відомо про початок дозування сполук на рівнях, менших ніж рівні, необхідні для досягнення бажаного терапевтичного ефекту, і поступового збільшення дози до досягнення бажаного ефекту.

Іншим об'єктом винаходу є поліпептид, антитіло, імунокон'югат або фармацевтична композиція за винаходом для застосування при лікуванні злоякісної пухлини.

Поліпептид, антитіло, імунокон'югат або фармацевтичну композицію можна використовувати для інгібування прогресування метастазів злоякісної пухлини.

Поліпептиди за винаходом можна використовувати в комбінації з будь-якою іншою терапевтичною стратегією для лікування злоякісних пухлин (наприклад, допоміжна терапія) і/або для уповільнення росту метастатичної пухлини.

Ефективність лікування антитілом або імунокон'югатом за винаходом можна легко оцінювати *in vivo*, наприклад, на мишачій моделі злоякісної пухлини, і вимірюючи, наприклад, зміни об'ємів пухлин у груп, що піддаються обробці, і контрольних груп, % регресу пухлини, частковий регрес і/або повний регрес, як визначено в прикладі 5.3.

Діагностичні застосування

Опубліковано, що CEACAM5 високо експресований на поверхні клітин колоректальних пухлин, клітин пухлин шлунка, легень, матки і слабо експресований у невеликій кількості нормальних епітеліальних клітин, таких як епітеліальні клітини товстого кишечника і стравоходу. Крім того, скринінг панелі пухлин людини за допомогою імуногістохімії з використанням антитіла миші до CEACAM5 людини за винаходом продемонстрував забарвлення антитілами колоректального раку, раку шлунка, легень, шийки матки, підшлункової залози, стравоходу, яєчника, щитовидної залози, сечового міхура, ендометрія, молочної залози, печінки (зокрема холангіокарцинома), передміхурової залози і шкіри.

Таким чином, CEACAM5 являє собою маркер злоякісних пухлин і, таким чином, має потенціал до використання для указання ефективності протиракової терапії або детекції рецидиву захворювання.

В одному з варіантів здійснення антитіло за винаходом використовують як компонент аналізу в рамках терапії, спрямованої на експресуючі CEACAM5 пухлини, для визначення сприйнятливості пацієнта до терапевтичного засобу, контролю ефективності протиракової терапії або детекції рецидиву захворювання після лікування. Зокрема, одне і те ж антитіло за винаходом використовують як у вигляді компонента терапевтичного засобу, так і у вигляді компонента діагностичного аналізу.

Таким чином, додатковим об'єктом винаходу є антитіло за винаходом для застосування при детекції експресії CEACAM5 у індивідуума або для застосування при детекції експресії CEACAM5 *ex vivo* у біологічному зразку, одержаному у індивідуума. Зокрема, зазначена детекція може бути призначена для

а) діагностики наявності у індивідуума злоякісної пухлини, або
б) визначення сприйнятливості пацієнта зі злоякісною пухлиною до терапевтичного засобу, націленого на CEACAM5, зокрема імунокон'югата за винаходом, або

с) контролю ефективності терапії злоякісної пухлини, що несе CEACAM5, або детекції рецидиву злоякісної пухлини після терапії злоякісної пухлини, що несе CEACAM5, зокрема для терапії імунокон'югатом за винаходом;

за допомогою детекції експресії поверхневого білка CEACAM5 на пухлинних клітинах.

В одному з варіантів здійснення антитіло призначене для застосування *in vitro* або *ex vivo*. Наприклад, CEACAM5 можна детектувати з використанням антитіла за винаходом *in vitro* або *ex vivo* у біологічному зразку, одержаному у індивідуума. Застосування за винаходом також може являти собою застосування *in vivo*. Наприклад, антитіло за винаходом вводять індивідууму і детектують і/або кількісно визначають комплекси антитіло-клітини, при цьому детекція зазначених комплексів є показником злоякісної пухлини.

Крім того винахід стосується способу детекції присутності злоякісної пухлини у індивідуума *in vitro* або *ex vivo*, який включає стадії:

(а) приведення біологічного зразка, одержаного у індивідуума, у контакт з антитілом за винаходом, зокрема в умовах, придатних для формування комплексів антитіла з зазначеним біологічним зразком;

(b) вимірювання рівня антитіл, зв'язаних із зазначеним біологічним зразком;

5 (с) детекції присутності злоякісної пухлини за допомогою порівняння виміряного рівня зв'язаного антитіла з контролем, де підвищений рівень зв'язаного антитіла в порівнянні з контролем свідчить про злоякісну пухлину.

10 Винахід також стосується способу визначення сприйнятливості пацієнта зі злоякісною пухлиною до терапевтичного засобу, націленого на CEACAM5, зокрема до імунокон'югата за винаходом, *in vitro* або *ex vivo*, де спосіб включає стадії:

(а) приведення біологічного зразка, одержаного у пацієнта зі злоякісною пухлиною, у контакт з антитілом за винаходом, зокрема в умовах, придатних для формування комплексів антитіла з зазначеним біологічним зразком;

(b) вимірювання рівня антитіла, зв'язаного з зазначеним біологічним зразком;

15 (с) порівняння виміряного рівня антитіла, зв'язаного з зазначеним біологічним зразком, з рівнем антитіла, зв'язаним з контролем;

де підвищений рівень антитіла, зв'язаного з зазначеним біологічним зразком, у порівнянні з контролем є показником сприйнятливості пацієнта до терапевтичного засобу, націленого на CEACAM5.

20 У зазначених вище способах зазначений контроль може являти собою нормальний, незлоякісний біологічний зразок того ж типу або контрольне значення визначають як характерний рівень зв'язаного антитіла в нормальному біологічному зразку того ж типу.

25 В одному з варіантів здійснення антитіла за винаходом придатні для діагностики злоякісної пухлини, експресуючої CEACAM5, такої як колоректальний рак, рак шлунка, легень, шийки матки, підшлункової залози, стравоходу, яєчника, щитовидної залози, сечового міхура, ендометрія, молочної залози, печінки (зокрема, холангіокарцинома), передміхурової залози або шкіри.

Крім того винахід стосується способу контролю ефективності терапії злоякісної пухлини, що несе CEACAM5, *in vitro* або *ex vivo*, який включає стадії:

30 (а) приведення біологічного зразка індивідуума, який проходить терапію злоякісної пухлини, що несе CEACAM5, у контакт з антитілом за винаходом, зокрема, в умовах, придатних для формування комплексів антитіла з зазначеним біологічним зразком;

(b) вимірювання рівня антитіла, зв'язаного з зазначеним біологічним зразком;

35 (с) порівняння виміряного рівня зв'язаного антитіла з рівнем антитіла, зв'язаного з контролем;

де знижений рівень антитіла, зв'язаного з зазначеним біологічним зразком, у порівнянні з контролем є показником ефективності зазначеної терапії злоякісної пухлини, що несе CEACAM5.

40 У зазначеному способі підвищений рівень антитіла, зв'язаного з зазначеним біологічним зразком, у порівнянні з контролем є показником неефективності зазначеної терапії злоякісної пухлини, що несе CEACAM5.

В одному з варіантів здійснення зазначений контроль являє собою біологічний зразок того ж типу, що і біологічний зразок, який піддається аналізу, але який одержували у індивідуума раніше, у ході терапії злоякісної пухлини, що несе CEACAM5.

45 Крім того винахід стосується способу детекції рецидиву злоякісної пухлини після терапії злоякісної пухлини, що несе CEACAM5, *in vitro* або *ex vivo*, який включає стадії:

(а) приведення біологічного зразка, одержаного у індивідуума, який пройшов терапію злоякісної пухлини, що несе CEACAM5, у контакт з антитілом за винаходом, зокрема, в умовах, придатних для формування комплексів антитіла з зазначеним біологічним зразком;

50 (b) вимірювання рівня антитіла, зв'язаного з зазначеним біологічним зразком;

(с) порівняння виміряного рівня зв'язаного антитіла з рівнем антитіла, зв'язаного з контролем;

55 де підвищений рівень антитіла, зв'язаного з зазначеним біологічним зразком, у порівнянні з контролем є показником рецидиву злоякісної пухлини після терапії злоякісної пухлини, що несе CEACAM5.

Зокрема, зазначений контроль являє собою біологічний зразок того ж типу, що і біологічний зразок, який піддається аналізу, але який одержували у індивідуума раніше, при проходженні або після завершення терапії злоякісної пухлини, що несе CEACAM5.

60 Зокрема, зазначена терапія злоякісної пухлини, що несе CEACAM5, являє собою терапію з використанням антитіла або імунокон'югата за винаходом. Зазначена терапія злоякісної

пухлини, що несе SEACAM5, спрямована на злоякісну пухлину, експресуючу SEACAM5, зокрема колоректальний рак, рак шлунка, легень, шийки матки, підшлункової залози, стравоходу, яєчника, щитовидної залози, сечового міхура, ендометрія, молочної залози, печінки (зокрема, холангіокарциному), передміхурової залози або шкіри.

5 В одному з варіантів здійснення антитіла за винаходом можна мітити детектованою молекулою або речовиною, такою як флуоресцентна молекула, радіоактивна молекула або будь-яка інша з міток, відомих тим, що вони забезпечують (безпосередньо або опосередковано) сигнал.

10 Як використовують у даному описі, термін "мічений", відносно антитіла за винаходом, призначений для включення антитіл, мічених безпосередньо за допомогою зв'язування (тобто фізичного зв'язування) детектованої речовини, такої як радіоактивний засіб або флуорофор (наприклад, флуоресцеїнізотіоціанат (FITC) або фікоеритрин (PE), або індоціанін (Cy5)) з поліпептидом, а також опосередкованого мічення поліпептиду шляхом взаємодії з детектованою речовиною.

15 Антитіло за винаходом можна мітити радіоактивною молекулою будь-яким відомим в даній галузі способом. Наприклад, радіоактивні молекули містять, але не обмежуючись ними, радіоактивні атоми для сцинтиграфічних досліджень, такі як I^{123} , I^{124} , In^{111} , Re^{186} , Re^{188} , Tc^{99} . Також поліпептиди за винаходом можна мітити спіновою міткою для томографії за допомогою ядерного магнітного резонансу (ЯМР) (також відомої як магнітно-резонансна томографія, МРТ), такою як йод-123, індій-111, фтор-19, вуглець-13, азот-15, кисень-17, гадоліній, марганець або залізо.

20 "Біологічний зразок" включає ряд видів зразків, одержаних у індивідуума, і їх можна використовувати в діагностичному або контролюючому аналізах. Біологічні зразки включають, але не обмежуючись ними, кров і інші рідкі зразки біологічного походження, тверді зразки тканин, такі як зразок біопсії або тканинної культури, або клітини, одержувані з нього і їх потомства. Таким чином, біологічні зразки включають клінічні зразки, клітини в культурі, супернатанти клітин, лізати клітин, сироватку, плазму, біологічну рідину і зразки тканин, зокрема зразки пухлин.

30 В одному з варіантів здійснення біологічний зразок може являти собою зразок тканини, фіксований у формаліні і занурений у парафін (FFPE). Фактично, антитіла за винаходом переважно можна використовувати для FFPE-тканин, що є форматом, використовуваним у більшості лікарень для збирання й архівування зразків тканин.

Винахід також стосується способу детекції присутності злоякісної пухлини у індивідуума *in vivo*, який включає стадії:

- 35 а) введення пацієнту антитіла за винаходом, міченого детектованою міткою;
б) детекції локалізації зазначеного міченого детектованою міткою антитіла у пацієнта за допомогою томографії.

40 Антитіла за винаходом можуть бути придатні для визначення стадії злоякісної пухлини (наприклад, радіотомографії). Їх можна використовувати окремо або в комбінації з іншими маркерами злоякісних пухлин.

Як використовують у даному описі, терміни "детекція" або "детектований" включають якісну і/або кількісну детекцію (вимірювання рівнів) з порівнянням або без порівняння з контролем.

45 У контексті винаходу, як використовують у даному описі, термін "діагностика" означає визначення характеру медичного стану, спрямоване на ідентифікацію патології, що уражує індивідуума, на основі обсягу зібраних даних.

У зазначеному способі злоякісна пухлина являє собою злоякісну пухлину, експресуючу SEACAM5, зокрема колоректальний рак, рак шлунка, легень, шийки матки, підшлункової залози, стравоходу, яєчника, щитовидної залози, сечового міхура, ендометрія, молочної залози, печінки (зокрема, холангіокарциному), передміхурової залози або шкіри.

50 **Набори**

Нарешті, винахід також стосується наборів, що містять щонайменше одне антитіло або один імунокон'югат за винаходом. Набори, що містять антитіла за винаходом, знаходять застосування в детекції поверхневого білка SEACAM5 або в терапевтичних або діагностичних аналізах. Набори за винаходом можуть містити поліпептид або антитіло, зв'язані з твердою підкладкою, наприклад планшетом для культивування тканин або гранулами (наприклад, сефарозними гранулами). Можна надавати набори, що містять антитіла для детекції і кількісного визначення поверхневого білка SEACAM5 *in vitro*, наприклад, у ELISA або вестерн-блотингу. Таке антитіло, придатне для детекції, можна надавати з міткою, такою як флуоресцентна або радіоактивна мітка.

60 **Короткий опис послідовностей**

SEQ ID NO:1-4 і 6 демонструють послідовності CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H, CDR1-L і CDR3-L з так названого антитіла "MAb1".

SEQ ID NO:5 демонструє варіант послідовності VH, VH1a, гуманізованого антитіла MAb2.

5 SEQ ID NO:7-10 і 12 демонструють послідовності CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H, CDR1-L і CDR3-L з так названого антитіла "MAb2".

SEQ ID NO:11 демонструє послідовність CEACAM1 людини, як доступно в GenBank NP_001703.2.

SEQ ID NO:13-16 і 18 демонструють послідовності CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H, CDR1-L і CDR3-L з так названого антитіла "MAb3".

10 SEQ ID NO:17 демонструє варіант послідовності VL, VL1, гуманізованого антитіла MAb2.

SEQ ID NO:19-22 і 24 демонструють послідовності CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H, CDR1-L і CDR3-L з так названого антитіла "MAb4".

SEQ ID NO:23 демонструє варіант послідовності VL, VL1a, гуманізованого антитіла MAb2.

15 SEQ ID NO:25-28 і 30 демонструють послідовності CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H, CDR1-L і CDR3-L з так названого антитіла "MAb5".

SEQ ID NO:29 демонструє варіант послідовності VL, VL1c, гуманізованого антитіла MAb2.

SEQ ID NO:31 демонструє послідовність VH антитіла "MAb1".

SEQ ID NO:32 демонструє послідовність VL антитіла "MAb1".

SEQ ID NO:33 демонструє послідовність VH антитіла "MAb2".

20 SEQ ID NO:34 демонструє послідовність VL антитіла "MAb2".

SEQ ID NO:35 демонструє послідовність VH антитіла "MAb3".

SEQ ID NO:36 демонструє послідовність VL антитіла "MAb3".

SEQ ID NO:37 демонструє послідовність VH антитіла "MAb4".

SEQ ID NO:38 демонструє послідовність VL антитіла "MAb4".

25 SEQ ID NO:39 демонструє послідовність VH антитіла "MAb5".

SEQ ID NO:40 демонструє послідовність VL антитіла "MAb5".

SEQ ID NO:41 демонструє послідовність важкого ланцюга антитіла chMAb1.

SEQ ID NO:42 демонструє послідовність легкого ланцюга антитіла chMAb1.

SEQ ID NO:43 демонструє послідовність важкого ланцюга антитіла chMAb2.

30 SEQ ID NO:44 демонструє послідовність легкого ланцюга антитіла chMAb2.

SEQ ID NO:45 демонструє послідовність важкого ланцюга антитіла chMAb3.

SEQ ID NO:46 демонструє послідовність легкого ланцюга антитіла chMAb3.

SEQ ID NO:47 демонструє послідовність важкого ланцюга антитіла chMAb4.

SEQ ID NO:48 демонструє послідовність легкого ланцюга антитіла chMAb4.

35 SEQ ID NO:49 демонструє послідовність важкого ланцюга антитіла chMAb5.

SEQ ID NO:50 демонструє послідовність легкого ланцюга антитіла chMAb5.

SEQ ID NO:51 демонструє варіант послідовності VH, VH1, гуманізованого антитіла MAb2.

SEQ ID NO:52 демонструє послідовність повнорозмірного CEACAM5 людини, як доступно в базі даних GenBank під номером доступу AAA51967.1.

40 SEQ ID NO:53 демонструє послідовність позаклітинного домену CEACAM5 *Mascas fascicularis*.

SEQ ID NO:54 демонструє послідовність легкого ланцюга химерного антитіла (одержаного з антитіла "MAb2"), що містить мутацію з K52 у R52.

SEQ ID NO:55 демонструє варіант послідовності VL, VL1d, гуманізованого антитіла MAb2.

45 SEQ ID NO:56 демонструє послідовність позаклітинного домену hCEACAM1 (положення 35-428 повнорозмірного hCEACAM1 (NP_001703.2) з наступною додатковою ділянкою з 24 амінокислот, що містить His-мітку).

SEQ ID NO:57 демонструє послідовність позаклітинного домену cCEACAM1 з наступною додатковою ділянкою з 24 амінокислот, що містить His-мітку.

50 SEQ ID NO:58 демонструє послідовність позаклітинного домену hCEACAM5 (положення 35-685 повнорозмірного hCEACAM5 (AAA51967.1) з наступною додатковою ділянкою з 24 амінокислот, що містить His-мітку).

SEQ ID NO:59 демонструє послідовність позаклітинного домену cCEACAM5 з наступною додатковою ділянкою з 24 амінокислот, що містить His-мітку.

55 SEQ ID NO:60 демонструє послідовність позаклітинного домену hCEACAM6 (положення 35-327 повнорозмірного hCEACAM6 (NP_002474.3) з наступною додатковою ділянкою з 24 амінокислот, що містить His-мітку).

SEQ ID NO:61 демонструє послідовність позаклітинного домену cCEACAM6 з наступною додатковою ділянкою з 24 амінокислот, що містить His-мітку.

SEQ ID NO:62 демонструє послідовність позаклітинного домену hCEACAM8 (положення 35-332 повнорозмірного hCEACAM8 (NP_001807.2) з наступною додатковою ділянкою з 24 амінокислот, що містить His-мітку).

5 SEQ ID NO:63 демонструє послідовність позаклітинного домену cCEACAM8 з наступною додатковою ділянкою з 24 амінокислот, що містить His-мітку.

SEQ ID NO:64 демонструє послідовність позаклітинного домену hCEACAM7 (положення 36-248 повнорозмірного hCEACAM7 (NP_008821.1) з наступною додатковою ділянкою з 24 амінокислот, що містить His-мітку).

10 SEQ ID NO:65 демонструє послідовність N-A1-B1 hCEACAM5 (положення 35-320 повнорозмірного hCEACAM5 (AAA51967.1.)) з наступною His-міткою з 6 амінокислот.

SEQ ID NO:66 демонструє послідовність A2-B2 hCEACAM5 (положення 321-498 повнорозмірного hCEACAM5 (AAA51967.1.)) з наступною His-міткою з 6 амінокислот.

SEQ ID NO:67 демонструє послідовність A3-B3 hCEACAM5 (положення 499-685 повнорозмірного hCEACAM5 (AAA51967.1.)) з наступною His-міткою з 6 амінокислот.

15 SEQ ID NO:68 демонструє послідовність N-A1-B1 cCEACAM5 з наступною додатковою ділянкою з 24 амінокислот, що містить His-мітку.

SEQ ID NO:69 демонструє послідовність A2-B2 cCEACAM5 з наступною додатковою ділянкою з 24 амінокислот, що містить His-мітку.

20 SEQ ID NO:70 демонструє послідовність A3-B3 cCEACAM5 з наступною додатковою ділянкою з 24 амінокислот, що містить His-мітку.

SEQ ID NO:71 демонструє послідовність повнорозмірного білка CEACAM6 людини, як доступно в GenBank NP_002474.3.

SEQ ID NO:72 демонструє послідовність повнорозмірного білка CEACAM7 людини, як доступно в GenBank NP_008821.1.

25 SEQ ID NO:73 демонструє послідовність повнорозмірного білка CEACAM8 людини як доступно в GenBank NP_001807.2.

SEQ ID NO:74 демонструє послідовність VH варіанта гуманізованого MAb2_VLg5VHg2.

SEQ ID NO:75 демонструє послідовність VL варіанта гуманізованого MAb2_VLg5VHg2.

30 SEQ ID NO:76 демонструє послідовність амінокислот у положеннях 109-115 A3-B3 CEACAM5 людини.

SEQ ID NO:77 демонструє послідовність амінокислот у положеннях 131-143 A3-B3 CEACAM5 людини.

SEQ ID NO:78 демонструє консенсусну послідовність CDR1-H сімейства антитіл MAb2/Mab4/Mab5 на основі порівнянь послідовностей.

35 SEQ ID NO:79 демонструє консенсусну послідовність CDR2-H сімейства антитіл MAb2/Mab4/Mab5 на основі порівнянь послідовностей.

SEQ ID NO:80 демонструє консенсусну послідовність CDR3-H сімейства антитіл MAb2/Mab4/Mab5 на основі порівнянь послідовностей.

40 SEQ ID NO:81 демонструє консенсусну послідовність CDR1-H сімейства антитіл MAb1/Mab3.

SEQ ID NO:82 демонструє консенсусну послідовність CDR2-H сімейства антитіл MAb1/Mab3.

45 SEQ ID NO:83 демонструє консенсусну послідовність CDR1-H сімейства антитіл MAb2/Mab4/Mab5 на основі залишків, ідентифікованих як нейтральні при зв'язуванні позаклітинних доменів CEACAM5 людини і *Macaca fascicularis*.

SEQ ID NO:84 демонструє консенсусну послідовність CDR3-H сімейства антитіл MAb2/Mab4/Mab5 на основі залишків, ідентифікованих як нейтральні при зв'язуванні позаклітинних доменів CEACAM5 людини і *Macaca fascicularis*.

50 SEQ ID NO:85 демонструє консенсусну послідовність CDR1-L сімейства антитіл MAb2/Mab4/Mab5 на основі залишків, ідентифікованих як нейтральні при зв'язуванні позаклітинних доменів CEACAM5 людини і *Macaca fascicularis*.

SEQ ID NO:86 демонструє консенсусну послідовність CDR3-L сімейства антитіл MAb2/Mab4/Mab5 на основі залишків, ідентифікованих як нейтральні при зв'язуванні позаклітинних доменів CEACAM5 людини і *Macaca fascicularis*.

55 SEQ ID NO:87 демонструє послідовність важкого ланцюга huMAb2-3 (MAb2_VL1cVH1a-IgG1).

SEQ ID NO:88 демонструє послідовність легкого ланцюга huMAb2-3 (MAb2_VL1cVH1a-IgG1).

SEQ ID NO:89 демонструє послідовність важкого ланцюга huMAb2-4 (MAb2_VL1dVH1-IgG1).

SEQ ID NO:90 демонструє послідовність легкого ланцюга huMAb2-4 (MAb2_VL1dVH1-IgG1).

60 Опис креслень

Фіг. 1. Оцінка селективності антитіл до CEACAM5.

Фіг. 2. Картування доменів антитіл до CEACAM5 на CEACAM5 людини.

Фіг. 3. Картування доменів антитіл до CEACAM5 на CEACAM5 яванського макака.

5 Фіг. 4. Оцінка протипухлинної активності кон'югатів chMAb4-SPDB-DM4, chMAb1-SPDB-DM4, chMAb5-SPDB-DM4 і chMAb2-SPDB-DM4 проти первинної аденокарциноми товстої кишки людини CR-IGR-034P у самок мишей SCID.

Фіг. 5. Оцінка протипухлинної активності кон'югатів huMAb2-3-SPDB-DM4, huMAb2-4-SPDB-DM4 і chMAb2-SPDB-DM4 проти первинної аденокарциноми товстої кишки людини CR-IGR-034P у самок мишей SCID.

10 Фіг. 6. Оцінка протипухлинної активності кон'югата huMAb2-3-SPDB-DM4 проти первинної аденокарциноми шлунка людини STO-IND-006 у самок мишей SCID.

Фіг. 7. Вирівнювання послідовностей областей VH і VL антитіл MAb1, MAb2, MAb3, MAb4 і MAb5.

Фіг. 8. Аналіз HRMS кон'югата chMAb1-SPDB-DM4.

15 Фіг. 9. Аналіз HRMS кон'югата chMAb2-SPDB-DM4.

Фіг. 10. Аналіз HRMS кон'югата chMAb4-SPDB-DM4.

Фіг. 11. Аналіз HRMS кон'югата chMAb5-SPDB-DM4.

Фіг. 12. Аналіз HRMS кон'югата huMAb2-2-SPDB-DM4.

Фіг. 13. Аналіз HRMS кон'югата huMAb2-1-SPDB-DM4.

20 Фіг. 14. Аналіз HRMS кон'югата huMAb2-3-SPDB-DM4.

Фіг. 15. Аналіз HRMS кон'югата huMAb2-4-SPDB-DM4.

Фіг. 16. Активність зв'язування гуманізованих варіантів MAb2 з позаклітинним доменом CEACAM5 людини і мавпи.

25 Фіг. 17. Стабільність зв'язування гуманізованих варіантів MAb2 з позаклітинним доменом CEACAM5 людини і мавпи.

Фіг. 18. Оцінка протипухлинної активності кон'югата huMAb2-3-SPDB-DM4 проти первинної аденокарциноми легень людини LUN-NIC-0014 у самок мишей SCID.

30 Фіг. 19. Оцінка протипухлинної активності кон'югатів huMAb2-3-SPDB-DM4 і huMAb2-3-сульфо-SPDB-DM4 проти первинної аденокарциноми товстої кишки людини CR-IGR-034P у самок голих мишей CD1.

Фіг. 20. Аналіз HRMS huMAb2-3-сульфо-SPDB-DM4.

Фіг. 21. Аналіз HRMS huMAb2-3-SMCC-DM1.

Фіг. 22. Вирівнювання варіабельних доменів важкого ланцюга MAb2, MAb4, MAb5, гуманізованого VH1a, гуманізованого VH1 і гуманізованого VHg2.

35 Фіг. 23. Вирівнювання варіабельних доменів легкого ланцюга MAb2, MAb4, MAb5, гуманізованого VL1, гуманізованого VL1a, гуманізованого VL1c, гуманізованого VL1d і гуманізованого VLg5.

ПРИКЛАДИ

40 Даний винахід далі проілюстрований прикладами, що наводяться нижче, які не слід витлумачувати як додаткове обмеження.

Зміст списку послідовностей, фігур і всіх посилань, патентів і опублікованих патентних заявок, цитованих на всьому протязі даного опису, у явній формі повністю включений в даний опис за допомогою посилання.

Приклад 1. Одержання рекомбінантних позаклітинних доменів білків CEACAM

45 У цьому прикладі за допомогою транзитornoї експресії в клітинах ембріональної нирки людини HEK293 з використанням плазмід, що забезпечують експресію відповідних кДНК, як наведено в таблиці 1, одержували позаклітинні домени білка (ECD), одержані з CEACAM людини (h) або яванського макака (c).

50 Кожну експресуючу плазмиду поміщали в комплекс з 293fectin™ (Life Technologies) і додавали в культивовані в суспензії клітини 293-F (одержані з клітин HEK293). Через вісім діб після трансфекції супернатанти культур збирали, і відповідний розчинний білок очищали за допомогою IMAC (GE Healthcare) з одержанням партії білка (див. таблицю 1).

Таблиця 1

Опис рекомбінантних позаклітинних доменів білків CEACAM

Назва білка	Опис білка	Вихідна послідовність кДНК	Ідентифікатор послідовності
hCEACAM1	ECD CEACAM1 людини (35-428)	NP_001703.2	SEQ ID NO:56
cCEACAM1	ECD CEACAM1 <i>M.fascicularis</i> (35-428)	клонований для внутрішніх цілей	SEQ ID NO:57
hCEACAM5	ECD CEACAM5 людини (35-685)	AAA51967.1	SEQ ID NO:58
cCEACAM5	ECD CEACAM5 <i>M.fascicularis</i> (35-688)	клонований для внутрішніх цілей	SEQ ID NO:59
hCEACAM6	ECD CEACAM6 людини (35-327)	NP_002474.3	SEQ ID NO:60
cCEACAM6	ECD CEACAM6 <i>M.fascicularis</i> (35-327)	клонований для внутрішніх цілей	SEQ ID NO:61
hCEACAM8	ECD CEACAM8 людини (35-332)	NP_001807.2	SEQ ID NO:62
cCEACAM8	ECD CEACAM8 <i>M.fascicularis</i> (35-332)	клонований для внутрішніх цілей	SEQ ID NO:63
hCEACAM7	ECD CEACAM7 людини (36-248)	NP_008821.1	SEQ ID NO:64
hCEACAM5 NA1B1	Домен N-A1-B1 CEACAM5 людини (35-320)	AAA51967.1	SEQ ID NO:65
hCEACAM5 A2B2	Домен A2-B2 CEACAM5 людини (321-498)	AAA51967.1	SEQ ID NO:66
hCEACAM5 A3B3	Домен A3-B3 CEACAM5 людини (499-685)	AAA51967.1	SEQ ID NO:67
cCEACAM5 NA1B1	Домен N-A1-B1 CEACAM5 <i>M.fascicularis</i> (35-320)	клонований для внутрішніх цілей	SEQ ID NO:68
cCEACAM5 A2B2	Домен A2-B2 CEACAM5 <i>M.fascicularis</i> (321-498)	клонований для внутрішніх цілей	SEQ ID NO:69
cCEACAM5 A3B3	Домен A3-B3 CEACAM5 <i>M.fascicularis</i> (499-688)	клонований для внутрішніх цілей	SEQ ID NO:70

Приклад 2. Одержання моноклональних антитіл миші до CEACAM5

У цьому прикладі одержували моноклональні антитіла після імунізації мишей по протоколу, що приводить до одержання mAb до CEACAM5.

Приклад 2.1. Імунізація й одержання гібридом

Імунізацію, злиття і скринінг проводили з використанням мієломних клітин P3X63-Ag8.653 з позаклітинним доменом CEACAM5 людини, позаклітинним доменом CEACAM5 яванського макака або з пухлинними клітинами UMC11 людини, як описано в Wennerberg A.E. et al. 1993. *Am. J. Pathol.*, 143(4), 1050-1054; і Kilpatrick et al. 1997. *Hybridoma* 16:381389.

З використанням способу RIMMS, як описано в Kilpatrick et al. (1997, *Hybridoma*, 16:381389), у кожної самки мишей BALB/c у віці 6-8 тижнів (S082342; Charles. River. Labs., Bar Harbor, ME) проводили чотири цикли імунізації протягом 14 діб з інтервалами 3-4 доби. Антигени, емульговані в ад'юванті Titermax (TierMax Gold Adjuvant; Sigma #T2684), підшкірно вводили в шість ділянок, проксимально дренуючих лімфовузлів, вздовж спини миші й у шість розташованих поруч ділянок вздовж черевця. Через чотири доби після останньої ін'єкції мишей умертвляли. Асептично виділяли двосторонні підколінні, поверхневі пахові, пахові і бронхіальні лімфовузли і промивали свіжим середовищем RPMI.

З використанням класичного способу, як описано в Wennerberg A.E. et al. (1993, *Am. J. Pathol.*, 143(4), 1050-1054), кожній самці мишей BALB/c у віці 6-8 тижнів (S082342; Charles. River. Labs., Bar Harbor, ME) проводили три цикли імунізації протягом 41 доби. Антигени вводили інтраперитонеально в черевну ділянку миші. Через три доби після останньої ін'єкції мишей умертвляли й асептично виділяли селезінку і промивали свіжим середовищем RPMI.

З лімфовузлів або із селезінки виділяли лімфоцити і суспензію одиночних клітин двічі відмивали середовищем RPMI з наступним злиттям з мієломними клітинами P3X63-AG8.653 з використанням поліетиленгліколю. Після злиття, суміш клітин інкубували в інкубаторі при 37 °C протягом 16-24 годин. Одержаний препарат клітин переносили в селективне напівтверде

середовище й асептично вносили в 100-мм чашки Петрі і інкубували при 37 °С. Через десять діб після початку відбору, чашки перевіряли на ріст гібридом і видимі колонії наколювали і поміщали в 96-ямкові планшети, що містять по 200 мкл середовища для вирощування. 96-ямкові планшети витримували в інкубаторі при 37 °С протягом 2-4 діб.

5 Приклад 2.2. Скринінг і характеристика *in vitro* антитіл мишей до CEACAM5

Первинний скринінг на продукцію IgG до CEACAM5 проводили за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA) з використанням як захоплюючого антигену білка CEACAM5 людини (одержаного, як описано в прикладі 1) і за допомогою FACS з використанням декількох ліній пухлинних клітин людини (H460, MKN45, SW1463, SKMEL28 і UMC111). Для аналізу ELISA планшети покривали білком CEACAM5 людини при 0,25 мкг/ямку в PBS і в планшет додавали 100 мкл антитіл до CEACAM5/ямку. Планшет інкубували при 37 °С протягом 1 години і п'ять разів промивали PBS, що містить 0,05 % Tween-20 (PBS-T). Потім у кожен ямку додавали 100 мкл антитіл кролика до IgG миші, кон'югованих з пероксидазою хрому (Sigma; #A9044) у розведенні 1:50000. Після інкубації при 37 °С протягом 1 години в темряві, планшети п'ять разів відмивали PBS-T. Зв'язування антитіл візуалізували, додаючи буфер TMB-H₂O₂ і зчитуючи при довжині хвилі 450 нм. Для аналізу FACS пухлинні клітини людини при 40000 клітин/ямку вносили в 96-ямковий планшет High Bind (MSD L15XB-3) і протягом 45 хв. при 4 °С додавали 100 мкл/ямку антитіл до CEACAM5 і три рази промивали PBS з 1 % BSA. Протягом 45 хв. при 4 °С додавали 100 мкл/ямку антитіл кози до IgG миші, кон'югованих з Alexa647 (Invitrogen; #A2135) і три рази промивали PBS з 1 % BSA. Зв'язування антитіл оцінювали після центрифугування і ресуспендування клітин, додаючи 200 мкл/ямку PBS з 1 % BSA і зчитуючи з використання системи проточної цитометрії Guava® easyCyte™ 8HT.

Для оцінки специфічності до CEACAM5 антитіл до CEACAM5 96-ямкові планшети покривали рекомбінантними білками CEACAM1, CEACAM6, CEACAM7 і CEACAM8 людини (одержаними, як описано в прикладі 1) з використанням тих же умов покриття, як описано вище. У планшети додавали антитіла до CEACAM5 і детектували з використанням антитіл кролика до IgG миші, кон'югованих з пероксидазою хрому (Sigma; #A9044). Зв'язування антитіл візуалізували, додаючи буфер TMB-H₂O₂ і зчитуючи при довжині хвилі 450 нм. Результати, представлені на фіг. 1, демонструють, що антитіла до CEACAM5 селективні для CEACAM5 людини відносно CEACAM1, CEACAM6, CEACAM7 і CEACAM8 людини.

30 Приклад 2.3. Характеристика зв'язування mAb

Уявну афінність антитіл до CEACAM5 відносно hCEACAM5, експресованого на поверхні пухлинних клітин MKN45 людини (DSMZ, ACC 409), визначали за допомогою системи проточної цитометрії Guava® easyCyte™ 8HT. Пухлинні клітини MKN45 при 40000 клітин/ямку вносили в 96-ямковий планшет High Bind (MSD L15XB-3), і протягом 45 хв. при 4 °С додавали 100 мкл антитіл до CEACAM5/ямку в 2-кратних серійних розведеннях, починаючи з 20 мкг/мл до 12 розведень у розріджувачі для аналізу і три рази промивали PBS з 1 % BSA. Протягом 45 хв. при 4 °С додавали 100 мкл/ямку антитіл кози до IgG миші, кон'югованих з Alexa647 (Invitrogen; #A2135), і три рази промивали PBS з 1 % BSA. Зв'язування антитіл оцінювали після центрифугування і ресуспендування клітин, додаючи 200 мкл/ямку PBS з 1 % BSA і зчитуючи з використанням системи проточної цитометрії Guava® easyCyte™ 8HT. Значення уявної K_D і EC₅₀ визначали з використанням програмного забезпечення BIOST@T-BINDING і BIOST@T-SPEED, відповідно.

Таблиця 2

Значення EC₅₀, одержані для клітин MKN45

Антитіла	MAb1	MAb2	MAb3	MAb4	MAb5
Значення EC ₅₀	16 нМ	3,4 нМ	6,2 нМ	4,9 нМ	0,73 нМ

45

Картування доменів антитіл до CEACAM5 відносно білків CEACAM5 людини і CEACAM5 яванського макака визначали за допомогою ELISA. 96-ямкові планшети покривали рекомбінантними доменами A1 (143-237), A1-B1 (143-320), A2-B2 (321-498) і A3-B3 (499-685) білка CEACAM5 людини (одержаними, як описано в прикладі 1) і рекомбінантними доменами N-A1-B1 (1-320), A1-B1 (143-320), A2-B2 (321-498) і A3-B3 (499-688) білка CEACAM5 яванського макака (одержаними, як описано в прикладі 1) з використанням тих же умов покриття, як описано вище. У планшети додавали очищені антитіла і детектували з використанням антитіл кролика до IgG миші, кон'югованих з пероксидазою хрому (Sigma; #A9044). Зв'язування антитіл візуалізували, додаючи буфер TMB-H₂O₂ і зчитуючи при довжині хвилі 450 нм. Результати

представлені на фіг. 2 і 3 і демонструють, що антитіла до CEACAM5 зв'язуються з доменом A3-B3 білків CEACAM5 людини і яванського макака.

Ізотипи окремих mAb визначали з використанням набору ізотипування IgG миші відповідно до інструкцій виробника (SEROTEC посилання MMT1). П'ять специфічних до CEACAM5 mAb являли собою IgG1, ізотипу k.

Приклад 3. Характеристика антитіл мишей до CEACAM5

Приклад 3.1. Характеристика антитіл мишей до CEACAM5 in vitro

Гібридому миші, експресуючому специфічні до CEACAM5 Ab, одержували в колбі T500, і кондиціоновані середовища збирали через 7 діб росту. Специфічні до CEACAM5 Ab очищали, пропускаючи кондиціоновані середовища через колонку з білком G, промивали і елюювали 100 мМ буфером гліцин/HCl з pH=2,7 буфер. Елюат піддавали діалізу проти PBS з наступною стерилізацією фільтруванням і зберігали при 4 °C.

Усі специфічні до CEACAM5 mAb за допомогою ELISA оцінювали на їх здатність зв'язуватися з білками CEACAM5 людини і приматів. Планшети покривали білками CEACAM5 людини або приматів, у планшет додавали mAb до hCEACAM5 і детектували з використанням антитіл кролика до IgG миші, кон'югованих з пероксидазою хрому (Sigma; #A9044). Зв'язування антитіл візуалізували, додаючи буфер TMB-H₂O₂ і зчитуючи при довжині хвилі 450 нм.

Таблиця 3

Значення EC₅₀, що відповідають зв'язувальній здатності специфічних до CEACAM5 mAb відносно білка CEACAM5 приматів

Антитіла	MAb1	MAb2	MAb3	MAb4	MAb5
EC ₅₀ (нМ) hCEACAM5	0,53	0,14	0,36	0,08	0,40
EC ₅₀ (нМ) cCEACAM5	1,18	0,07	3,72	0,05	0,45
Відношення примат/людина	2,2	0,5	10	0,6	1,1

Приклад 3.2. Уявна афінність і зв'язувальна здатність антитіл до CEACAM5 відносно клітин первинної пухлини товстої кишки людини на пізніх стадіях CR-IGR-034P при проточній цитометрії

Первинну пухлину товстої кишки людини на пізніх стадіях CR-IGR-034P (Julien et al., Clin. Cancer. Res. October 1, 2012, 18(19):5314-5328) одержували з одержаного у пацієнта ксенотрансплантата у мишей. Пухлину CR-IGR-034P ферментативно дисоціювали з використанням колагенази типу IV (Invitrogen; #17104-019) і дезоксирибонуклеази I (Invitrogen; #18047-019) протягом 1 години при 4 °C. Життєздатність клітин визначали за допомогою застосування Viacount з використанням системи проточної цитометрії Guava® easyCyte™ 8HT. Для розрахунку уявної афінності пухлинні клітини CR-IGR-034P при 40000 клітин/ямку наносили на 96-ямковий планшет High Bind (MSD L15XB-3) і додавали 100 мкл антитіл до CEACAM5/ямку в 2-кратних серійних розведеннях, починаючи з 20 мкг/мл до 12 розведень у розріджувачі для аналізу протягом 45 хв. при 4 °C і три рази промивали PBS з 1 % BSA. Протягом 45 хв. при 4 °C додавали 100 мкл/ямку антитіл кози до IgG миші, кон'югованих з Alexa647 (Invitrogen; # A2135), або антитіл кози до IgG людини, кон'югованих з Alexa488 (Invitrogen; # A11013), і три рази промивали PBS з 1 % BSA. Зв'язування антитіл оцінювали після центрифугування і ресуспендування клітин, додаючи 200 мкл/ямку PBS з 1 % BSA і зчитуючи з використанням системи проточної цитометрії Guava® easyCyte™ 8HT. Значення уявної K_D і EC₅₀ визначали з використанням програмного забезпечення BIOST@T-BINDING і BIOST@T-SPEED, відповідно.

Зв'язувальну здатність антитіл до CEACAM5 визначали з використанням набору калібрувального стандарту для IgG миші (Biotex #7208) або набору калібрувального стандарту для IgG людини (Biotex #CP010) по інструкціях виробника.

Таблиця 4

Значення K_D і EC_{50} , одержані на клітинах
первинної пухлини товстої кишки людини на пізніх стадіях CR-IGR-034P

Антитіла	MAb1	MAb2	MAb3	MAb4	MAb5
Значення K_D	1,92 нМ	0,38 нМ	1,01 нМ	0,16 нМ	0,5 нМ
Значення EC_{50}	1 нМ	0,53 нМ	2,8 нМ	0,2 нМ	1,4 нМ

Приклад 3.3. Активність інтерналізації специфічних до CEACAM5 антитіл миші

Для оцінки інтерналізації антитіл до CEACAM5 MAb1, MAb2, MAb3, MAb4 і MAb5, життєздатні клітини MKN45 інкубували протягом 24 годин при 37 °C/5 % CO₂ (або 4 °C на льоду для негативного контролю) з 10 мкг/мл попередньо мічених AlexaFluor488 антитіл до CEACAM5. Потім одну частину ямок промивали середовищем для культивування і позаклітинні мічені AF антитіла, зв'язані з клітинами, гасили за допомогою інкубації клітин з антитілом до AlexaFluor488 (50 мкг/мл) на льоду протягом 30 хв. (рівень внутрішньоклітинної флуоресценції). Іншу частину ямок інкубували тільки з середовищем для культивування в тих же умовах (загальний рівень флуоресценції).

Потім клітини відділяли і промивали, і збирали в середовище для культивування з наступним аналізом проточної цитометрії з використанням аналізатора MACSQUANT Vyb. Вимірювали асоційовану з клітинами флуоресценцію 1×10^4 клітин, і потім кількісно визначали середню інтенсивність флуоресценції відібраних життєздатних клітин. Коефіцієнт інтерналізації (%) визначали діленням асоційованої з гашеними клітинами флуоресценції на загальну асоційовану з клітинами флуоресценцію, множачи на 100. Дані виражають у вигляді середнього \pm стандартне відхилення (Std).

Таблиця 5

Інтерналізація антитіл до CEACAM5 миші в лінії клітин MKN45 через 24 години

Антитіло	Інтерналізація через 24 години, 37 °C/5 %CO ₂ % \pm Std
MAb1	49,9 \pm 5,1
MAb2	45,0 \pm 5,5
MAb3	51,1 \pm 3,5
MAb4	42,5 \pm 6,7
MAb5	51,7 \pm 3,1

П'ять специфічних до CEACAM5 антитіл після зв'язування з CEACAM5, експресованим на клітинній поверхневій мембрані, піддавалися інтерналізації, підтримуючи їх використання в області імункон'югатів антитіл для специфічного спрямування цитотоксичних засобів у злоякісні клітини. Антитіла до CEACAM5 MAb1, MAb2, MAb3, MAb4 і MAb5 через 24 години інкубації продемонстрували інтерналізацію в лінію злоякісних клітин MKN45 людини на рівні 49,9 %, 45 %, 51,1 %, 42,5 %, 51,7 %, відповідно.

Приклад 3.4. Цитотоксична активність відповідних ADC миші відносно лінії клітин MKN45

Антитіла миші кон'югували для визначення їх цитотоксичної активності in vitro. У пробірку об'ємом 15 мл при кімнатній температурі (23 °C) послідовно додавали mAb, буфер A/HEPES (4 %), DMA (диметилацетамід, 20 % об./об.), потім 6 еквівалентів лінкера SPDB при перемішуванні на магнітній мішалці. Після ночі при кімнатній температурі додавали розчин DM4 (майтанзиноїд, 9,6 еквівалента) у 15 mM DMA і 5 годин проводили реакцію. Неочищену суміш кон'югата очищали на колонках Superdex 200pg 16/60 або G25 26/10 (PBS-Na pH7,4/5 % NMP), концентрували на Amicon 15 @ 5000g і фільтрували на Millex 0,22 мкм.

Потім тестували дію кон'югатів антитіл до CEACAM5 з мایتанзиноїдом на життєздатність пухлинних клітин з використанням набору Cell Titer-Glo (Promega). Для проведення цього тесту, клітини раку шлунка людини MKN45 висівали в 96-ямові планшети і давали можливість прикріплюватися протягом 4 годин у 37 °C/атмосфері 5 % CO₂. До висіяних клітин додавали різні концентрації кон'югатів антитіл до CEACAM5. Потім клітини інкубували протягом 96 годин у тій же атмосфері. Потім у ямки додавали реагент Cell Titer-Glo протягом 10 хв. при кімнатній

температурі і вимірювали люмінесцентний сигнал з використанням планшетного лічильника EnVision (Perkin-Elmer).

Таблиця 6

Цитотоксична активність специфічних до
CEACAM5 ADC миші відносно CEACAM5+ лінії клітин MKN45

Кон'югат антитіла з лікарським засобом	Цитотоксична активність IC ₅₀ (нМ)
MAb1-SPDB-DM4	0,89±0,23
MAb2-SPDB-DM4	0,14±0,01
MAb3-SPDB-DM4	0,53±0,15
MAb4-SPDB-DM4	0,96±0,02
MAb5-SPDB-DM4	0,24±0,04

- 5 Антитіла до CEACAM5, кон'юговані з майтанзиноїдом (DM4), MAb1-SPDB-DM4, MAb2-SPDB-DM4, MAb3-SPDB-DM4, MAb4-SPDB-DM4 і MAb5-SPDB-DM4, продемонстрували цитотоксичну активність *in vitro* з IC₅₀ 0,89, 0,14, 0,53, 0,96 і 0,24 нМ, відповідно.

Приклад 4. Визначення послідовностей важких і легких ланцюгів mAb до CEACAM5

- 10 Послідовності варіабельних доменів mAb одержували з гібридами і клонували в експресуючий вектор для гарантії того, що клоновані mAb мають ті ж характеристики, що і вихідні mAb миші.

Одержані амінокислотні послідовності дозволяли одержувати інформацію, що відповідає даним, одержаним на очищених mAb, одержаних з гібридами, за допомогою N-кінцевого секвенування і мас-спектрометрії (PX/MC) важких і легких ланцюгів (LC, HC) (див. таблицю 7).

15

Таблиця 7

Мас-спектрометричний аналіз mAb до CEACAM5 з гібридами

ID клону	Ланцюг	Маса (Да)	
		За допомогою PX/MC з партії	Значення <i>in silico</i> одержаної послідовності
MAb1	LC	23837	23836
	HC (G0F)	50328	50330
MAb2i*	LC	23467	23467
	HC (G0F)	50288	50286
MAb3	LC	23907	23907
	HC (G0F)	50372	50373
MAb4	LC	23731	23731
	HC (G0F)	50370	50370
MAb5	LC	23659	23659
	HC (G0F)	50329	50330

*MAb2i являє собою антитіло, одержане за допомогою однієї з клонованих гібридом і з якого одержували так назване "MAb2" за допомогою внесення канонічних залишків у каркасні області VL і VH, як описано в прикладі 5.

Приклад 5. Кон'югат антитіла з лікарським засобом (ADC) (химерний)

Приклад 5.1. Недериватизоване химерне mAb

- 20 Послідовності нуклеїнової кислоти варіабельних доменів VH, VL клонували в експресуючі вектори в злитті з кодуєчими послідовностями IgG1 людини або константного домену Скаппа людини, відповідно, з одержанням потім партії химерних mAb за допомогою транзитornoї експресії в HEK293, як описано в прикладі 1. Афінності відносно CEACAM5 людини і яванського макака в mAb миші і химерних mAb залишалися подібними. У таблиці 8 афінності проілюстровані EC₅₀, одержаними за допомогою ELISA з CEACAM5 людини або яванського макака.
- 25

Таблиця 8

EC₅₀, одержані з CEACAM5 для mAb з гібридами миші і відповідних химерних mAb

EC ₅₀ , одержані для mAb з гібридами миші			EC ₅₀ , одержані для химерних mAb		
ID клону	hCEACAM5	cCEACAM5	ID клону	hCEACAM5	cCEACAM5
MAb1	0,53	1,18	chMAb1	0,51	1,57
MAb2i	0,14	0,07	chMAb2 (партія 1)	0,16	0,13
			chMAb2 (партія 2)	0,14	0,17
			chMAb2 _{K52R}	0,11	0,15
MAb3	0,36	3,72	chMAb3	Не проводили	Не проводили
MAb4	0,08	0,05	chMAb4	0,14	0,12
MAb5	0,4	0,45	chMAb5	0,18	0,13

Послідовності областей CDR виводили на основі послідовності білка з використанням номенклатури IMGT. Вони відповідають SEQ ID NO:1-4, 6, 7-10, 12, 13-16, 18, 19-22, 24, 25-28, 30.

Слід зазначити, що в порівнянні з антитілом, одержаним за допомогою клонованої гібридоми (MAb2i), у клон MAb2 у положеннях 41G, 42K і 45Q у VL і в положеннях 5Q і 7S у VH внесені канонічні залишки.

Крім того, у CDR2 клону MAb2 CEA-4 розташований лізин у положенні 52 у VL, який у клоні Mab2_{K52R} заміщений аргініном. Одержували партію в тих же умовах, як партію, що відповідає клону MAb2, і вона приводила до подібної афінності відносно позаклітинного домену CEACAM5 людини і яванського макака, як представлено в таблиці 7. Варто підкреслити, що цю точкову мутацію в CDR можна проводити без якого-небудь впливу на зв'язування.

Послідовності LC і HC химерного mAb для клону MAb2 і клону Mab2_{K52R} відповідають SEQ ID NO:43, 44, 54.

Конструювали chMAb2, як описано в прикладі 4. Воно являє собою химерне mAb, одержане з клону MAb2 з IgG1 людини, ізо типу Ск. Послідовності відповідають SEQ ID NO:43 і 44. За допомогою транзиторної експресії в HEK293 одержували партію в масштабі 300 мг з наступним очищенням білка за допомогою афінної хроматографії, для даних про зв'язування див. таблицю 7. Воно являє собою недериватизоване mAb, використовуване для одержання ADC.

Приклад 5.2. Одержання і характеристика ADC

У цьому прикладі з недериватизованих химерних mAb одержували імунокон'югати. Потім оцінювали ефективність *in vivo*.

Розрахунок DAR

Кон'югат, як правило, містить від 1 до 10 молекул майтанзиноїду, ковалентно зв'язаного з антитілом (так називане "відношення лікарського засобу до антитіла" або "DAR"). Ця кількість може варіювати залежно від характеру антитіла і використовуваного майтанзиноїду поряд з експериментальними умовами, використовуваними для кон'югації (такими як відношення майтанзиноїд/антитіло, час реакції, характер розчинника і співрозчинника, якщо він присутній). Таким чином, контакт між антитілом і майтанзиноїдом приводить до суміші, яка містить декілька кон'югатів, що відрізняються один від іншого різними відношеннями лікарського засобу до антитіла; необов'язково недериватизоване антитіло; необов'язково агрегати. Таким чином, визначуване DAR є середнім значенням.

Спосіб, використовуваний у даному описі, для визначення DAR, складається зі спектрофотометричного вимірювання відношення оптичної густини розчину значною мірою очищеного кон'югата при 252 і 280 нм. Зокрема, зазначене DAR можна спектрофотометрично визначити з використанням вимірюваних коефіцієнтів екстинкції, відповідно при 280 нм і 252 нм для антитіла і для майтанзиноїду ($\epsilon_{D280}=5,180 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ і $\epsilon_{D252}=26,159 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Спосіб розрахунку запозичений у Antony S. Dimitrov (ed), LLC, 2009, Therapeutic Antibodies and Protocols, vol. 525, 445, Springer Science і більш докладно описаний нижче.

Оптичні густини кон'югата при 252 нм (A₂₅₂) і при 280 нм (A₂₈₀) вимірюють в аналізі мономерних піків при ексклюзійній хроматографії (SEC) (дозволяючи розрахувати параметр "DAR(SEC)") або з використанням класичного спектрофотометричного пристрою (що дозволяє розрахувати параметр "DAR(UV)"). Оптичні густини можна виражати наступним чином:

$$A_{252}=(C_D \times \epsilon_{D252})+(C_A \times \epsilon_{A252}),$$

$$A_{280}=(C_D \times \epsilon_{D280})+(C_A \times \epsilon_{A280}),$$

де:

c_D і c_A відповідно являють собою концентрації майтанзиноїду й антитіла в розчині,
 ϵ_{D252} і ϵ_{D280} відповідно являють собою молярні коефіцієнти екстинкції майтанзиноїду при 252 і 280 нм,

ϵ_{D252} і ϵ_{A280} відповідно являють собою молярні коефіцієнти екстинкції антитіла при 252 і 280 нм.

Розв'язання цих двох рівнянь з двома невідомими приводить до наступних рівнянь:

$$c_D = [(\epsilon_{A280} \times A_{252}) - (\epsilon_{A252} \times A_{280})] / [(\epsilon_{D252} \times \epsilon_{A280}) - (\epsilon_{A252} \times \epsilon_{D280})],$$

$$c_A = [A_{280} - (c_D \times \epsilon_{D280})] / \epsilon_{A280}.$$

Потім на основі відношення концентрації лікарського засобу до концентрації антитіла розраховують середнє DAR: $DAR = c_D / c_A$.

Деглікозилювання і високорозрізнявальна мас-спектрометрія кон'югатів (HRMS)

Деглікозилювання являє собою спосіб ферментативного розщеплення за допомогою глікозидази. Деглікозилювання проводять у 500 мкл кон'югованого+100 мкл 50 мМ буфера Tris HCl+10 мкл ферменту гліканази-F (100 одиниць ліофілізованого ферменту/100 мкл води). Середовище перемішують на центрифугі "вортекс" і підтримують ніч при 37 °С. Потім деглікозилований зразок готовий до аналізу в HRMS. Мас-спектри одержували в системі Waters Q-ToF-2 у позитивному режимі електророзпилення (ES+). Умови хроматографії є наступними: колонка - 4 мкм BioSuite 250 URH SEC 4,6×300 мм (Waters); розчинники: А - амонію форміат 25 мМ+1 % мурашина кислота; В - CH₃CN; температура колонки: 30 °С; швидкість потоку 0,4 мл/хв.; ізократична елюція 70 % А+30 % В (15 хв.).

Аналітична ексклюзійна хроматографія (SEC)

Колонка: колонка TSKgel G3000 SWXL 5 мкм, 7,8 мм×30 см, TOSOH BIOSCIENCE, LLC Part # 08541+захисна колонка TSK-GEL SWXL 7 мкм, 40×6 мм, TOSOH BIOSCIENCE, LLC Part # 08543.

Рухома фаза: KCl (0,2М), KH₂PO₄ (0,052М), KH₂PO₄ (0,107М), iPrOH (20 % в об'ємі).

Умови аналізу: ізократична елюція при 0,5 мл/хв. протягом 30 хв.

Аналіз проводять у системі BEPX Lachrom Elite (Merck) з використанням спектрофотометричного детектора DAD L2455.

Склад буферів

Буфер А (рН=6,5): NaCl (50 мМ), фосфатно-калієвий буфер (50 мМ), EDTA (2 мМ).

Буфер HGS (рН=5,5): гістидин (10 мМ), гліцин (130 мМ), сахароза 5 % (мас./об.), HCl (8 мМ).

Використовувані скорочення

CV: об'єм колонки; DAR: відношення лікарського засобу й антитіла; DMA: диметилацетамід; HEPES: 4-(2-гідроксіетил)-1-піперазинетансульфонова кислота; HRMS: мас-спектроскопія високого розрізнення; NHS: N-гідроксисукцинімід; нітро-SPDB: бутанова кислота, складний 4-[(5-нітро-2-піридиніл)дитіо]-2,5-діоксо-1-піролідиніловий ефір (можна одержувати, як описано в патенті WO 2004016801); NMP: N-метилпіролідінон; КТ: кімнатна температура; SEC: ексклюзійна хроматографія.

ADC (химерне):

chMAb1-SPDB-DM4

Аналітичні дані:

$M_w(Ab)=148438$ г/моль; $M_w(DM4)=780,38$ г/моль,

$\epsilon_{280\text{ нм}}(Ab)=213320$; $\epsilon_{252\text{ нм}}(Ab)=73473$,

$\epsilon_{280\text{ нм}}(DM4)=5180$ і $\epsilon_{252\text{ нм}}(DM4)=26159$.

При перемішуванні, при КТ у посудину додавали 3,59 мл chMAb1 (C=5,72 мг/мл у буфері PBS з рН=7,4) з наступним додаванням 0,312 мл DMA і 0,046 мл розчину лінкера нітро-SPDB (5,0 екв. - 15 мМ розчин у DMA). Розчин перемішували на центрифугі "вортекс" протягом 30 сек і потім повільно перемішували при КТ протягом 3 годин. При перемішуванні на магнітній мішалці послідовно додавали 3,8 мл буфера PBS з рН=7,5, 0,389 мл DMA і 0,074 мл розчину DM4 (15 мМ розчин у DMA). Через 2,5 години при КТ неочищену реакційну суміш очищали на знесолюючій колонці HiLoad 26/60 (Superdex 200 pg; GE Healthcare), попередньо витримували з 1 CV 1М NaOH, 2 CV води і 2 CV буфера PBS з рН=7,4, що містить в об'ємі 5 % NMP. Кон'югат елювали буфером PBS з рН=7,4, що містить 5 % NMP, і фракції мономерних кон'югатів об'єднували, концентрували в Amicon Ultra-15 (Ultracel 10 k, Millipore) і фільтрували на 0,22 мкм фільтрі.

Таким чином, одержували 7,6 мл кон'югата chMAb1-SPDB-DM4 (c=2,19 мг/мл) у вигляді безбарвного прозорого розчину. Потім кон'югат аналізували на кінцеве навантаження лікарського засобу і чистоту мономерів: DAR (UV)=3,38; DAR (SEC)=3,34; RT=17,54 хв.; чистота мономерів=99,8 %.

Результат аналізу HRMS представлений на фіг. 8.

chMAb2-SPDB-DM4

Аналітичні дані:

 $M_W(\text{Ab})=147900$ г/моль; $M_W(\text{DM4})=780,38$ г/моль, $\epsilon_{280\text{ нм}}(\text{Ab})=201400$; $\epsilon_{252\text{ нм}}(\text{Ab})=70889$, $\epsilon_{280\text{ нм}}(\text{DM4})=5180$ і $\epsilon_{252\text{ нм}}(\text{DM4})=26159$.

При перемішуванні, при КТ у посудину додавали 3,8 мл chMAb2 ($C=5,08$ мг/мл у буфері PBS з $\text{pH}=7,4$) з наступним додаванням 0,337 мл DMA і 0,0433 мл розчину лінкера нітро-SPDB (5,0 екв. - 15 мМ розчин у DMA). Розчин перемішували на центрифугі "вортекс" протягом 30 сек. і потім повільно перемішували при КТ протягом 3 годин. При перемішуванні на магнітній мішалці послідовно додавали 3,12 мл буфера PBS з $\text{pH}=7,5$, 0,319 мл DMA і 0,069 мл розчину DM4 (15 мМ розчин у DMA). Через 2 години при КТ неочищену реакційну суміш фільтрували на 0,45 мкм фільтрі й очищали на знесолюючій колонці HiLoad 26/60 (Superdex 200 пг; GE Healthcare), попередньо витримували з 1 CV 1М NaOH, 2 CV води і 2 CV буфера PBS з $\text{pH}=7,4$, що містить в об'ємі 5 % NMP. Кон'югат елюювали буфером PBS з $\text{pH}=7,4$, що містить 5 % NMP, і фракції мономерних кон'югатів об'єднували, концентрували на Amicon Ultra-15 (Ultracel 10 k, Millipore) і фільтрували на 0,22 мкм фільтрі.

Таким чином, одержували 7,5 мл кон'югата chMAb2-SPDB-DM4 ($c=1,8$ мг/мл) у вигляді безбарвного прозорого розчину. Потім кон'югат аналізували на кінцеве навантаження лікарського засобу і чистоту мономерів: DAR (UV)=4,10; DAR (SEC)=4,05; RT=17,52 хв.; чистота мономерів=99,9 %.

Результат аналізу HRMS представлений на фіг. 9.

chMAb4-SPDB-DM4

Аналітичні дані:

 $M_W(\text{Ab})=148124$ г/моль; $M_W(\text{DM4})=780,38$ г/моль, $\epsilon_{280\text{ нм}}(\text{Ab})=204380$; $\epsilon_{280\text{ нм}}(\text{Ab})=73142$, $\epsilon_{280\text{ нм}}(\text{DM4})=5180$ і $\epsilon_{280\text{ нм}}(\text{DM4})=26159$.

При перемішуванні, при RT, у посудину додавали 3,63 мл chMAb4 ($C=5,69$ мг/мл у буфері PBS з $\text{pH}=7,4$) з наступним додаванням 0,316 мл DMA і 0,0465 мл розчину лінкера нітро-SPDB (5,0 екв. - 15 мМ розчин у DMA). Розчин перемішували на центрифугі "вортекс" протягом 30 сек. і потім повільно перемішували при КТ протягом 3 годин. При перемішуванні на магнітній мішалці послідовно додавали 3,8 мл буфера PBS з $\text{pH}=7,5$, 0,389 мл DMA і 0,074 мл розчину DM4 (15 мМ розчин у DMA). Через 2 години при КТ неочищену реакційну суміш очищали на знесолюючій колонці HiLoad 26/60 (Superdex 200 пг; GE Healthcare), попередньо витримували з 1 CV 1М NaOH, 2 CV води і 2 CV буфера PBS з $\text{pH}=7,4$, що містить в об'ємі 5 % NMP. Кон'югат елюювали буфером PBS з $\text{pH}=7,4$, що містить 5 % NMP, і фракції мономерних кон'югатів об'єднували, концентрували на Amicon Ultra-15 (Ultracel 10 k, Millipore) і фільтрували на 0,22 мкм фільтрі.

Таким чином, одержували 6,5 мл кон'югата chMAb4-SPDB-DM4 ($c=2,20$ мг/мл) у вигляді безбарвного прозорого розчину. Потім кон'югат аналізували на кінцеве навантаження лікарського засобу і чистоту мономерів: DAR (UV)=3,87; DAR (SEC)=3,85; RT=17,52 хв.; чистота мономерів=99,8 %.

Результат аналізу HRMS представлений на фіг. 10.

chMAb5-SPDB-DM4

Аналітичні дані:

 $M_W(\text{Ab})=148040$ г/моль; $M_W(\text{DM4})=780,38$ г/моль, $\epsilon_{280\text{ нм}}(\text{Ab})=207360$; $\epsilon_{280\text{ нм}}(\text{Ab})=72288$, $\epsilon_{280\text{ нм}}(\text{DM4})=5180$ і $\epsilon_{280\text{ нм}}(\text{DM4})=26159$.

При перемішуванні, при КТ у посудину додавали 3,15 мл chMAb5 ($C=6,38$ мг/мл у буфері PBS з $\text{pH}=7,4$) з наступним додаванням 0,269 мл DMA і 0,0453 мл розчину лінкера нітро-SPDB (5,0 екв. - 15 мМ розчин у DMA). Розчин перемішували на центрифугі "вортекс" протягом 30 сек і потім повільно перемішували при КТ протягом 3 годин. При перемішуванні на магнітній мішалці послідовно додавали 4,1 мл буфера PBS з $\text{pH}=7,5$, 0,317 мл DMA і 0,072 мл розчину DM4 (15 мМ розчин у DMA). Через 2 години при КТ неочищену реакційну суміш фільтрували на 0,45 мкм фільтрі й очищали на знесолюючій колонці HiLoad 26/60 (Superdex 200 пг; GE Healthcare), попередньо витримували з 1 CV 1М NaOH, 2 CV води і 2 CV буфера PBS з $\text{pH}=7,4$, що містить в об'ємі 5 % NMP. Кон'югат елюювали буфером PBS з $\text{pH}=7,4$, що містить 5 % NMP, і фракції мономерних кон'югатів об'єднували, концентрували на Amicon Ultra-15 (Ultracel 10 k, Millipore) і фільтрували на 0,22 мкм фільтрі.

Таким чином, одержували 7,5 мл кон'югата

AntiCEACAM5_hyb_1917CEA4_VH5Q7S_VL41G42K45Q_IgG1-SPDB-DM4 ($c=3,4$ мг/мл) у вигляді безбарвного прозорого розчину. Потім кон'югат аналізували на кінцеве навантаження

лікарського засобу і чистоту мономерів: DAR (UV)=3,4; DAR (SEC)=3,4; RT=17,49 хв.; чистота мономерів=99,8 %.

Результат аналізу HRMS представлений на фіг. 11.

Приклад 5.3. Ефективність *in vivo*

5 Чотири химерних кон'югати (chMAb4-SPDB-DM4, chMAb1-SPDB-DM4, chMAb5-SPDB-DM4 і chMAb2-SPDB-DM4) оцінювали при 2 дозах відносно вимірних первинних пухлин товстого кишечника CR-IGR-034P, п/ш імплантованих самкам мишей SCID. Контрольні групи залишали без обробки. Дози кон'югатів наведені в мг/кг. Їх вводили в дозах 5 і 2,5 мг/кг за допомогою внутрішньовенної (в/в) болюсної ін'єкції на добу 14 після імплантації пухлини.

10 Для оцінки протипухлинної активності кон'югатів, тварин щодня зважували, і пухлини 2 рази на тиждень вимірювали циркулем. Дозу, що приводить до 20 % втрати маси в нижчій точці (середнє по групі) або до 10 % або більше викликаних лікарським засобом випадків загибелі, вважали надмірно токсичною дозою. Маса тіла тварин включали маси пухлин. Об'єм пухлини розраховували з використанням формули маси (мм^3)=[довжина (мм)×ширина (мм)²]/2.

15 Первинними очікуваними ознаками ефективності є $\Delta T/\Delta C$, відсоток середнього регресу, частковий і повний регрес (PR і CR).

Зміна об'єму пухлини для кожної обробленої (Т) і контрольної (С) тварини розраховують для кожної пухлини, віднімаючи об'єм пухлини на добу першої обробки (доба визначення стадії) з об'єму пухлини на конкретну добу спостереження. Для обробленої групи розраховують середнє ΔT , і для контрольної групи розраховують середнє ΔC . Потім розраховують відношення $\Delta T/\Delta C$ і виражають у вигляді відсотків: $\Delta T/\Delta C = (\text{дельта } T / \text{дельта } C) \times 100$.

20

Дозу вважають терапевтично активною, коли $\Delta T/\Delta C$ є меншим, ніж 40 %, і дуже активною, коли $\Delta T/\Delta C$ є меншим, ніж 10 %. Якщо $\Delta T/\Delta C$ менше 0, дозу вважають високоактивною, і обчислюють відсоток регресу (Plowman J., Dykes D.J., Hollingshead M., Simpson-Herren L. and Alley M.C. Human tumor xenograft models in NCI drug development. In: Feibig HH BA, editor. Basel: Karger.; 1999, p. 101-125):

25

% регресу пухлини визначають як % зниження об'єму пухлини в обробленій групі на конкретну добу спостереження в порівнянні з її об'ємом на першу добу першої обробки.

У конкретний момент часу і для кожної тварини розраховують % регресу. Потім розраховують середній % регресу для групи:

30

$$\% \text{ регрес(при } t) = \frac{\text{об'єм}_{t_0} - \text{об'єм}_t}{\text{об'єм}_{t_0}} \times 100.$$

Частковий регрес (PR): регрес визначений як частковий, якщо об'єм пухлини знижується до 50 % від об'єму пухлини на початку обробки.

Повний регрес (CR): повний регрес досягається, коли об'єм пухлини=0 мм^3 (CR рахують, коли не можна зареєструвати об'єм пухлини).

35

Результати

Результати представлені на фіг. 4 і в таблиці 9 (нижче). При використанні схеми з одним введенням у дозах 2,5 і 5 мг/кг усі кон'югати, тестовані в цьому дослідженні, не викликають токсичності.

40 chMAb1-SPDB-DM4 був дуже активний при 5 і 2,5 мг/кг з $\Delta T/\Delta C$ 0 і 7 % ($p < 0,0001$ і $p = 0,0170$ відносно контролю), відповідно. chMAb4-SPDB-DM4 і chMAb5-SPDB-DM4 були високоактивними при 5 мг/кг з $\Delta T/\Delta C$ -5 і -7 % ($p < 0,0001$ при порівнянні з контролем), відповідно, і регресом пухлини 25 і 65 %, відповідно. Вони були дуже активними при 2,5 мг/кг з $\Delta T/\Delta C$ 7 і 2 % ($p = 0,0152$ і $p = 0,0020$ при порівнянні з контролем), відповідно. chMAb2-SPDB-DM4 був високоактивним при 5 і 2,5 мг/кг з $\Delta T/\Delta C$ -10 і -8 % ($p < 0,0001$ при порівнянні з контролем), відповідно, регресом пухлини 82 і 39 %, відповідно, і 3 і 1 CR/6, відповідно.

45

На основі цих результатів усі химерні кон'югати chMAb4-SPDB-DM4, chMAb1-SPDB-DM4, chMAb5-SPDB-DM4 і chMAb2-SPDB-DM4 придатні для розробки терапевтичних ADC.

Таблиця 9

Оцінка протипухлинної активності кон'югатів chMAb1-SPDB-DM4, chMAb2-SPDB-DM4, chMAb4-SPDB-DM4 і chMAb5-SPDB-DM4 проти первинної аденокарциноми товстої кишки людини CR-IGR-034P у самок мишей SCID

Засіб ¹	Шлях/ Доза в мл/кг	Доза в мг/кг на ін'єк- цію	Схе- ма в до- бах	Ви- кли- кана лікар- ським засо- бом заги- бель (доба)	Серед- ня зміна маси тіла в % у миші в нижній точці (доба нижньої точки)	Серед- нє ΔТ/ΔС в % (доба)	Серед- ній % рег- ресу (доба)	Переси		Біоста- тичне зна- чення р ²	Комен- тарі
								Част- ко- вий	Пов- ний		
chMAb1- SPDB- DM4	в/в (10 мл/кг)	5	14	0/6	-0,3 (D23)	0 (D33)	-	2/6	0/6	<0,0001	Дуже актив- ний
		2,5	14	0/6	-1,2 (D22)	7 (D21)	-	0/6	0/6	=0,0170	Дуже актив- ний
chMAb2- SPDB- DM4	в/в (10 мл/кг)	5	14	0/6	-1,1 (D29)	-10 (D33)	82 (D33)	6/6	3/6	<0,0001	Висо- коак- тивний
		2,5	14	0/6	-1,3 (D57)	-8 (D28)	39 (D28)	2/6	1/6	<0,0001	Висо- коак- тивний
chMAb4- SPDB- DM4	в/в (10 мл/кг)	5	14	0/6	-1,9 (D22)	-5 (D28)	25 (D28)	2/6	0/6	<0,0001	Висо- коак- тивний
		2,5	14	0/6	-1,8 (D21)	7 (D25)	-	0/6	0/6	=0,0152	Дуже актив- ний
chMAb5- SPDB- DM4	в/в (10 мл/кг)	5	14	0/6	-1,8 (D29)	-7 (D33)	65 (D33)	4/6	0/6	<0,0001	Висо- коак- тивний
		2,5	14	0/6	-0,8 (D23)	2 (D21)	-	0/6	0/6	=0,0020	Дуже актив- ний
Конт- роль	-	-	14	-	-3,6 (D29)	-	-	-	-	-	-

¹Склад лікарського засобу: HGS (10 мМ гістидин, 130 мМ гліцин, 5 % об./об. сахароза, 0,01 % Tween-80), рН=7,4.

²Значення р: тест Даннета в порівнянні з контролем після 2-стороннього дисперсійного аналізу з повторними вимірюваннями перетворених в ранги змін об'єму пухлин від вихідного рівня.

Приклад 6. Гуманізація mAb MAб2 до CEACAM5

У цьому прикладі in silico конструювали гуманізовані варіанти вихідного MAб2 IgG миші.

- 5 Одержані mAb одержували і визначали подібні характеристики, як для химерного IgG ch-MAб2.

Приклад 6.1. Протокол гуманізації 4D

а) Гуманізація на основі траєкторій молекулярної динаміки

Послідовності VL і VH клону MAб2 миші порівнювали з базою даних білків (PDB) (Berman et al., Nucleic Acids Research, 2000, 28:235-242). Використовували наступні шаблони: каркас легкого і важкого ланцюгів - 3ЕНВ (90,9 % ідентичності каркаса легкого ланцюга і 90,8 % ідентичності каркаса важкого ланцюга), L1-118M, L2-1F6L, L3-1P7K, H1-2QHR, H2-1IGT і H3-

10

1P4B з побудовою моделі гомології LC і HC до CEACAM5 з використанням молекулярного операційного середовища (MOE) (v. 2011,10 - Chemical Computing Group, Quebec, Canada). Потім у моделі гомології мінімізували енергію з використанням стандартних способів, реалізованих у MOE.

Потім проводили симуляцію молекулярної динаміки (MD) мінімізованої 3D-моделі гомології MAb2 миші, з обмеженнями на білковий каркас при температурі 500 K на 1,1 наносекунду (нс) у генералізованому уявному розчиннику Борна. У цьому першому проході MD кожні 100 пікосекунд (пс) протягом останньої 1 нс витягали 10 різних конформацій. Потім кожну з цих різних конформацій піддавали симуляції MD без обмежень на каркас білка і при температурі 300 K протягом 2,3 нс. Потім для кожного з 10 проходів MD, останні 2000 знімків, один кожну пс, із траєкторії MD використовували для розрахунку, для кожної амінокислоти MAb2 миші, її середньоквадратичні відхилення (с.к.в.) порівнювали з еталонним положенням медоїда. Порівнюючи середнє с.к.в. для 10 окремих проходів MD для даної амінокислоти з загальним середнім с.к.в. всіх амінокислот MAb2 миші, приймали рішення, чи є амінокислота досить рухомою, як спостерігають при MD, щоб розглядати її як ймовірно взаємодіючу з T-клітинними рецепторами і відповідальну за активацію імунної відповіді. В антитілі MAb2 миші як рухомі ідентифіковані 32 амінокислоти, крім CDR і її безпосереднього оточення в межах 5 Å.

Потім рухомість 60 найбільш рухомих амінокислот MAb2 миші протягом 20 нс (10×2 нс) при симуляції молекулярної динаміки порівнювали з рухомістю відповідних рухомих амінокислот 49 моделей 3D-гомології у людини, для кожної з яких проводили таку ж симуляцію MD. Ці 49 моделей зародкової лінії людини побудовані за допомогою систематичного комбінування репрезентативної панелі 7 легких ланцюгів людини (а саме vk1, vk2, vk3, vk4, vlamba1, vlamba2, vlamba3) з репрезентативною панеллю 7 важких ланцюгів людини (а саме vh1a, vh1b, vh2, vh3, vh4, vh5, vh6) (Nucleic Acid Research, 2005, Vol. 33, Database issue D593-D597).

Комбінація vk1-vh6 продемонструвала найбільшу (72,6 %) подібність 4D своїх рухомих амінокислот у порівнянні з рухомими амінокислотами антитіла MAb2 миші; таким чином, цю модель використовували для гуманізації антитіла MAb2 з фокусуванням на рухомих амінокислотах. Для парної асоціації амінокислот у MAb2 миші й амінокислотах vk1-vh6 2 послідовності вирівнювали на основі оптимального 3D-накладення альфа-атомів вуглецю в 2 відповідних гомологічних моделях.

b) Стабілізуючі мутації

Для поліпшення стабільності областей VL і VH антитіла до CEACAM5, амінокислоти легких і важких ланцюгів з низькою частотою зустрічальності в порівнянні з їх відповідними канонічними послідовностями, крім CDR, початково планували піддати мутації в найбільш часто виявлювані амінокислоти ($\Delta\Delta G_{th} > 0,5$ ккал/моль (Monsellier et al. J. Mol. Biol. 2006, 362,580-593)). Перший список консенсусних мутацій для LC і для HC обмежений амінокислотами, що виявляються в найближчій моделі для людини (тобто vk1-vh6). Жодна з цих мутацій не розташована в зоні "Vernier" (Foote et al., J. Mol. Biol. 1992, 224, 487-499). Враховували інші критерії для розгляду цих консенсусних мутацій для потенційної стабілізації антитіла MAb2 до CEACAM5. Ці критерії являють собою сприятливу зміну гідрофобності на поверхні або молекулярної механіки на основі теоретично розрахованої стабілізації мутанта. Розглядали стабілізуючі мутації, що у літературі опубліковані як ефективні (Bedouelle H.J. Mol. Biol. 2006, 362,580-593; Steipe B.J. Mol. Biol. 1994, 240, 188-192).

c) Видалення небажаних мотивів послідовностей

Розглядали наступні мотиви послідовностей: Asp-Pro (кислотолабільний зв'язок), Asn-X-Ser/Thr (глікозилювання, X=будь-яка амінокислота крім Pro), Asp-Gly/Ser/Thr (формування сукцинімід/ізо-Asp у рухомих областях), Asn-Gly/His/Ser/Ala/Cys (експоновані ділянки дезамідування), Met (окислювання в експонованій області). Одержані гуманізовані послідовності за допомогою BLAST перевіряли на подібність послідовностей з базою даних імунних епітопів (IEDB) ((Plos Biol (2005) 3(3)e91) <http://www.immuneepitope.org>) для гарантії того, що жодна з послідовностей не містить жодного відомого B- або T-клітинного епітопа з перерахованих у ній.

d) Гуманізовані області VH і VL

Запропоновано три версії для легкого ланцюга (VL1, VL1a і VL1c) і три версії для важкого ланцюга (VH1, VH1a і VH1b). У таблиці 10 і таблиці 11 наведена конкретна комбінація амінокислотних залишків, змінених у кожному гуманізованому варіанті VL і VH MAb2, відповідно. У таблиці 12 наведені повні амінокислотні послідовності гуманізованих доменів VH і VL.

Варіант VL1 демонструє 5 мутацій, що одержані на основі прямого порівняння найбільш рухомих амінокислот, що не входять у CDR, легкого ланцюга MAb2 до CEACAM5 і послідовності легкого ланцюга vk1 людини.

Варіант VL1a одержаний з VL1 і включає 4 нових мутації, що є консенсусними (послідовність vk1) і потенційно стабілізуючими. Крім того, 1 з цих мутацій зачіпає потенційно проблематичну ділянку дезамідування (D₁₇T₁₈).

5 Варіант VL1c одержаний з VL1a за допомогою внесення 1 мутації R замість K у положенні 52. Фактично, цей K52 розташований у CDR L2 і може являти собою "мішень" для процесу кон'югації.

Варіант VH1 демонструє 7 мутації, що одержані на основі прямого порівняння найбільш рухомих амінокислот, що не входять у CDR, важкого ланцюга MAb2 до CEACAM5 і послідовності важкого ланцюга vh6 людини.

10 Варіант VH1a одержаний з VH1 і містить 4 нові мутації, що є консенсусними (послідовність vh6) і потенційно стабілізуючими.

Гуманізовані домени VL і VH антитіла до CEACAM5 MAb2 комбінували наступним чином: VL1 і VH1; VL1a і VH1a; VL1c і VH1a; VL1a і VH1b.

Таблиця 10

Мутації варіантів VL антитіла до CEACAM5 MAb2

VL MAb2 миші	VL1	VL1d	VL1a	VL1c
E17	D	D	D	D
T18			R	R
Q40	P	P	P	P
Q45	K	K	K	K
K52		R		R
Q70			D	D
K74	T	T	T	T
N76	S	S	S	S
G84			A	A
S85			T	T

15

Таблиця 11

Мутації варіантів VH антитіла до CEACAM5 MAb2

VH MAb2 миші	VH1	VH1a
G9	P	P
V10	G	G
K19	S	S
K43	R	R
R44		G
F60		A
D62	S	S
Q65	K	K
N84		
K87	T	T
I89		V
A113		S

Таблиця 12

Амінокислотні послідовності VH і VL ілюстративних гуманізованих антитіл до CEACAM5

Варіант VH або VL	Послідовність	SEQ ID NO:
VH1 клону MAb2	EVQLQESGPGLVKPGGSLSLSCAASGFVFS SYDMSWVRQTPERRLEWVAYISSGGGITYF PSTVKGRFTVSRDNAKNTLYLQMNSLTSED TAIYYCAAHYFGSSGPFAYWGQGLTVTSA	SEQ ID NO:51
VH1a клону MAb2	EVQLQESGPGLVKPGGSLSLSCAASGFVFS SYDMSWVRQTPERGLEWVAYISSGGGITYA PSTVKGRFTVSRDNAKNTLYLQMNSLTSED TAVYYCAAHYFGSSGPFAYWGQGLTVTSS	SEQ ID NO:5
VL1 клону MAb2	DIQMTQSPASLSASVGDVTITCRASENIF SYLAWYQQKPGKSPKLLVYNKTTLAEGVPS RFGSGSGTQFSLTISLQPEDFGSYYCQH HYGTPFTFGSGTKLEIK	SEQ ID NO:17
VL1a клону MAb2	DIQMTQSPASLSASVGDVTITCRASENIF SYLAWYQQKPGKSPKLLVYNKTTLAEGVPS RFGSGSGTDFSLTISLQPEDFATYYCQH HYGTPFTFGSGTKLEIK	SEQ ID NO:23
VL1c клону MAb2	DIQMTQSPASLSASVGDVTITCRASENIF SYLAWYQQKPGKSPKLLVYNTRTLAEGVPS RFGSGSGTDFSLTISLQPEDFATYYCQH HYGTPFTFGSGTKLEIK	SEQ ID NO:29
VL1d клону MAb2	DIQMTQSPASLSASVGDVTITCRASENIF SYLAWYQQKPGKSPKLLVYNTRTLAEGVPS RFGSGSGTQFSLTISLQPEDFGSYYCQH HYGTPFTFGSGTKLEIK	SEQ ID NO:55

Приклад 6.2. Послідовність гуманізованого mAb до CEACAM5

На основі амінокислотних послідовностей варіантів VL і VH *in silico* одержували послідовності нуклеїнових кислот і синтезували за допомогою Genearth. Послідовності клонували в експресуючі вектори в злитті з кодуєчими послідовностями константних доменів IgG1 людини або Скапла людини, відповідно.

Приклад 6.3. Одержання і характеристика *in vitro*

Одержували партії гуманізованих mAb за допомогою транзитної експресії в HEK293 і очищали за допомогою афінної хроматографії з білком А. Структуру й ідентичність підтверджували за допомогою аналізів на основі SDS-PAGE, ексклюзійної хроматографії і мас-спектрометрії.

Афінність відносно CEACAM5 людини і яванського макака підтверджували за допомогою ELISA, EC₅₀ надані в таблиці 13.

Таблиця 13

Афінність гуманізованого mAb до CEACAM5 людини і до CEACAM5 яванського макака

Код	mAb	CEACAM5 людини		CEACAM5 яванського макака	
		EC ₅₀ (нМ)	CV	EC ₅₀ (нМ)	CV
huMAb2-1	MAb2VL1VH1-IgG1	0,22	4,7 %	0,20	7,9 %
huMAb2-2	MAb2_VL1aVH1a-IgG1	0,20	9,2 %	0,17	5,0 %
huMAb2-3	MAb2_VL1cVH1a-IgG1	0,18	11 %	0,19	4,3 %
huMAb2-4	MAb2_VL1dVH1-IgG1	0,22	4,3 %	0,17	5,0 %
chMAb2	MAb2-IgG1	0,16	9,9 %	0,17	3,0 %

Специфічність до CEACAM5 людини у порівнянні з CEACAM1, CEACAM6, CEACAM7 і CEACAM8 людини підтверджували за допомогою ELISA. Її реєстрували як відсоток зв'язування в порівнянні з повним зв'язуванням з CEACAM5 людини, див. таблицю 14.

Таблиця 14

Відсоток зв'язування гуманізованого mAb до CEACAM5 з CEACAM людини

Код	mAb	hCEA				
		CAM5	CAM1	CAM6	CAM7	CAM8
huMAb2-1	MAb2_VL1VH1-IgG1	100 %	0,3 %	0,2 %	0,3 %	0,9 %
huMAb2-2	MAb2_VL1aVH1a-IgG1	100 %	0,3 %	0,3 %	0,3 %	0,5 %
huMAb2-3	MAb2_VL1cVH1a-IgG1	100 %	0,2 %	0,3 %	0,3 %	0,6 %
huMAb2-4	MAb2_VL1dVH1-IgG1	100 %	0,3 %	0,3 %	0,3 %	1,4 %
chMAb2	MAb2-IgG1	100 %	0,3 %	0,3 %	0,3 %	0,6 %

Епітопзв'язувальний домен підтверджували за допомогою ELISA і продемонстрували, що гуманізовані варіанти специфічно розпізнавали домен A3-B3. Його реєстрували як відсоток зв'язування в порівнянні з повним зв'язуванням з CEACAM5 людини у таблиці 15.

Таблиця 15

Відсоток зв'язування гуманізованого mAb до CEACAM5 з доменами CEACAM5 людини

Код	mAb	hCEACAM5		
		N-ter-A1-B1	A2-B2	A3-B3
huMAb2-1	MAb2_VL1VH1-IgG1	0,4 %	0,3 %	100 %
huMAb2-2	MAb2_VL1aVH1a-IgG1	0,4 %	0,3 %	100 %
huMAb2-3	MAb2_VL1cVH1a-IgG1	0,4 %	0,4 %	100 %
huMAb2-4	MAb2_VL1dVH1-IgG1	0,3 %	0,3 %	100 %
chMAb2	MAb2-IgG1	0,5 %	0,3 %	100 %

Кінетику зв'язування гуманізованих варіантів MAb2 до CEACAM5 у порівнянні з химерним MAb2, рекомбінантним CEACAM5 людини (hCEACAM5) і CEACAM5 яванського макака (сCEACAM5) визначали за допомогою аналізу поверхневого плазмонного резонансу з використанням BIAcore 2000 (BIAcore Inc., Uppsala, NJ).

Коротко, біосенсорний чип CM5 BIAcore закріплювали в пристрої й активували 70 мкл NHS/EDC 1:1 при кімнатній температурі. Для всіх потоків клітин на активованих чипах іммобілізували IgG1 миші до Fc людини (BIAcore #BR-1008-39) (50 мкг/мл у 1М ацетатному буфері, pH=5). Іммобілізацію проводили при швидкості потоку 10 мкл/хв. до насичення. Потім чип блокували за допомогою ін'єкції 70 мкл етаноламіну-HCl, pH=8,5, з наступним одним відмиванням 3М MgCl₂. Для вимірювання зв'язування mAb до CEACAM5 з білком CEACAM5 людини або білком CEACAM5 яванського макака антитіла використовували при 1-5 мкг/мл у рухомому буфері BIAcore (HBS-EP). Антигени (CEACAM5 людини або CEACAM5 яванського макака) ін'єктували в концентрації від 1 до 500 нМ. Після завершення фази ін'єкції контролювали дисоціацію в рухомому буфері BIAcore при тій же швидкості потоку протягом 600 сек. Між ін'єкціями поверхню регенерували з використанням 2×5 мкл MgCl₂ 3М (2×30 сек). Окремі сенсограми аналізували з використанням програмного забезпечення BIAevaluation.

Таблиця 16

Зв'язування гуманізованого mAb до CEACAM5 з CEACAM5 людини і мавпи

mAb	CEACAM5 людини	CEACAM5 яванського макака
	K _D (нМ)	K _D (нМ)
huMAb2-1	9,8	41,7
huMAb2-2	24,5	96,0
huMAb2-3	11,7	73,5
huMAb2-4	6,9	38,6
chMAb2	9,9	52,3

Специфічність гуманізованих варіантів MAb2 до CEACAM5 у порівнянні з химерним MAb2 до CEACAM5 яванського макака в порівнянні з CEACAM1, CEACAM6 і CEACAM8 яванського макака підтверджували за допомогою ELISA. Її реєстрували як відсоток зв'язування в порівнянні з повним зв'язуванням з CEACAM5 або зв'язуванням при EC₅₀, див. таблицю 17 нижче.

5

Таблиця 17

Відсоток зв'язування гуманізованого mAb до CEACAM5 з CEACAM яванського макака

Код	mAb	CEA яванського макака			
		CAM5	CAM1	CAM6	CAM8
huMAb2-1	MAb2_VL1VH1-IgG1	100 %	0,3 %	0,3 %	3,6 %
huMAb2-2	MAb2_VL1aVH1a-IgG1	100 %	0,3 %	0,3 %	0,9 %
huMAb2-3	MAb2_VL1cVH1a-IgG1	100 %	0,3 %	0,4 %	1,2 %
huMAb2-4	MAb2_VL1dVH1-IgG1	100 %	0,3 %	0,3 %	3,2 %
chMAb2	MAb2-IgG1	100 %	0,2 %	0,3 %	1,2 %

Приклад 6.4. Характеристика гуманізованих варіантів Mab2, одержуваних за допомогою щеплення на каркаси зародкової лінії людини

У цьому прикладі одержували гуманізовані варіанти Mab2 за допомогою щеплення CRD. Крім того CDR гуманізованого антитіла використовували в способі зі скануванням аланіном для демонстрації того, що деякі положення можна замінити без впливу на зв'язування з CEACAM5 людини і *Macaca fascicularis*.

Спочатку одержували послідовність гуманізованої версії Mab2 in silico за допомогою відбору каркасів зародкової лінії людини на основі структурної гомології з антитілом MAb2 миші. Для легкого ланцюга відібрані каркаси, що належать людині, визначають гени IGKV1D-39*01 і IGKJ2*02, і для важкого ланцюга - гени IGHV3-23*04 і IGHJ4*01. У ці каркаси, що належать людині, прищеплювали шість CDR Mab2_{K52R}. Вносили три зворотних мутації, що відповідають положенням 34 і 53 у VL (SEQ ID NO:34) (області FR2-L і FR3-L, відповідно) і положенню 50 у VH (SEQ ID NO:33) (область FR2-H), з одержанням наведеної нижче послідовності, визначеної як MAb2_VLg5VHg2.

Таблиця 18

Послідовності VH і VL MAb2_VLg5VHg2

Варіант VH або VL	Послідовність	SEQ ID NO:
MAb2_VHg2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTFVSSYDMSWVRQA PGKGLEWVSYISSGGGITYYADS VKGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAAHYFGSSGPFAYWGQGTTLTVSS	SEQ ID NO:74
MAb2_VLg5	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIFSYLAWYQQKPGKA PKLLIYNTRTLQSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQHNYGTPFTFGQGTKLEIK	SEQ ID NO:75

Одержували декілька варіантів MAb2_VLg5VHg2 за допомогою одиничної заміни кожної амінокислоти шести CDR, переважно аланіном. Коли аланін вже знаходився в CDR MAb2_VLg5VHg2, що має місце в H-CDR3, замінювали іншу амінокислоту (Val у залишку 97, Arg у залишку 98 і Asp у залишку 108 SEQ ID NO:74).

На основі амінокислотних послідовностей варіантів VL і VH in silico виводили послідовності нуклеїнової кислоти й одержували за допомогою генного синтезу. Послідовності клонували в експресуючий вектор ссавців у злитті з кодуючими послідовностями константних доменів IgG1 людини або Скаппа людини, відповідно. Гуманізоване MAb2_VLg5VHg2, окремі варіанти, що відрізняються від нього одним положенням, і обмежену кількість комбінаційних мутантів одержували за допомогою транзитornoї експресії в клітинах HEK293. Супернатанти клітин, що містять секретовані IgG (20-70 мкг/мл), розбавляли до 1 мкг/мл для використання в аналізах зв'язування з ECD CEACAM5 людини, ECD *Macaca fascicularis* і доменом A3-B3 CEACAM5 людини.

Для оцінки впливу цих модифікацій визначали зв'язування IgG, вимірюючи сигнали SPR з використанням пристрою Biacore T200 (GE Healthcare). Антитіла до Fc людини зв'язували з чипом Series S CM5 за допомогою набору для зв'язування амінів з досягненням рівня 10000

одиниць відповіді (PE). Захоплювали приблизно від 300 до 600 PE кожного варіанта за допомогою ін'єкції супернатантів при 1 мкг/мл з часом контакту 60 секунд і швидкістю потоку 10 мкл/хв. Всі експерименти проводили при 25 °C з HBS-EP+ (10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,05 % поверхнево-активна речовина P20) як рухомим буфером. У режимі скринінгу, SEACAM5 людини/SEACAM5 яванського макака/домен A3-B3 людини ін'єктували при 50 нМ над захопленими варіантами IgG при швидкості потоку 30 мкл/хв. протягом 1 хвилини. Підтримували фазу дисоціації протягом 60 секунд з наступною регенерацією поверхні 1 імпульсною ін'єкцією 3М MgCl₂ при швидкості потоку 10 мкл/хв. і часом контакту 30 секунд.

Для кожного експерименту дані відповіді обробляли з використанням контрольної поверхні, таким чином, забезпечуючи корекцію на зміни об'ємного коефіцієнта заломлення і будь-яке неспецифічне зв'язування. Дані другий раз співвідносили з використанням відповіді порожніх ін'єкцій. Згідно зі способом скринінгу, описаним у примітці до заявки GE Healthcare (Application note 28-9777-72 AA), розглядали два параметри для ранжирування варіантів відносно характеристик зв'язування. Першою розраховували активність зв'язування за допомогою розрахунку частки від теоретичного максимального вимірюваного сигналу (відсоток від R_{макс}, див. фіг. 16). Другим розраховували відсоток залишкового сигналу з використанням контрольних точок дисоціації (перша через 10 секунд після закінчення ін'єкції і друга через 50 секунд після закінчення ін'єкції), і він відображає стабільність зв'язування (див. фіг. 17).

Еквівалентні параметри зв'язування в порівнянні з вихідним антитілом продемонстрували варіанти з одиночною заміною на аланін у зазначених нижче положеннях, що вказує на те, що амінокислоти CDR у цих положеннях нейтральні для зв'язування: залишки LC 27, 28, 29, 31, 51, 52, 89, 90, 93, 94, 96, 97 і залишки HC 26-31, 51-58, 97, 103, 104, 107, 109. Поведінка цих варіантів відносно SEACAM5 людини і мавпи є подібною, зберігаючи, таким чином, їх перехресну реактивність. Виявлено, що зв'язування з доменом A3-B3 SEACAM5 також не було зачеплене. Також одержані визначені комбінації двох нейтральних замін і виявлено, що вони приводять до незмінних параметрів зв'язування, як проілюстровано асоціацією LC_T51A з LC_T94A, LC_S31A з HC_G54Y або LC_T53I з HC_S53A.

І навпаки, виявлено, що у всіх інших положеннях CDR, заміна аланіном вихідної амінокислоти індукувала повну втрату зв'язування або суттєво змінювала параметри зв'язування. Прикладами є положення 101 важкого ланцюга або положення 32 і 91 легкого ланцюга (представлені на фіг. 16 і 17). Другий набір варіантів полягав у тестуванні більш консервативних мутацій у деяких таких положеннях. Зробивши це, автори знайшли, що нейтральними для зв'язування антитіла є наступні консервативні заміни: Тур для Phe у залишку 30 MAb2_VLg5, Phe для Тур у залишку 92 MAb2_VLg5, Ser для Ala у залишку 98 MAb2_VHg2 і Phe для Тур у залишку 100 MAb2_VHg2 (представлені на фігурах).

Приклад 7. Кон'югати гуманізованих варіантів MAb2 з лікарськими засобами

Приклад 7.1. Одержання і характеристика

huMAb2-2-SPDB-DM4

Аналітичні дані:

M_w(Ab)=147360 г/моль; M_w(DM4)=780,38 г/моль,

ε_{280 нм}(Ab)=201400; ε_{280 нм}(Ab)=71693,

ε_{280 нм}(DM4)=5180; ε_{280 нм}(DM4)=26159.

При перемішуванні, при КТ у посудину додавали 19,4 мг huMAb2-2 (C=5,1 мг/мл у буфері PBS з pH=7,4) з наступним додаванням 0,375 мл DMA і 0,0439 мл розчину лінкера нітро-SPDB (5,0 екв. - 15 мМ розчин у DMA). Розчин перемішували на центрифугі "вортекс" протягом 30 сек і потім повільно перемішували при КТ протягом 2 годин. Додавали додатковий об'єм 0,0044 мл розчину лінкера нітро-SPDB (5,0 екв. - 15 мМ розчин у DMA). Через 2 години при КТ при перемішуванні на магнітній мішалці послідовно додавали 2 мл буфера PBS з pH=7,5 і 0,0702 мл розчину DM4 (15 мМ розчин у DMA). Через 2 години при КТ неочищену реакційну суміш фільтрували на 0,45 мкм фільтрі й очищали на знесолюючій колонці HiPrep 26/10 (Sephadex G25, GE Healthcare), попередньо витримували з 1 CV 1М NaOH, 2 CV води і 2 CV буфера з гістидину (10 мМ), гліцину (130 мМ), сахарози (5 %), pH=5,5. Кон'югат елюювали буфером з гістидином (10 мМ), гліцином (130 мМ), сахарозою (5 %), pH=5,5, і фракції мономерних кон'югатів об'єднували і фільтрували на 0,22 мкм фільтрі.

Таким чином, одержували 10,3 мл кон'югата huMAb2-2-SPDB-DM4 (c=1,35 мг/мл) у вигляді безбарвного прозорого розчину. Потім кон'югат аналізували на кінцеве навантаження лікарського засобу і чистоту мономерів: DAR (UV)=3,7; DAR (SEC)=3,6; RT=17,29 хв.; чистота мономерів=97,9 %.

Результат аналізу HRMS представлений на фіг. 12.

huMAb2-1-SPDB-DM4

Аналітичні дані:

$M_W(\text{Ab})=147563$ г/моль; $M_W(\text{DM4})=780,38$ г/моль,

$\varepsilon_{280\text{ нм}}(\text{Ab})=201400$; $\varepsilon_{252\text{ нм}}(\text{Ab})=69669$,

$\varepsilon_{280\text{ нм}}(\text{DM4})=5180$; $\varepsilon_{252\text{ нм}}(\text{DM4})=26159$.

5 При перемішуванні, при КТ у посудину додавали 3,8 мл розчину huMAb2-1 (C=5,08 мг/мл у буфері PBS з pH=7,4) з наступним додаванням 0,341 мл DMA і 0,0392 мл розчину лінкера нітро-SPDB (4,5 екв. - 15 мМ розчин у DMA). Розчин перемішували на центрифугі "вортекс" протягом 30 сек і потім повільно перемішували при КТ протягом 3 годин. Додавали додатковий об'єм 0,0087 мл розчину лінкера нітро-SPDB (1,0 екв. - 15 мМ розчин у DMA). Через 2 години при КТ
10 при перемішуванні на магнітній мішалці послідовно додавали 2,62 мл буфера PBS з pH=7,5, 0,254 мл DMA і 0,076 мл розчину DM4 (15 мМ розчин у DMA). Через 1 годину при КТ неочищену реакційну суміш фільтрували на 0,45 мкм фільтрі й очищали на знесолюючій колонці HiPrep 26/10 (Sephadex G25, GE Healthcare), попередньо витримували з 1 CV 1M NaOH, 2 CV води і 2 CV буфера з гістидину (10 мМ), гліцину (130 мМ), сахарози (5 %), pH=5,5. Кон'югат елюювали
15 буфером з гістидину (10 мМ), гліцину (130 мМ), сахарози (5 %), pH=5,5, і фракції мономерних кон'югатів об'єднували і фільтрували на 0,22 мкм фільтрі.

Таким чином, одержували 9,5 мл кон'югата huMAb2-1-SPDB-DM4 (c=1,35 мг/мл) у вигляді безбарвного прозорого розчину. Потім кон'югат аналізували на кінцеве навантаження лікарського засобу і чистоту мономерів: DAR (UV)=4,1; DAR (SEC)=4,0; RT=17,39 хв.; чистота мономерів=96,7 %.

Результат аналізу HRMS представлений на фіг. 13.

huMAb2-3-SPDB-DM4

Аналітичні дані:

$M_W(\text{Ab})=147417$ г/моль; $M_W(\text{DM4})=780,38$ г/моль,

$\varepsilon_{280\text{ нм}}(\text{Ab})=201400$; $\varepsilon_{252\text{ нм}}(\text{Ab})=71451$,

$\varepsilon_{280\text{ нм}}(\text{DM4})=5180$; $\varepsilon_{252\text{ нм}}(\text{DM4})=26159$.

25 При перемішуванні, при КТ у посудину додавали 3,8 мл розчину huMAb2-3 (C=5,09 мг/мл у буфері PBS з pH=7,4) з наступним додаванням 0,336 мл DMA і 0,0437 мл розчину лінкера нітро-SPDB (5 екв. - 15 мМ розчин у DMA). Розчин перемішували на центрифугі "вортекс" протягом 30 сек і потім повільно перемішували при КТ протягом 3 годин. Додавали додатковий об'єм 0,0035 мл розчину лінкера нітро-SPDB (0,4 екв. - 15 мМ розчин у DMA). Через 1 годину при КТ при перемішуванні на магнітній мішалці послідовно додавали 2,60 мл буфера PBS з pH=7,5, 0,248 мл DMA і 0,074 мл розчину DM4 (15 мМ розчин у DMA). Через 1 годину при КТ неочищену реакційну суміш фільтрували на 0,45 мкм фільтрі й очищали на знесолюючій колонці HiPrep 26/10 (Sephadex G25, GE Healthcare), попередньо витримували з 1 CV 1M NaOH, 2 CV води і 2 CV буфера з гістидину (10 мМ), гліцину (130 мМ), сахарози (5 %), pH=5,5. Кон'югат елюювали
35 буфером з гістидину (10 мМ), гліцину (130 мМ), сахарози (5 %), pH=5,5, і фракції мономерних кон'югатів об'єднували і фільтрували на 0,22 мкм фільтрі.

Таким чином, одержували 11 мл кон'югата huMAb2-3-SPDB-DM4 (c=1,08 мг/мл) у вигляді безбарвного прозорого розчину. Потім кон'югат аналізували на кінцеве навантаження лікарського засобу і чистоту мономерів: DAR (UV)=3,9; DAR (SEC)=3,8; RT=17,44 хв.; чистота мономерів=98,4 %.

Результат аналізу HRMS представлений на фіг. 14.

huMAb2-4-SPDB-DM4

Аналітичні дані:

$M_W(\text{Ab})=147628$ г/моль; $M_W(\text{DM4})=780,38$ г/моль,

$\varepsilon_{280\text{ нм}}(\text{Ab})=201400$; $\varepsilon_{252\text{ нм}}(\text{Ab})=70628$,

$\varepsilon_{280\text{ нм}}(\text{DM4})=5180$; $\varepsilon_{252\text{ нм}}(\text{DM4})=26159$.

50 При перемішуванні, при КТ у посудину додавали 3,8 мл розчину huMAb2-4 (C=5,09 мг/мл у буфері PBS з pH=7,4) з наступним додаванням 0,345 мл DMA і 0,0448 мл розчину лінкера нітро-SPDB (5 екв. - 15 мМ розчин у DMA). Розчин перемішували на центрифугі "вортекс" протягом 30 сек і потім повільно перемішували при КТ протягом 3 годин. Додавали додатковий об'єм 0,0027 мл розчину лінкера нітро-SPDB (0,3 екв. - 15 мМ розчин у DMA). Через 1 годину при КТ при перемішуванні на магнітній мішалці послідовно додавали 2,70 мл буфера PBS з pH=7,5, 0,263 мл DMA і 0,075 мл розчину DM4 (15 мМ розчин у DMA). Через 1 годину при КТ неочищену реакційну суміш фільтрували на 0,45 мкм фільтрі й очищали на знесолюючій колонці HiPrep 26/10 (Sephadex G25, GE Healthcare), попередньо витримували з 1 CV 1M NaOH, 2 CV води і 2 CV буфера з гістидину (10 мМ), гліцину (130 мМ), сахарози (5 %), pH=5,5. Кон'югат елюювали
55 буфером з гістидину (10 мМ), гліцину (130 мМ), сахарози (5 %), pH=5,5, і фракції мономерних кон'югатів об'єднували і фільтрували на 0,22 мкм фільтрі.
60

Таким чином, одержували 11 мл кон'югата huMAb2-4-SPDB-DM4 ($c=1,23$ мг/мл) у вигляді безбарвного прозорого розчину. Потім кон'югат аналізували на кінцеве навантаження лікарського засобу і чистоту мономерів: DAR (UV)=3,8; DAR (SEC)=3,8; RT=17,53 хв.; чистота мономерів=99,3 %.

5 Результат аналізу HRMS представлений на фіг. 15.

Приклад 7.2. Цитотоксичність *in vitro*

Матеріали і методи

Оцінювали дію кон'югатів антитіл до CEACAM5 з майтанзиноїдами на життєздатність пухлинних клітин, як описано в прикладі 3.4.

10 Результати

Таблиця 19

Цитотоксична активність специфічних до
CEACAM5 гуманізованих ADC відносно CEACAM5+ лінії клітин MKN45

ADC	Цитотоксична активність, IC_{50} (нМ) \pm StD
chMAb2-SPDB-DM4	0,24 \pm 0,02
huMAb2-1-SPDB-DM4	0,18 \pm 0,01
huMAb2-2-SPDB-DM4	0,23 \pm 0,02
huMAb2-3-SPDB-DM4	0,16 \pm 0,01
Неспоріднене ADC	8,52 \pm 2,07

Ці кон'югати chMAb2-SPDB-DM4, huMAb2-1-SPDB-DM4, huMAb2-2-SPDB-DM4 і huMAb2-3-SPDB-DM4 і неспоріднений кон'югат з DM4 продемонстрували цитотоксичну активність відносно клітин MKN45 у культурі *in vitro* з IC_{50} 0,24, 0,18, 0,23, 0,16 і 8,52 нМ, відповідно. Цитотоксична активність кон'югатів з антитілами до CEACAM5 була в 53-35 разів нижче, ніж вимірювана активність неспорідненого кон'югата з DM4, що вказує на опосередковувану CEACAM5 цитотоксичну активність кон'югатів з антитілами до CEACAM5.

Приклад 7.3. Ефективність *in vivo* проти первинних пухлин товстого кишечника CR-IGR-034P, п/ш імплантованих самкам голих мишей CD-1

Матеріали і методи

Дві гуманізовані послідовності у вигляді кон'югатів huMAb2-3-SPDB-DM4 і huMAb2-4-SPDB-DM4 оцінювали на 4 рівнях дозування в порівнянні з chMAb2-SPDB-DM4 відносно вимірних первинних пухлин товстого кишечника CR-IGR-034P, п/ш імплантованих самкам голих мишей CD-1. Контрольні групи залишали без обробки. Дози кон'югатів наведені в мг/кг. Їх вводили в дозах 10, 5, 2,5 і 1,25 мг/кг за допомогою внутрішньовенної (в/в) болюсної ін'єкції на добу 19 після імплантації пухлини.

Оцінку токсичності й ефективності проводили, як описано в прикладі 5.

Результати

30 Результати представлені на фіг. 5 і в таблиці 20 (нижче).

При використанні схеми з одним введенням у дозах 1,25, 2,5, 5 і 10 мг/кг усі кон'югати, тестовані в цьому дослідженні, не викликають токсичності.

huMAb2-4-SPDB-DM4 і chMAb2-SPDB-DM4 були високоактивними при 10 мг/кг з $\Delta T/\Delta C$ -4 % ($p<0,0001$ у порівнянні з контролем) і регресом пухлини 21 і 19 %, відповідно, активними при 5 мг/кг з $\Delta T/\Delta C$ 12 ($p=0,0105$ у порівнянні з контролем) і 17 % ($p=0,0417$ у порівнянні з контролем), відповідно, і мінімально активними при 2,5 мг/кг з $\Delta T/\Delta C$ 36 і 37 % (несуттєві в порівнянні з контролем), відповідно, і неактивними при 1,25 мг/кг. huMAb2-3-SPDB-DM4 був високоактивним при 10 мг/кг з $\Delta T/\Delta C$ - 6 % ($p<0,0001$ у порівнянні з контролем) і регресом пухлини 31 %, дуже активним при 5 мг/кг з $\Delta T/\Delta C$ 4 % ($p<0,0001$ у порівнянні з контролем), активним при 2,5 мг/кг з $\Delta T/\Delta C$ 12 ($p=0,0322$ у порівнянні з контролем) і мінімально активним при 1,25 мг/кг, $\Delta T/\Delta C$ 34 % (не значимо в порівнянні з контролем).

На основі цих результатів гуманізовані послідовності huMAb2-3-SPDB-DM4 і huMAb2-4-SPDB-DM4 придатні для розробки терапевтичних ADC. З двох послідовностей кращою була huMAb2-3-SPDB-DM4.

45

Таблиця 20

Оцінка протипухлинної активності кон'югатів huMAb2-3-SPDB-DM4, huMAb2-4-SPDB-DM4 і chMAb2-SPDB-DM4 проти первинної аденокарциноми товстої кишки людини CR-IGR-034P у самок мишей CD-1

Засіб ¹	Шлях/ Доза в мл/кг	Доза в мг/кг на ін'єк- цію	Схе- ма в добах	Викли- кана лікар- ським засо- бом заги- бель (доба)	Середня зміна маси тіла в % на мишу в нижній точці (доба нижньої точки)	Середнє ΔТ/ΔС в % (доба)	Серед- ній % регресу (доба)	Регреси		Біоста- тичне зна- чення р ²	Коментарі
								Част- ковий	Пов- ний		
chMAb2- SPDB- DM4	в/в (10 мл/кг)	10	19	0/6	-7,3 (D20)	-4 (D32)	19 (D32)	2/6	0/6	<0,0001	Високо- активний
		5	19	0/6	-4,5 (D45)	12 (D32)	-	0/6	0/6	=0,0105	Активний
		2,5	19	0/6	-4,2 (D20)	36 (D32)	-	0/6	0/6	н.з.	Мінімаль- но актив- ний
		1,25	19	0/6	-4,1 (D20)	42 (D32)	-	0/6	0/6	н.з.	Неактив- ний
huMAb2- 3-SPDB- DM4	в/в (10 мл/кг)	10	19	0/6	-4,3 (D27)	-6 (D35)	31 (D35)	2/6	0/6	<0,0001	Високо- активний
		5	19	0/6	-3,3 (D20)	4 (D38)	-	0/6	0/6	<0,0001	Дуже активний
		2,5	19	0/6	-5,4 (D45)	12 (D38)	-	0/6	0/6	=0,0322	Активний
		1,25	19	0/6	-3,0 (D27)	34 (D38)	-	0/6	0/6	н.з.	Мінімаль- но актив- ний
huMAb2- 4-SPDB- DM4	в/в (10 мл/кг)	10	19	0/6	-3,7 (D22)	-4 (D32)	21 (D32)	2/6	0/6	<0,0001	Дуже активний
		5	19	0/6	-3,2 (D27)	17 (D32)	-	0/6	0/6	=0,0417	Дуже активний
		2,5	19	0/6	-3,4 (D20)	37 (D32)	-	0/6	0/6	н.з.	Мінімаль- но актив- ний
		1,25	19	0/6	-2,8 (D27)	50 (D32)	-	0/6	0/6	н.з.	Неактив- ний
Конт- роль	-	-	19	-	- 3,9 (D24)	-	-	-	-	-	-

¹Склад лікарського засобу: HGS (10 мМ гістидин, 130 мМ гліцин, 5 % об./об. сахароза, 0,01 % Tween-80) pH 7,4.

²Значення р: критерій Даннета в порівнянні з контролем після 2-стороннього дисперсійного аналізу з повторними вимірюваннями перетворених в ранги змін об'єму пухлин від вихідного рівня.
н.з.: не значимо.

Приклад 7.4. Ефективність in vivo проти первинних пухлин шлунка STO-IND-006, п/ш імплантованих самкам мишей SCID

5 Матеріали і методи

Гуманізований кон'югат huMAb2-3-SPDB-DM4 оцінювали на 3 рівнях дозування проти вимірних первинних пухлин шлунка STO-IND-006, п/ш імплантованих самкам мишей SCID.

Контрольні групи залишали без обробки. Дози кон'югатів наведені в мг/кг. Їх вводили в дозах 10, 5 і 2,5 мг/кг за допомогою внутрішньовенної (в/в) болюсної ін'єкції на добу 27 після імплантації пухлини.

Оцінку токсичності й ефективності проводили, як описано в прикладі 5.

5 Результати

При використанні схеми з одним введенням у дозах 2,5, 5 і 10 мг/кг, huMAb2-3-SPDB-DM4 не індукує токсичності.

Як представлено на фіг. 6 і в таблиці 21, huMAb2-3-SPDB-DM4 був дуже активним при 10 мг/кг з $\Delta T/\Delta C$ 7 % ($p < 0,0001$ у порівнянні з контролем), активним при 5 мг/кг з $\Delta T/\Delta C$ 36 % ($p = 0,0281$ у порівнянні з контролем) і неактивним при 2,5 мг/кг.

Таблиця 21

Оцінка протипухлинної активності кон'югатів huMAb2-3-SPDB-DM4 проти первинної аденокарциноми шлунка людини STO-IND-006 у самок мишей SCID

Засіб ¹	Шлях/ Доза в мл/кг	Доза в мг/кг на ін'єк- цію	Схе- ма в до- бах	Викли- кана лікар- ським засо- бом заги- бель (доба)	Середня зміна маси тіла в % на мишу в нижній точці (доба нижньої точки)	Середнє $\Delta T/\Delta C$ в % (доба)	Серед- ній % ре- гресу (доба)	Регреси		Біоста- тичне зна- чення p^2	Комен- тарі
								Част- ковий	Пов- ний		
huMAb2-3- SPDB- DM4	в/в (10 мл/кг)	10	27	0/6	-10,5 (D45)	7 (D34)	-	0/6	0/6	<0,0001	Дуже актив- ний
		5	27	0/6	-8,4 (D45)	36 (D45)	-	0/6	0/6	=0,0281	Актив- ний
		2,5	27	0/6	-5,8 (D45)	50 (D38)	-	0/6	0/6	н.з.	Неактив- ний
Контроль	-	-	27	-	- 2,5 (D38)	-	-	-	-	-	-

¹Склад лікарського засобу: HGS (10 мМ гістидин, 130 мМ гліцин, 5 % об./об. сахароза, 0,01 % Tween-80) pH 7,4.

²Значення p : критерій Даннета в порівнянні з контролем після 2-стороннього дисперсійного аналізу з повторними вимірюваннями перетворених в ранги змін об'єму пухлин від вихідного рівня.

н.з.: не значимо.

Приклад 7.5. Ефективність in vivo проти первинних пухлин легень LUN-NIC-0014, п/ш імплантованих самкам мишей SCID

15 Матеріали і методи

Гуманізований кон'югат huMAb2-3-SPDB-DM4 оцінювали на 3 рівнях дозування відносно вимірних первинних пухлин легень LUN-NIC-0014, п/ш імплантованих самкам мишей SCID. Контрольні групи залишали без обробки. Дози кон'югата наведені в мг/кг. Його вводили в дозах 10, 5 і 2,5 мг/кг за допомогою внутрішньовенної (в/в) болюсної ін'єкції на добу 29 після імплантації пухлини.

Оцінку токсичності й ефективності проводили, як описано в прикладі 5.

20 Результати

При використанні схеми з одним введенням у дозах 2,5, 5 і 10 мг/кг, huMAb2-3-SPDB-DM4 не індукував токсичності.

Як представлено на фіг. 18 і в таблиці 22, huMAb2-3-SPDB-DM4 був високоактивним при 10 і 5 мг/кг з $\Delta T/\Delta C$ менше 0 % ($p < 0,0001$ у порівнянні з контролем) і регресом пухлини 67 і 57 % відповідно, і активним при 2,5 мг/кг з $\Delta T/\Delta C$ 12 % ($p = 0,0363$ у порівнянні з контролем).

Оцінка протипухлинної активності кон'югата huMAb2-3-SPDB-DM4 проти первинної аденокарциноми легень людини LUN-NIC-0014 у самок мишей SCID

Засіб ¹	Шлях/ Доза в мл/кг	Доза в мг/кг на ін'єк- цію	Схе- ма в до- бах	Викли- кана лікар- ським засо- бом заги- бель (доба)	Середня зміна маси тіла в % на мишу в нижній точці (доба нижньої точки)	Серед- нє ΔТ/ΔС в % (доба 42)	Серед- ній % рег- ресу (доба 42)	Регреси		Біоста- тичне зна- чення р ²	Комен- тарі
								Част- ковий	Пов- ний		
huMAb2-3- SPDB-DM4	в/в (10 мл/кг)	10	29	0/6	+1,7 (D32)	<0	67	5/6	1/6	<0,0001	Високо- активний
		5	29	0/6	-1,1 (D36)	<0	57	4/6	0/6	<0,0001	Високо- активний
		2,5	29	0/6	+0,5 (D32)	12 (D39)	-	0/6	0/6	0,0363 (D39)	Активний
Контроль	-	-	-	-	+0,1 (D34)	-	-	-	-	-	-

¹Склад лікарського засобу: HGS (10 мМ гістидин, 130 мМ гліцин, 5 % об./об. сахароза, 0,01 % Tween-80) рН 7,4.

²Значення р: критерій Даннета в порівнянні з контролем після 2-стороннього дисперсійного аналізу з повторними вимірюваннями перетворених в ранги змін об'єму пухлин від вихідного рівня.

Приклад 7.6. Ефективність in vivo проти первинних пухлин товстого кишечника CR-IGR-034P, п/ш імплантованих самкам мишей SCID

Матеріали і методи

5 Оцінювали три кон'югати, що складаються з гуманізованого huMAb2-3, кон'югованого з DM4 за допомогою двох різних лінкерів (SPDB і сульфо-SPDB), на 2 рівнях дозування відносно вимірних первинних пухлин товстого кишечника CR-IGR-034P, п/ш імплантованих самкам мишей SCID. Контрольні групи залишали без обробки. Дози кон'югатів наведені в мг/кг. Їх вводили в дозах 5 і 2,5 мг/кг за допомогою внутрішньовенної (в/в) болюсної ін'єкції на добу 19 після імплантації пухлини.

10 Оцінку токсичності й ефективності проводили, як описано в прикладі 5.

Результати

При використанні схеми з одним введенням у дозах 2,5 і 5 мг/кг, huMAb2-3-SPDB-DM4 і huMAb2-3-сульфо-SPDB-DM4 не індукували токсичності.

15 Як представлено на фіг. 19 і в таблиці 23, huMAb2-3-SPDB-DM4 був активним при 5 і 2,5 мг/кг з ΔТ/ΔС 12 і 40 %, відповідно (р<0,0001 у порівнянні з контролем), huMAb2-3-сульфо-SPDB-DM4 був високоактивним при 5 мг/кг з ΔТ/ΔС менше 0 % (р<0,0001 у порівнянні з контролем) і регресом пухлини 12 % і активним при 2,5 мг/кг з ΔТ/ΔС 1 % (р<0,0001 у порівнянні з контролем).

20

Таблиця 23

Оцінка протипухлинної активності кон'югатів huMAb2-3-SPDB-DM4 і
huMAb2-3-сульфо-SPDB-DM4 проти первинної аденокарциноми товстої кишки людини
CR-IGR-034P у самок мишей SCID

Засіб ¹	Шлях/ Доза в мл/кг	Доза в мг/кг на ін'єк- цію	Схе- ма в до- бах	Викли- кана ліка- рським засо- бом заги- бель (доба)	Середня зміна маси тіла в % на мишу в нижній точці (доба нижньої точки)	Серед- нє ΔT/ΔC в % (доба 34)	Серед- ній % рег- ресу (доба 34)	Регреси		Біоста- тичне зна- чення р ²	Комен- тарі
								Част- ковий	Пов- ний		
huMAb2-3- SPDB-DM4	в/в (10 мл/кг)	5	19	0/6	+1,6 (D20)	12	-	0/6	0/6	<0,0001	Активний
		2,5	19	0/6	-1,5 (D38)	40	-	0/6	0/6	<0,0001	Міні- мально актив- ний
huMAb2-3- сульфо- SPDB-DM4	в/в (10 мл/кг)	5	19	0/6	+0,1 (D20)	<0	12	0/6	0/6	<0,0001	Високо- активний
		2,5	19	0/6	+0,7 (D20)	11	-	0/6	0/6	<0,0001	Активний
		2,5	19	0/6	+2,5 (D20)	66	-	0/6	0/6	0,0306	Неактив- ний
Контроль	-	-	-	-	+0,5 (D34)	-	-	-	-	-	-

¹Склад лікарського засобу: HGS (10 мМ гістидин, 130 мМ гліцин, 5 % об./об. сахароза, 0,01 % Tween-80) pH 7,4.

²Значення р: критерій Даннета в порівнянні з контролем після 2-стороннього дисперсійного аналізу з повторними вимірюваннями перетворених в ранги змін об'єму пухлин від вихідного рівня.

Приклад 8. Розробка імуногістохімічного (IHC) протоколу, призначеного для детекції білка CEACAM5 людини і мавпи у фіксованих у формаліні і занурених у парафін (FFPE) тканинах

5 Матеріали і методи

Тканини

Як джерело тканин людини (пухлинних і непухлинних), а також яванського макака (нормальних) використовували мікропанелі тканин FFPE (TMA, таблиця 24).

Мікропанелі фіксованих у формаліні і занурених у парафін тканин, використовувані як джерело тканин

Посилання	Постачальник	Опис
ASM221	Pantomics	Мавпа Суно, 22 органи, 22 зразки
CyFDA	US Biomax	Мікропанель нормальних тканин мавпи Суно, 33 органи, узяті у 6 нормальних індивідумів (99 зразків)
COC1501	Pantomics	Панель тканин раку товстого кишечника, 150 зразків нормальних/доброякісних (5 зразків) і злоякісних (70 зразків) тканин
COC1502	Pantomics	Панель тканин раку товстого кишечника, 150 зразків нормальних/доброякісних (5 зразків) і злоякісних (70 зразків) тканин
COC1503	Pantomics	Панель тканин раку товстого кишечника, 150 зразків нормальних/доброякісних (5 зразків) і злоякісних (70 зразків) тканин
MTU951	Pantomics	40 типів пухлин, що містять доброякісні, злоякісні і метастатичні зразки з 27 анатомічних ділянок
LUC1501	Pantomics	Панель тканин раку легень, 150 зразків нормальних/доброякісних (5 зразків) і злоякісних (70 зразків) тканин
LUC1502	Pantomics	Панель тканин раку легень, 150 зразків нормальних/доброякісних (5 зразків) і злоякісних (70 зразків) тканин
LUC1503	Pantomics	Панель тканин раку легень, 150 зразків нормальних/доброякісних (5 зразків) і злоякісних (70 зразків) тканин
MNO961	Pantomics	35 типів нормальних тканин на основі рекомендації FDA для тестування перехресної реактивності антитіл
MNO661	Pantomics	33 типи нормальних тканин на основі рекомендації FDA для тестування перехресної реактивності антитіл
MNO341	Pantomics	33 типи нормальних тканин на основі рекомендації FDA для тестування перехресної реактивності антитіл
PAC481	Pantomics	Панель тканин раку підшлункової залози містить 20 зразків злоякісних пухлин і 4 зразки нормальних і незлоякісних тканин підшлункової залози
CC4	Superbiochips	Панель з 59 зразків, що містить 59 зразків раку легень
A218(III)	Accumax	Панель тканин раку стравоходу містить 40 зразків пухлин і 8 зразків, що не є неоплазією
A219(II)	Accumax	Панель тканин злоякісних пухлин голови і шиї містить 45 зразків пухлин і 8 зразків, що не є неоплазією
A213(II)	Accumax	Панель тканин злоякісних пухлин яєчника містить 43 зразків пухлин і 8 зразків, що не є неоплазією
A301(IV)	Accumax	Панель тканин різних злоякісних пухлин з відповідними нормальними тканинами (30 зразків злоякісних пухлин, 30 зразків, що не є неоплазією)
A103(V)	Accumax	Панель різних нормальних тканин у двох повтореннях (45 зразків)
MAN2	Superbiochips	Панель з 59 зразків, що містить 9 або 10 нормальних зразків шлунка, стравоходу, легень, колоректальних тканин, щитовидної залози і нирок
MA2	Superbiochips	Панель з 59 зразків, що містить 9 або 10 зразків раку шлунка, стравоходу, легень, колоректального раку, раку щитовидної залози і нирок

MBN4	Superbiochips	Панель з 59 зразків, що містить 9 або 10 нормальних зразків молочної залози, печінки, сечового міхура, яєчника, підшлункової залози, передміхурової залози
MB4	Superbiochips	Панель з 59 зразків, що містить 9 або 10 зразків молочної залози, печінки, сечового міхура, яєчника, підшлункової залози, раку передміхурової залози
MCN4	Superbiochips	Панель з 59 зразків, що містить 9 або 10 нормальних зразків ендометрія, жовчного міхура, гортані, шийки матки, шкіри
MC4	Superbiochips	Панель з 59 зразків, що містить 9 або 10 зразків раку ендометрія, жовчного міхура, гортані, шийки матки, лімфоми, меланоми
CJ1	Superbiochips	Панель з 59 зразків, що містить 59 зразків раку яєчника
CDN3	Superbiochips	Панель з 59 зразків, що містить 59 зразків нормальної товстої кишки і прямої кишки
CCN2	Superbiochips	Панель з 59 зразків, що містить 59 зразків нормальної легені (відповідна CC4)
BB5	Superbiochips	60 зразків різних типів злоякісних пухлин від 30 чоловік
AA9	Superbiochips	Панель з 59 зразків, що містить 59 зразків нормальних органів
TMAHu3a	Asterand	Панель тканин різних злоякісних пухлин (76 зразків)
STC1501	Pantomics	Панель тканин раку шлунка, 150 зразків, що містить 75 зразків нормальних, реактивних і злоякісних тканин шлунка
STC1502	Pantomics	Панель тканин раку шлунка, 150 зразків, що містить 75 зразків нормальних, реактивних і злоякісних тканин шлунка
STC1503	Pantomics	Панель тканин раку шлунка, 150 зразків, що містить 75 зразків нормальних, реактивних і злоякісних тканин шлунка
STC481	Pantomics	Панель тканин раку шлунка, 16 зразків, 48 зразків, один нормальний парний із двома зразками пухлинної тканини від кожного пацієнта

Антитіла

- 5 Як первинне моноклональне антитіло миші до CEACAM5 людини використовували MAb2. Як вторинне антитіло використовували кон'юговані з біотином антитіла кози до IgG1 миші (специфічні до ланцюга $\gamma 1$) (посилання 1070-08, партія L4309-X761, Southern Biotech, USA).

Імунозабарвлення

- 10 Застосовували спосіб демаскування антигену з використанням буфера Cell Conditioning 1 (CC1) при 95 °C протягом 8 хв., і потім при 100 °C протягом 28 хв. Після стадії блокування ендогенного біотину, стекла інкубували з первинним антитілом до антитіла, розведеним у забуференому фосфатом сольовому розчині (PBS) при 5 мкг/мл протягом 2 годин при 24 °C. Вторинне антитіло кози до антитіл миші, кон'юговане з біотином, інкубували при 24 °C протягом 32 хвилин при 0,5 мкг/мл. Імунозабарвлення проводили з використанням тетрагідрохлориду 3,3'-діамінобензидину (DAB) з набору хромогенної детекції DABMap™ (760-124, Ventana Medical Systems, Inc, USA) по рекомендаціях виробника. Стадію контрастного забарвлення проводили з використанням гематоксиліну (760-2037, Ventana Medical Systems, Inc, USA) і використовували реагент, що надає синє забарвлення (760-2037, Ventana Medical Systems, Inc, USA). Забарвлені стекла піддавали дегідратації і покривали цитосилом XYL (8312-4, Richard-Allan Scientific, USA).

ІНС-класифікація

- 20 Імунозабарвлені стекла сканували з використанням системи ScanScope XT (Aperio Technologies, Vista, CA). З використанням програмного забезпечення ImageScope (версія 10.2.2.2319, Aperio Technologies) одержували оцифровані зображення при збільшенні $\times 20$.

- 25 Оцінка забарвлення включала гістологічну реакційноздатну ділянку, основний тип реакційноздатних клітин, інтенсивність забарвлення і частоту забарвлення клітин. Негативні зразки класифікували як 0+. Позитивні зразки класифікували по шкалі інтенсивності від 1+ до 4+. Діапазони інтенсивностей описували як слабка [0; 2+], помірна [2+; 3+] і сильна [3+; 4+]. Частота забарвлення клітин являла собою відсоток імунозабарвлених клітин, і її визначав гістолог, спостерігаючи середнє для зразка. Частоту забарвлення клітин класифікували по 5 категоріях пропорційної шкали: 1 (0-5 %), 2 (6-25 %), 3 (26-50 %), 4 (51-75 %) і 5 (76-100 %).

Шкалу загальної експресії для пухлин адаптували зі шкали Оллреда (AS) (Mohsin S., Weiss H., Havighurst T., Clark G.M., Berardo M., Roanh L.D. et al. Progesterone receptor by immunohistochemistry and clinical outcome in breast cancer: a validation study. Mod. Pathol. 2004; 17:1545-1554). Цю AS одержували, додаючи інтенсивність і пропорційні шкали з одержанням загальної шкали в діапазоні 0-9. AS виражали у вигляді відсотка від максимуму на загальній шкалі і класифікували на 5 категорій: дуже низьке (0-25 %), слабке (26-50 %), помірне (51-75 %) і високе (76-100 %). Ступінь ураження визначали як відсоток від позитивних випадків для показання.

Описовий статистичний аналіз

Описову статистику розраховували з використанням програмного забезпечення Microsoft Excel 2003. Для кожного показання визначали кількість випадків, кількість позитивних випадків, ступінь ураження, середній показник інтенсивності, середню частоту, середній показник Оллреда, діапазон інтенсивності, діапазон частоти і діапазон показника Оллреда.

Приклад 8.1. Використання моноклонального антитіла до CEACAM5 для оцінки білка CEACAM5 у FFPE-пухлинах людини за допомогою імуногістохімії (IHC)

Досліджували велику панель пухлин людини з використанням комерційних стеклових панелей тканин (формат FFPE). Експресію білка CEACAM5 спостерігали в мембрані±цитоплазмі пухлинних клітин (фіг. 1C, D). У більш диференційованих пухлинах визначена частка забарвлення мембран поляризувалася на апікальному полюсі клітин. Виявлено, що білок CEACAM5 експресований у:

89 % випадків аденокарциноми товстого кишечника (194/219, інтенсивність 2-2,5+, частота 53-59 %, AS 60-66 %),

49 % випадків аденокарциноми шлунка (95/195, інтенсивність 2,5+, частота 53 %, AS 62 %),

41 % випадків аденокарциноми легень (24/58, інтенсивність 1,8-2+, частота 50-53 %, AS 54-58 %),

79 % випадків плоскоклітинної карциноми шийки матки (11/14, інтенсивність 2+, частота 22 %, AS 46 %),

53 % випадків аденокарциноми підшлункової залози (18/34, інтенсивність 2+, частота 23 %, AS 42 %),

37 % випадків плоскоклітинної карциноми стравоходу (23/62, інтенсивність 2+, частота 16 %, AS 38 %),

4 % випадків карциноми яєчника (3/77, інтенсивність 2+, частота 43 %, AS 54 %),

11 % випадків карциноми щитовидної залози (2/18, інтенсивність 1,5+, частота 63 %, AS 56 %),

25 % випадків карциноми сечового міхура (5/20, інтенсивність 1,5+, частота 61 %, AS 56 %),

7 % випадків аденокарциноми ендометрія (1/14, інтенсивність 2+, частота 50 %, AS 56 %),

11 % випадків карциноми проток молочної залози (2/18, інтенсивність 1,5+, частота 53 %, AS 50 %),

53 % випадків холангіокарциноми (2/6, інтенсивність 1,5+, частота 75 %, AS 50 %),

53 % випадків плоскоклітинної карциноми легень (31/148, інтенсивність 1,5+, частота 22 %, AS 39 %),

8 % випадків аденокарциноми передміхурової залози (1/13, інтенсивність 2+, частота 50 %, AS 44 %),

25 % випадків плоскоклітинної карциноми шкіри (2/8, інтенсивність 1,5+, частота 23 %, AS 39 %).

Приклад 8.2. Тканинна перехресна реактивність моноклонального антитіла до CEACAM5 у яванського макака (*Macaca fascicularis*) і порівняння з профілем експресії у людини

Позаклітинний домен, що походить з білка CEACAM5 людини (h) або яванського макака (c), одержували за допомогою транзитornoї експресії в клітинах ембріональної нирки людини HEK293 з використанням плазмиди з кДНК CEACAM5 (приклад 1, таблиця 1). Клітинні осадки фіксували в 10 % формаліні (Sigma Aldrich, USA) протягом 16 годин і занурювали в парафін у вигляді фрагмента тканини згідно зі стандартною гістологічною процедурою.

Як джерело нормальних тканин людини і мавпи використовували комерційну ТМА (таблиця 21).

Перехресну реактивність Mab2 демонстрували за допомогою імунозабарвлення трансфікованих CEACAM5 людини і мавпи клітин (з локалізацією в мембрані й у цитоплазмі).

У нормальних тканинах яванського макака експресія білка CEACAM5 виявлена в клітинах усмоктувального циліндричного епітелію (2/3 позитивних випадків, з середньою інтенсивністю 1,5+, з середньою частотою 55 %).

У непухлих тканинах людини експресію CEACAM5 також спостерігали в клітинах усмоктувального циліндричного епітелію (62/64 позитивних випадків, середня інтенсивність 2+, середня частота 90 %). У тканинах людини експресію CEACAM5 меншою мірою спостерігали в епітеліальних клітинах стравоходу, епітеліальних клітинах голови і шиї, епітеліальних клітинах шлункової ямки й епітеліальних клітин шийки матки.

Приклад 9. Кон'югат антитіла з лікарським засобом (варіант)

huMAb2-3 до CEACAM5-сульфо-SPDB-DM4

Аналітичні дані:

$M_w(\text{Ab})=147417$ г/моль; $M_w(\text{DM4})=780,38$ г/моль,

$\epsilon_{280\text{ нм}}(\text{Ab})=201400$; $\epsilon_{252\text{ нм}}(\text{Ab})=71451$,

$\epsilon_{280\text{ нм}}(\text{DM4})=5180$; $\epsilon_{252\text{ нм}}(\text{DM4})=26159$.

При перемішуванні, при КТ у посудину додавали 7,0 мл розчину huMAb2-3 до CEACAM5 (C=5,32 мг/мл у буфері PBS з pH=7,4) з наступним додаванням 1,6 мл DMA і 168,4 мкл розчину лінкера нітро-сульфо-SPDB (описаного в WO 2009134977) (10 екв. - 15 мМ розчин у DMA). Розчин повільно перемішували при КТ протягом 3 годин. Додавали додатковий об'єм 3,4 мкл розчину лінкера нітро-сульфо-SPDB (2,0 екв. - 15 мМ розчин у DMA). Через 2 години при КТ при перемішуванні на магнітній мішалці послідовно додавали 2,90 мл буфера PBS з pH=7,4, 0,407 мл DMA і 0,322 мл розчину DM4 (15 мМ розчин у DMA). Через 1 годину при КТ і 16 годин при 5 °C неочищену реакційну суміш очищали на знесолюючій колонці HiPrep 26/10 (Sephadex G25, GE Healthcare), попередньо витримували з 1 CV 1M NaOH, 2 CV води і 2 CV буфера з гістидину (10 мМ), гліцину (130 мМ), сахарози (5 %), pH=5,5. Кон'югат елюювали буфером з гістидину (10 мМ), гліцину (130 мМ), сахарози (5 %), pH=5,5, і фракції мономерних кон'югатів об'єднували і фільтрували на 0,22 мкм фільтрі.

Таким чином, одержували 19 мл кон'югата huMAb2-3 до CEACAM5-сульфо-SPDB-DM4 (c=1,51 мг/мл) у вигляді безбарвного прозорого розчину. Потім кон'югат аналізували на кінцеве навантаження лікарського засобу і чистоту мономерів: DAR (UV)=3,4; DAR (SEC)=3,3; чистота мономерів=99,8 %; дані HRMS: див. фіг. 20.

huMAb2-3 до CEACAM5-SMCC-DM1

Аналітичні дані:

$M_w(\text{Ab})=147417$ г/моль; $M_w(\text{DM1})=738$ г/моль,

$\epsilon_{280\text{ нм}}(\text{Ab})=201400$; $\epsilon_{252\text{ нм}}(\text{Ab})=71451$,

$\epsilon_{280\text{ нм}}(\text{DM1})=5180$; $\epsilon_{252\text{ нм}}(\text{DM1})=26159$.

При перемішуванні, при КТ у посудину додавали 11,3 мл розчину huMAb2-3 до CEACAM5 (C=3,47 мг/мл у буфері А з pH=6,5) з наступним додаванням 0,387 мл DMA і 178 мкл розчину лінкера SMCC (10 екв. - 15 мМ розчин у DMA). Розчин повільно перемішували при КТ протягом 2 годин. У неочищеній реакційній суміші заміняли буфер на знесолюючу колонку HiPrep 26/10 (Sephadex G25, GE Healthcare), попередньо витримували з 2 CV 0,2M NaOH, 5 CV води і 5 CV цитратного буфера (pH=5,5). Кон'югат елюювали цитратним буфером (pH=5,5) і фракції мономерних кон'югатів об'єднували і фільтрували на 0,22 мкм фільтрі. До одержаного розчину, при перемішуванні, при КТ послідовно додавали 0,476 мл DMA і 0,124 мл розчину DM1 (15 мМ розчин у DMA). Через 2 години при КТ неочищену реакційну суміш двічі очищали на знесолюючій колонці HiPrep 26/10 (Sephadex G25, GE Healthcare), попередньо витримували з 2CV NaOH 0,2M, 5 CV води і 5 CV буфера з гістидину (10 мМ), гліцину (130 мМ), сахарози (5 %), pH=5,5. Кон'югат елюювали буфером з гістидину (10 мМ), гліцину (130 мМ), сахарози (5 %), pH=5,5, і фракції мономерних кон'югатів об'єднували, фільтрували на 0,22 мкм фільтрі.

Таким чином, одержували 9,5 мл кон'югата huMAb2-3 до CEACAM5-SMCC-DM1 (c=1,73 мг/мл) у вигляді безбарвного прозорого розчину. Потім кон'югат аналізували на кінцеве навантаження лікарського засобу і чистоту мономерів: DAR (UV)=2,7; DAR (SEC)=2,9; чистота мономерів=99,6 %; дані HRMS: див. фіг. 21.

Приклад 10. Характеристика епітопа і паратопа CEACAM5-A3B3 у комплексі з Fab VH1aVL1c MAб2 з використанням заміни водень-дейтерій в асоціації з мас-спектрометрією (HDX MS)

Приклад 10.1. Принцип HDX MS

Заміна водень-дейтерій в амідах (HDX) в асоціації з мас-спектрометрією (MS) забезпечує ідентифікацію областей білків, які вважають такими, що беруть участь у конформаційних змінах або взаємодіях. Більш конкретно, цей спосіб забезпечує ідентифікацію областей антигену, що демонструють, після інкубації в дейтерованому буфері і протеолізу, зниження включення дейтерію в його формі, зв'язаній з антитілом, у порівнянні з його вільною формою.

Епітоп належить до тих областей, заміна в яких уповільнюється зв'язуванням з антитілом. У статті, що нещодавно вийшла, докладно описані різні стадії з характеристикою епітопів з

використанням цього підходу (Zhang Q., Willison L. N., Tripathi P., Sathe S.K., Roux K.H., Emmett M.R., Blakney G.T., Zhang H.M. & Marshall A.G. (2011). *Analytical Chemistry*, 83, 7129-7136.).

Приклад 10.2. Матеріали

Кодуючі варіабельні домени послідовності MAb2_VH1aVL1c (SEQ ID NO:5 і SEQ ID NO:29) клонували в експресуючий вектор ссавців у злитті з кодуючими послідовностями домену CH1 людини (як виявлено в одержаних з розщепленого папаїном IgG1 Fab) з наступною гексагістидиновою міткою або з константним доменом Скаппа людини, відповідно. Одержували партію Fab MAb2_VH1aVL1c у культивованих у суспензії клітинах HEK293-FS™ за допомогою транзитornoї трансфекції двома експресуючими плазмідами, кодуючими два ланцюги, у комплексі з 293fectin™ (Invitrogen). Через сім діб після трансфекції збирали супернатант культури, що містить секретований білок, центрифугували і фільтрували на 0,22 мкм мембрані. Fab очищали за допомогою афінної хроматографії на IMAC (HisTrap, GE Healthcare) з використанням градієнта імідазолу в PBS. Потім об'єднані фракції, що містять Fab, очищали ексклюзійною хроматографією (Superdex 200, GE Healthcare), зрівноваженою PBS.

Одержували мічений His домен A3-B3 hCEACAM5 (SEQ ID NO:67) з використанням культивованих у колбі клітин HEK293-FS™ за допомогою транзитornoї трансфекції експресуючої плазмід. Кожну добу додавали кіфунензин (інгібітор процесу, обумовленого розщепленням глікозилювання). Супернатант культури, що містить секретований білок, збирали через сім діб після трансфекції, центрифугували і фільтрували на 0,22 мкм мембрані. У супернатант додавали EndoH до 625 мк/мл, потім 3 години інкубували при 37 °C. Деглікозований hCEACAM5-A3B3 очищали афінною хроматографією на IMAC (HisTrap, GE Healthcare) з використанням градієнта імідазолу в PBS. Потім об'єднані фракції, що містять деглікозований hCEACAM5-A3B3, очищали ексклюзійною хроматографією (Superdex 200, GE Healthcare), зрівноваженою PBS. Мас-спектрометричний аналіз деглікозованого hCEACAM5-A3B3 продемонстрував дві молекули (22485 і 22278 Да), що вказує на те, що білок несе 7 або 8 залишків N-ацетилглюкозаміну (GlcNAc).

Для одержання комплексу, обидва білки об'єднували з надлишком у 1,5 моль деглікозованого hCEACAM5-A3B3 на один моль Fab. Цей надлишок видаляли ексклюзійною хроматографією на Superdex 200, зрівноваженою забуференим фосфатом сольовим розчином. Фракції, відповідні Fab з антигеном, використовували для дослідження обміну дейтерію.

Приклад 10.3. Методи

Експерименти обміну водню/дейтерію (HDX) були повністю автоматизовані з використанням автодозатора PAL (CTC Analytics). Він забезпечував старт і гасіння обміну, контроль температури протеолізу (4 °C), ін'єкцію дейтерованих пептидів, керування клапанами для ін'єкції і промивання і запуск збирання даних мас-спектрометром і насосів BEPX. Охолоджуваний за допомогою ефекту Пельтьє бокс (4 °C) містив два автоматичних клапани впуску (6-портовий для ін'єкції і 10-портовий для відмивання), знесолюючий картридж (пептидну мікропастку з Bruker-Michrom) і колонку BEPX (Poroshell 120 EC-C18, 1×50 мм, 2,7 мкм із Agilent Technologies). Дейтерування починали за допомогою 5-кратного розведення CEACAM5, mAb або комплексу PBS у D₂O. Для гасіння зворотного обміну і відновлення дисульфідних містків протягом 2 хв. при 4 °C використовували 2M GndHCl, 0,8M TCEP, 1M гліцин.

Білки розщеплювали протеазами пепсином і непентезином, і пептиди знесолювали з використанням насоса BEPX Agilent Technologies з TFA 0,03 % у воді при 100 мкл/хв. Потім пептиди розділяли з використанням іншого насоса BEPX Agilent Technologies у 15-100 % градієнті В у 20 хв. (А: TFA 0,03 % у воді; В: ацетонітрил 90 %, TFA 0,03 % у воді). Маси пептидів вимірювали з використанням мас-спектрометра з електророзпиленням-TOF (Agilent 6210).

Пептиди ідентифікували за допомогою тандемної МС (MCMC) з використанням Bruker APEX-Q FTMS (9,4 T) і Bruker 12 T Solarix.

Для одержання даних використовували програмне забезпечення Data Analysis (Bruker) і Mass Hunter (Agilent Technologies). Для обробки даних MCMC використовували Data Analysis і Mascot (Matrix Science). Для обробки даних HDX використовували програмне забезпечення Mass Hunter і HD Examiner (Sierra Analytics).

Експерименти HDX повторювали щонайменше три рази.

Приклад 10.4. Результати

Ідентифікація і відбір пептидів

При дейтеруванні дисульфідні містки залишали інтактними для збереження зв'язаної з ними структурної інформації. Для переваги протеолізу й ідентифікації пептидів містки відновлювали TCEP після стадії гасіння при низькому рН і низькій температурі. Використовуючи MCMC після розщеплення комплексу CEACAM5-Fab, було можливо ідентифікувати велику кількість пептидів, одержаних з цих трьох білкових ланцюгів. Після експериментів HDX вибирали тільки

- експерименти, що дають гарну якість сигналу: 25, 30 і 20 пептидів з антигену CEACAM5-A3-B3, важкого ланцюга Fab MAb2_VH1aVL1c і легкого ланцюга MAb2_VH1aVL1c, відповідно. Ці пептиди перекривають 89 %, 77 % і 68 % послідовностей антигену CEACAM5-A3-B3, важкого ланцюга Fab MAb2_VH1aVL1c і легкого ланцюга MAb2_VH1aVL1c, відповідно (таблиця 25).
- 5 Неперекриті області ланцюгів Fab в основному знаходилися в їх C-кінцевих частинах.

Таблиця 25

Перекриття послідовностей дейтерованими пептидами

Пептиди	Перекриття послідовностей
CEACAM5-A3-B3	1-18; 1-22; 1-23; 1-19; 23-35; 36-51; 35-49; 50-70; 36-43; 44-51; 36-51; 36-49; 50-67; 37-49; 44-49; 59-67; 71-89; 93-107; 108-115; 128-143; 128-142; 143-157; 130-143; 130-142; 140-143; 163-186
Важкий ланцюг Fab MAb2_VH1aVL1c	1-6; 1-20; 1-19; 1-17; 1-18; 4-18; 5-20; 5-18; 24-29; 27-32; 27-29; 34-46; 47-68; 48-68; 50-68; 69-86; 84-93; 88-98; 92-104; 100-109; 110-115; 116-136; 111-128; 149-158; 151-158; 159-177; 162-177; 167-177; 187-206
Легкий ланцюг MAb2_VH1aVL1c	1-11; 5-11; 22-46; 47-54; 55-70; 55-71; 72-82; 87-104; 105-115; 117-132; 124-131; 127-145; 133-144; 136-145; 136-143; 136-144; 143-161; 144-151; 146-151

- Усі 8 залишків аспарагіну, що є потенційними ділянками глікозилювання, були ідентифіковані в декількох пептидах з GlcNAc, що залишився після ендо-Н-деглікозилювання. Зокрема, N114 виявлений у пептиді 108-115. У перших експериментах (не використовувалися для HDX), N166 виявлений в обох формах (з GlcNAc і без GlcNAc). Це може пояснювати гетерогенність, що спостерігається при мас-спектрометрії CEACAM5-A3B3 після деглікозилювання, що відповідає 7 і 8 GlcNAc.

Ідентифікація епітопа і паратопа

- 15 Вільний антиген, вільний Fab і їх комплекс піддавали дейтеруванню протягом 2 хв. або 20 хв. при 4 °C або 20 хв. при кімнатній температурі (26 °C). Враховуючи залежність кінетики обміну атомів водню амідів від температури (приблизно 3-кратне зростання обміну зі збільшенням на 10 °C), остання умова еквівалентна 200 хв. дейтерування при 4 °C.

Епітоп

- 20 Порівнювали кінетику включення дейтерію у 25 відібраних пептидів CEACAM5-A3B3, коли антиген був дейтерований у вільній формі і коли він знаходився в комплексі з Fab. Декілька пептидів не продемонстрували якої-небудь значимої відмінності в HDX (ΔHDX) в обох станах. На відміну від цього деякі з них (108-115 і 128-143) продемонстрували значиму ΔHDX. Другу область перекривали 5 різних пептидів: 128-142, 128-143, 130-142, 130-143 і 140-143, що демонструють через 2 хв. дейтерування ΔHDX 13-15±2 % (до 1,6±0,2 D).

- 25 Порівнюючи 128-142 з 130-142 і 128-143 з 130-143, автори в кожному випадку не знайшли якого-небудь значимої зміни ΔHDX (1,3-1,4 D для перших двох пептидів і 1,6 для останніх двох через 2 хвилини дейтерування), що означає, що амід W129 і R130, імовірно, не входять у епітоп. На відміну від цього, при порівнянні 128-142 з 128-143 і 130-142 з 130-143, автори знайшли невелику зміну ΔHDX (приблизно 0,2 D), що означає, що амід F143 є залученим. ΔHDX у пептиді 140-143 (приблизно 0,3 D) означає, що амід V141 або L142 також можуть бути залученими. З 9 амідів від I131 до Q140, деякі з них залучені в епітоп (у середньому приблизно розділяли 1 ΔHDX).

- 35 Ці відмінності у включенні дейтерію вказують на те, що епітоп знаходиться в конкретних областях (амідах), тобто в пептидах з послідовностями SGANLNL (SEQ ID NO:76) і INGIPQQHTQVLF (SEQ ID NO:77).

Паратоп

- 40 Кінетику включення дейтерію у 30 відібраних пептидів важкого ланцюга Fab порівнювали, коли Fab був дейтерований у вільній формі і коли він знаходився в комплексі з антигеном. Майже всі пептиди не демонстрували яких-небудь значимих ΔHDX в обох станах. Тільки один пептид (100-109) через 200 хв. дейтерування демонстрував ΔHDX: 11±2 % (0,7±0,2 D). Область (аміди) 101-109 важкого ланцюга Fab MAb2_VH1aVL1c залучена в паратоп.

- 45 Кінетику включення дейтерію для 20 відібраних пептидів легкого ланцюга Fab порівнювали, коли Fab був дейтерований у вільній формі і коли він знаходився в комплексі з антигеном. Майже всі пептиди не демонстрували яких-небудь значимих ΔHDX в обох станах. Тільки два пептиди (47-54 і 87-104) демонстрували відмінності. Через 20 хв. дейтерування воно складало

10±2 % (0,6±0,2 D) для першого пептиду і 5±2 % (0,9±0,2 D) для другого пептиду, відповідно. Області 48-54 і 88-104 легкого ланцюга MAb2_VH1aVL1с залучені в паратоп.

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

- 5
- <110> SANOFI
- <120> АНТИТІЛА до СЕАСАМ5 І ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ
- 10
- <130> FR2012/065
- <150> EP12306444
- <151> 2012-11-20
- 15
- <160> 90
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- 20
- <211> 8
- <212> БІЛОК
- <213> Штучна послідовність
- <220>
- 25
- <223> КОДУЮЧА ПОСЛІДОВНІСТЬ
- <400> 1
- Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
- 30 1 5
- <210> 2
- <211> 8
- 35
- <212> БІЛОК
- <213> Штучна послідовність
- <220>
- <223> КОДУЮЧА ПОСЛІДОВНІСТЬ
- 40
- <400> 2
- Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Ile
- 45 1 5
- <210> 3
- <211> 13
- <212> БІЛОК
- 50
- <213> Штучна послідовність
- <220>
- <223> КОДУЮЧА ПОСЛІДОВНІСТЬ
- 55
- <400> 3
- Ala Arg Pro Ala Tyr Tyr Gly Asn Pro Ala Met Asp Tyr
- 1 5 10
- 60
- <210> 4

<211> 6
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 5 <220>
 <223> КОДУЮЧА ПОСЛІДОВНІСТЬ
 <400> 4
 10 Gln Asn Val Gly Thr Asn
 1 5
 <210> 5
 15 <211> 120
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 20 <223> VH1a гуманізованого антитіла MAb2
 <400> 5
 25 Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Val Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 30 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Arg Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 35 Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ile Thr Tyr Ala Pro Ser Thr Val
 50 55 60
 40 Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 45 85 90 95
 Ala Ala His Tyr Phe Gly Ser Ser Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 50 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 55 <210> 6
 <211> 10
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 60 <220>

<223> КОДУЮЧА ПОСЛІДОВНІСТЬ

<400> 6

5 Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Tyr Thr
1 5 10

<210> 7
10 <211> 8
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

<220>
15 <223> КОДУЮЧА ПОСЛІДОВНІСТЬ

<400> 7

20 Gly Phe Val Phe Ser Ser Tyr Asp
1 5

<210> 8
<211> 8
25 <212> БІЛОК
<213> Штучний

<220>
30 <223> КОДУЮЧА ПОСЛІДОВНІСТЬ

<400> 8

Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ile Thr
1 5

35

<210> 9
<211> 13
40 <212> БІЛОК
<213> Штучний

<220>
<223> КОДУЮЧА ПОСЛІДОВНІСТЬ

45 <400> 9

Ala Ala His Tyr Phe Gly Ser Ser Gly Pro Phe Ala Tyr
1 5 10

50 <210> 10
<211> 6
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

55 <220>
<223> КОДУЮЧА ПОСЛІДОВНІСТЬ

<400> 10

60 Glu Asn Ile Phe Ser Tyr
1 5

<210> 11
 <211> 526
 <212> BIJOK
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 11

 Met Gly His Leu Ser Ala Pro Leu His Arg Val Arg Val Pro Trp Gln
 1 5 10 15
 10
 Gly Leu Leu Leu Thr Ala Ser Leu Leu Thr Phe Trp Asn Pro Pro Thr
 20 25 30
 15
 Thr Ala Gln Leu Thr Thr Glu Ser Met Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly
 35 40 45
 20
 Lys Glu Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln Gln Leu Phe Gly
 50 55 60
 25
 Tyr Ser Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Val
 65 70 75 80
 30
 Gly Tyr Ala Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Asn Ser
 85 90 95
 35
 Gly Arg Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val
 100 105 110
 40
 Thr Gln Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu Gln Val Ile Lys Ser Asp
 115 120 125
 45
 Leu Val Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe His Val Tyr Pro Glu Leu
 130 135 140
 50
 Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Lys
 145 150 155 160
 55
 Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr Thr Tyr
 165 170 175
 60
 Leu Trp Trp Ile Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln
 180 185 190
 65
 Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr Arg Asn
 195 200 205
 70
 Asp Thr Gly Pro Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Val Ser Ala Asn
 210 215 220

UA 120247 C2

	Arg	Ser	Asp	Pro	Val	Thr	Leu	Asn	Val	Thr	Tyr	Gly	Pro	Asp	Thr	Pro	225	230	235	240
5	Thr	Ile	Ser	Pro	Ser	Asp	Thr	Tyr	Tyr	Arg	Pro	Gly	Ala	Asn	Leu	Ser	245	250	255	
10	Leu	Ser	Cys	Tyr	Ala	Ala	Ser	Asn	Pro	Pro	Ala	Gln	Tyr	Ser	Trp	Leu	260	265	270	
15	Ile	Asn	Gly	Thr	Phe	Gln	Gln	Ser	Thr	Gln	Glu	Leu	Phe	Ile	Pro	Asn	275	280	285	
	Ile	Thr	Val	Asn	Asn	Ser	Gly	Ser	Tyr	Thr	Cys	His	Ala	Asn	Asn	Ser	290	295	300	
20	Val	Thr	Gly	Cys	Asn	Arg	Thr	Thr	Val	Lys	Thr	Ile	Ile	Val	Thr	Glu	305	310	315	320
25	Leu	Ser	Pro	Val	Val	Ala	Lys	Pro	Gln	Ile	Lys	Ala	Ser	Lys	Thr	Thr	325	330	335	
30	Val	Thr	Gly	Asp	Lys	Asp	Ser	Val	Asn	Leu	Thr	Cys	Ser	Thr	Asn	Asp	340	345	350	
35	Thr	Gly	Ile	Ser	Ile	Arg	Trp	Phe	Phe	Lys	Asn	Gln	Ser	Leu	Pro	Ser	355	360	365	
	Ser	Glu	Arg	Met	Lys	Leu	Ser	Gln	Gly	Asn	Thr	Thr	Leu	Ser	Ile	Asn	370	375	380	
40	Pro	Val	Lys	Arg	Glu	Asp	Ala	Gly	Thr	Tyr	Trp	Cys	Glu	Val	Phe	Asn	385	390	395	400
45	Pro	Ile	Ser	Lys	Asn	Gln	Ser	Asp	Pro	Ile	Met	Leu	Asn	Val	Asn	Tyr	405	410	415	
50	Asn	Ala	Leu	Pro	Gln	Glu	Asn	Gly	Leu	Ser	Pro	Gly	Ala	Ile	Ala	Gly	420	425	430	
55	Ile	Val	Ile	Gly	Val	Val	Ala	Leu	Val	Ala	Leu	Ile	Ala	Val	Ala	Leu	435	440	445	
	Ala	Cys	Phe	Leu	His	Phe	Gly	Lys	Thr	Gly	Arg	Ala	Ser	Asp	Gln	Arg	450	455	460	
60	Asp	Leu	Thr	Glu	His	Lys	Pro	Ser	Val	Ser	Asn	His	Thr	Gln	Asp	His	465	470	475	480

	Ser	Asn	Asp	Pro	Pro	Asn	Lys	Met	Asn	Glu	Val	Thr	Tyr	Ser	Thr	Leu
					485					490					495	
5	Asn	Phe	Glu	Ala	Gln	Gln	Pro	Thr	Gln	Pro	Thr	Ser	Ala	Ser	Pro	Ser
				500					505					510		
10	Leu	Thr	Ala	Thr	Glu	Ile	Ile	Tyr	Ser	Glu	Val	Lys	Lys	Gln		
			515					520					525			
15	<210> 12 <211> 9 <212> БІЛОК <213> Штучна послідовність															
20	<220> <223> КОДУЮЧА ПОСЛІДОВНІСТЬ <400> 12															
25	Gln	His	His	Tyr	Gly	Thr	Pro	Phe	Thr							
	1				5											
30	<210> 13 <211> 8 <212> БІЛОК <213> Штучна послідовність															
35	<220> <223> КОДУЮЧА ПОСЛІДОВНІСТЬ <400> 13															
40	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Arg	Tyr	Ala								
	1				5											
45	<210> 14 <211> 7 <212> БІЛОК <213> Штучна послідовність															
50	<220> <223> КОДУЮЧА ПОСЛІДОВНІСТЬ <400> 14															
	Ile	Ser	Ser	Gly	Gly	Asp	Thr									
	1				5											
55	<210> 15 <211> 13 <212> БІЛОК <213> Штучна послідовність															
60	<220> <223> КОДУЮЧА ПОСЛІДОВНІСТЬ															

<400> 15

Ala Arg Val Asn Tyr Tyr Asp Ser Ser Phe Leu Asp Trp
1 5 10

5

<210> 16
<211> 6
<212> БІЛОК
10 <213> Штучна послідовність

<220>
<223> КОДУЮЧА ПОСЛІДОВНІСТЬ

15 <400> 16

Gln Asn Val Gly Thr Asn
1 5

20

<210> 17
<211> 107
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

25

<220>
<223> VL1 гуманізованого антитіла MAb2

<400> 17

30

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

35 Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Phe Ser Tyr
20 25 30

40 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Val
35 40 45

Tyr Asn Thr Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

45

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

50

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Phe
85 90 95

55 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

60

<210> 18
<211> 10
<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> КОДУЮЧА ПОСЛІДОВНІСТЬ
 5 <400> 18
 Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu Tyr Thr
 1 5 10
 10
 <210> 19
 <211> 8
 <212> БІЛОК
 15 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> КОДУЮЧА ПОСЛІДОВНІСТЬ
 20 <400> 19
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Asp
 1 5
 25
 <210> 20
 <211> 8
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 30
 <220>
 <223> фрагмент антитіла
 <400> 20
 35
 Ile Ser Ser Tyr Gly Gly Arg Thr
 1 5
 40
 <210> 21
 <211> 13
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 45
 <220>
 <223> КОДУЮЧА ПОСЛІДОВНІСТЬ
 <400> 21
 50 Ala Ala His Tyr Phe Gly Thr Ser Gly Pro Phe Ala Tyr
 1 5 10
 55
 <210> 22
 <211> 6
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 60 <223> КОДУЮЧА ПОСЛІДОВНІСТЬ

<400> 22

Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr
1 5

5

<210> 23
<211> 107
<212> БІЛОК
10 <213> Штучна послідовність

<220>
<223> VL1a гуманізованого антитіла MAb2

15 <400> 23

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

20 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Phe Ser Tyr
20 25 30

25 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Val
35 40 45

30 Tyr Asn Thr Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

35 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Phe
85 90 95

40 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

45 <210> 24
<211> 9
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

50 <220>
<223> КОДУЮЧА ПОСЛІДОВНІСТЬ

<400> 24

55 Gln His His Tyr Gly Ile Pro Phe Thr
1 5

60 <210> 25
<211> 8
<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> КОДУЮЧА ПОСЛІДОВНІСТЬ
 5 <400> 25
 Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr Asp
 1 5
 10
 <210> 26
 <211> 8
 <212> БІЛОК
 15 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> КОДУЮЧА ПОСЛІДОВНІСТЬ
 20 <400> 26
 Ile Asn Ser Gly Gly Gly Ile Thr
 1 5
 25
 <210> 27
 <211> 13
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 30
 <220>
 <223> КОДУЮЧА ПОСЛІДОВНІСТЬ
 <400> 27
 35 Thr Ala His Tyr Phe Gly Ser Ser Gly Pro Phe Ala Tyr
 1 5 10
 40 <210> 28
 <211> 6
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 45 <220>
 <223> КОДУЮЧА ПОСЛІДОВНІСТЬ
 <400> 28
 50 Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr
 1 5
 <210> 29
 <211> 107
 55 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> VL1c гуманізованого антитіла MAb2
 60 <400> 29

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 5 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Phe Ser Tyr
 20 25 30
 10 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Val
 35 40 45
 15 Tyr Asn Thr Arg Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 20 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Phe
 85 90 95
 25 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105
 30 <210> 30
 <211> 9
 <212> БІЛОК
 <213> Штучний
 35 <220>
 <223> КОДУЮЧА ПОСЛІДОВНІСТЬ
 <400> 30
 40 Gln His His Tyr Gly Thr Pro Phe Thr
 1 5
 45 <210> 31
 <211> 120
 <212> БІЛОК
 <213> Штучний
 <220>
 <223> фрагмент антитіла
 50 <400> 31
 55 Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 60 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

UA 120247 C2

	Ala	Thr	Ile	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ile	Tyr	Tyr	Leu	Asp	Ser	Val	
	50						55					60					
5	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	
	65					70					75					80	
10	Leu	Gln	Met	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	
					85					90					95		
15	Ala	Arg	Pro	Ala	Tyr	Tyr	Gly	Asn	Pro	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	
				100					105						110		
20	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
			115				120										
	<210>	32															
	<211>	108															
	<212>	БІЛОК															
	<213>	Штучний															
25	<220>																
	<223>	фрагмент антитіла															
	<400>	32															
30	Asp	Ile	Leu	Met	Thr	Gln	Ser	Gln	Lys	Phe	Met	Ser	Thr	Ser	Val	Gly	
	1				5					10					15		
35	Asp	Arg	Val	Ser	Val	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asn	Val	Gly	Thr	Asn	
				20					25					30			
40	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Pro	Leu	Ile	
			35					40					45				
45	Tyr	Ser	Ala	Ser	Tyr	Arg	Tyr	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly	
	50						55					60					
50	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Asn	Val	Gln	Ser	
	65					70					75					80	
55	Glu	Asp	Leu	Ala	Glu	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asn	Ser	Tyr	Pro	Leu	
					85					90					95		
60	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys					
				100					105								
	<210>	33															
	<211>	120															
	<212>	БІЛОК															

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> фрагмент антитіла

5

<400> 33

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Val Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Val Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

15

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

20

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ile Thr Tyr Phe Pro Asp Thr Val
50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
25 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
30 85 90 95

Ala Ala His Tyr Phe Gly Ser Ser Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

35

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

40

<210> 34

<211> 107

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

45

<220>

<223> фрагмент антитіла

<400> 34

50

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Phe Ser Tyr
55 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
35 40 45

60

UA 120247 C2

Tyr Asn Thr Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

5 Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

10 Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Phe
 85 90 95

15 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 35
 <211> 119
 <212> БІЛОК
 20 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> фрагмент антитіла

25 <400> 35

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

30 Ser Leu Thr Leu Pro Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30

35 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

40 Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 50 55 60

45 Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Phe Leu
 65 70 75 80

Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Met Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

50 Arg Val Asn Tyr Tyr Asp Ser Ser Phe Leu Asp Trp Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

55 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 36
 60 <211> 108
 <212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> фрагмент антитіла

5

<400> 36

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Arg Phe Met Ser Thr Leu Glu Gly
1 5 10 15

10

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
20 25 30

15

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
35 40 45

20

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

25

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
65 70 75 80

30

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu
85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

35

<210> 37

<211> 120

<212> БІЛОК

<213> Штучна послідовність

40

<220>

<223> фрагмент антитіла

<400> 37

45

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

50

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

55

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

60

Ala Phe Ile Ser Ser Tyr Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

UA 120247 C2

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

5 Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Phe Tyr Cys
 85 90 95

10 Ala Ala His Tyr Phe Gly Thr Ser Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

15 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

20 <210> 38
 <211> 107
 <212> БІЛОК
 <213> Штучний

25 <220>
 <223> фрагмент антитіла

30 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

35 Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr
 20 25 30

40 Phe Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
 35 40 45

45 Tyr Asn Ala Lys Ile Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

50 Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

55 Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Ile Pro Phe
 85 90 95

60 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105

65 <210> 39
 <211> 120
 <212> БІЛОК
 <213> Штучний

70 <220>
 <223> фрагмент антитіла

<400> 39

5 Glu Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 10 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

 15 Thr Tyr Ile Asn Ser Gly Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
 50 55 60

 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Thr Leu Tyr
 20 65 70 75 80

 Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 25 Thr Ala His Tyr Phe Gly Ser Ser Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

 30 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

 35 <210> 40
 <211> 107
 <212> БІЛОК
 <213> Штучний

 40 <220>
 <223> фрагмент антитіла

 <400> 40

 45 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

 Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr
 50 20 25 30

 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
 35 40 45
 55 Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Thr Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

 60 Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

UA 120247 C2

	Glu	Asp	Phe	Gly	Ser	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	His	Tyr	Gly	Thr	Pro	Phe	
					85					90					95		
5	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys						
				100					105								
	<210>	41															
10	<211>	449															
	<212>	БІЛОК															
	<213>	Штучний															
	<220>																
15	<223>	фрагмент антитіла															
	<400>	41															
20	Glu	Val	Met	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly	
	1				5					10					15		
	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	
25				20					25					30			
	Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Thr	Pro	Glu	Lys	Arg	Leu	Glu	Trp	Val	
			35					40					45				
30	Ala	Thr	Ile	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ile	Tyr	Tyr	Leu	Asp	Ser	Val	
		50					55					60					
35	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	
	65					70					75					80	
	Leu	Gln	Met	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	
40					85					90					95		
	Ala	Arg	Pro	Ala	Tyr	Tyr	Gly	Asn	Pro	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	
45				100					105					110			
	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	
			115					120					125				
50	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	
		130					135					140					
55	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	
	145					150					155					160	
	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	
60					165					170					175		

UA 120247 C2

	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	
				180					185					190			
5	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	
			195					200					205				
10	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	
		210					215					220					
15	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	
	225					230					235					240	
20	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	
				245						250					255		
25	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	
				260					265					270			
30	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
			275					280					285				
35	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	
		290					295					300					
40	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	
	305					310					315					320	
45	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	
					325					330					335		
50	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	
				340					345					350			
55	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	
			355					360					365				
60	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	
		370					375					380					
65	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	
	385					390					395					400	
70	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	
					405					410					415		
75	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	
				420					425					430			

UA 120247 C2

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

5 Gly

10 <210> 42
<211> 215
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

15 <220>
<223> фрагмент антитіла

<400> 42

20 Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

25 Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Pro Leu Ile
35 40 45

30 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

35 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
65 70 75 80

40 Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

45 Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

50 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

55 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

60 Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

UA 120247 C2

	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	
				180					185					190			
5	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	
			195					200					205				
10	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys										
		210					215										
15	<210>	43															
	<211>	449															
	<212>	БІЛОК															
	<213>	ШТУЧНИЙ															
20	<220>																
	<223>	фрагмент антитіла															
	<400>	43															
25	Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Gly	Val	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly	
	1				5					10					15		
30	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Val	Phe	Ser	Ser	Tyr	
				20					25					30			
35	Asp	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Thr	Pro	Glu	Lys	Arg	Leu	Glu	Trp	Val	
			35					40					45				
40	Ala	Tyr	Ile	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Ile	Thr	Tyr	Phe	Pro	Asp	Thr	Val	
		50					55					60					
45	Gln	Gly	Arg	Phe	Thr	Val	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	
	65					70				75					80		
50	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90						95		
55	Ala	Ala	His	Tyr	Phe	Gly	Ser	Ser	Gly	Pro	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	
				100					105					110			
60	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	
			115					120					125				
65	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	
		130					135					140					
70	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	
	145					150					155					160	

UA 120247 C2

	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	
					165					170					175		
5	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	
				180					185					190			
10	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	
			195					200					205				
15	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	
		210					215					220					
20	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	
	225					230					235					240	
25	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	
					245					250					255		
30	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	
				260					265					270			
35	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
			275					280					285				
40	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	
		290					295					300					
45	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	
	305					310					315					320	
50	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	
					325					330					335		
55	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	
				340					345					350			
60	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	
			355					360					365				
65	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	
		370					375					380					
70	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	
	385					390					395					400	
75	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	
					405					410					415		

UA 120247 C2

	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	
				420					425					430			
5	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	
			435					440					445				
10	Gly																
	<210> 44																
	<211> 214																
15	<212> БІЛОК																
	<213> Штучна послідовність																
	<220>																
20	<223> фрагмент антитіла																
	<400> 44																
25	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	
	1				5					10					15		
30	Glu	Thr	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Asn	Ile	Phe	Ser	Tyr	
				20					25					30			
35	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Gln	Gly	Lys	Ser	Pro	Gln	Leu	Leu	Val	
			35					40					45				
40	Tyr	Asn	Thr	Lys	Thr	Leu	Ala	Glu	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	
		50					55					60					
45	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Gln	Phe	Ser	Leu	Lys	Ile	Asn	Ser	Leu	Gln	Pro	
	65					70					75				80		
50	Glu	Asp	Phe	Gly	Ser	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	His	Tyr	Gly	Thr	Pro	Phe	
					85					90					95		
55	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	
				100					105					110			
60	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	
			115					120					125				
65	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	
		130					135					140					
70	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	
	145					150					155					160	

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

5 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

10 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

15

<210> 45
<211> 448
<212> БІЛОК
20 <213> Штучна послідовність

<220>
<223> фрагмент антитіла

25 <400> 45

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

30 Ser Leu Thr Leu Pro Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

35 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

40 Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Phe Leu
65 70 75 80

45

Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Gly Met Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

50 Arg Val Asn Tyr Tyr Asp Ser Ser Phe Leu Asp Trp Trp Gly Gln Gly
100 105 110

55 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

60 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

UA 120247 C2

	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	145	150	155	160
5	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	165	170	175	
10	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	180	185	190	
15	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	195	200	205	
20	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	210	215	220	
25	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	225	230	235	240
30	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	245	250	255	
35	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	260	265	270	
40	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	275	280	285	
45	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	290	295	300	
50	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	305	310	315	320
55	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	325	330	335	
60	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	340	345	350	
	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	355	360	365	
	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	370	375	380	
	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	385	390	395	400

UA 120247 C2

	Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys	405	410	415
5	Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu	420	425	430
10	Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly	435	440	445
15	<210> 46 <211> 215 <212> БІЛОК <213> ШТУЧНИЙ			
20	<220> <223> фрагмент антитіла <400> 46			
25	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Arg Phe Met Ser Thr Leu Glu Gly	1	5	10
30	Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn	20	25	30
35	Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile	35	40	45
40	Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly	50	55	60
45	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser	65	70	75
50	Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Leu	85	90	95
55	Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala	100	105	110
60	Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser	115	120	125
	Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu	130	135	140
	Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser	145	150	155
				160

UA 120247 C2

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

5 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

10 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

15 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 47
<211> 449
<212> БІЛОК
20 <213> Штучний

<220>
<223> фрагмент антитіла

25 <400> 47

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

30 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

35 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

40 Ala Phe Ile Ser Ser Tyr Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

45 Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Phe Tyr Cys
85 90 95

50 Ala Ala His Tyr Phe Gly Thr Ser Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

55 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

60 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

UA 120247 C2

	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	145	150	155	160
5	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	165	170	175	
10	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	180	185	190	
15	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	195	200	205	
20	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	210	215	220	
	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	225	230	235	240
25	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	245	250	255	
30	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	260	265	270	
35	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	275	280	285	
40	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	290	295	300	
	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	305	310	315	320
45	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	325	330	335	
50	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	340	345	350	
55	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	355	360	365	
	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	370	375	380	
60	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	385	390	395	400

UA 120247 C2

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

5 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

10 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly

15

<210> 48
 <211> 214
 <212> БІЛОК
 20 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> фрагмент антитіла

25 <400> 48

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

30 Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr
 20 25 30

35 Phe Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
 35 40 45

40 Tyr Asn Ala Lys Ile Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

45 Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Ile Pro Phe
 85 90 95

50 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

55 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

60 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

UA 120247 C2

	Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln	
	145	150 155 160
5	Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser	
		165 170 175
10	Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr	
		180 185 190
15	Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser	
		195 200 205
20	Phe Asn Arg Gly Glu Cys	
		210
25	<210> 49	
	<211> 449	
	<212> БІЛОК	
	<213> Штучна послідовність	
30	<220>	
	<223> фрагмент антитіла	
	<400> 49	
35	Glu Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Leu Val Lys Pro Gly Gly	
	1	5 10 15
40	Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr	
		20 25 30
45	Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val	
		35 40 45
50	Thr Tyr Ile Asn Ser Gly Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val	
		50 55 60
55	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Thr Leu Tyr	
		65 70 75 80
60	Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys	
		85 90 95
65	Thr Ala His Tyr Phe Gly Ser Ser Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln	
		100 105 110
70	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val	
		115 120 125

UA 120247 C2

	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	
	130						135					140					
5	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	
	145					150					155					160	
10	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	
					165					170					175		
15	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	
				180					185					190			
20	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	
			195					200					205				
25	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	
		210					215					220					
30	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	
	225					230					235					240	
35	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	
					245					250					255		
40	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	
				260					265					270			
45	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
		275						280					285				
50	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	
	290						295					300					
55	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	
	305					310					315					320	
60	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	
					325					330					335		
65	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	
				340					345					350			
70	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	
			355					360					365				
75	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	
	370						375					380					

UA 120247 C2

	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	
	385					390					395					400	
5	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	
					405					410					415		
10	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	
				420					425					430			
15	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	
			435					440					445				
	Gly																
20	<210>	50															
	<211>	214															
	<212>	БІЛОК															
	<213>	Штучний															
25	<220>																
	<223>	фрагмент	антитіла														
	<400>	50															
30	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	
	1				5					10					15		
35	Glu	Thr	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Asn	Ile	Tyr	Ser	Tyr	
				20					25					30			
40	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Gln	Gly	Lys	Ser	Pro	Gln	Leu	Leu	Val	
			35					40					45				
45	Tyr	Asn	Ala	Lys	Thr	Leu	Thr	Glu	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	
	50						55					60					
50	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Gln	Phe	Ser	Leu	Lys	Ile	Asn	Ser	Leu	Gln	Pro	
	65				70						75				80		
55	Glu	Asp	Phe	Gly	Ser	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	His	Tyr	Gly	Thr	Pro	Phe	
					85					90					95		
60	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	
				100					105					110			
65	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	
			115					120					125				

UA 120247 C2

	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	
	130						135					140					
5	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	
	145					150					155					160	
10	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	
					165					170					175		
15	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	
				180					185					190			
20	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	
			195					200					205				
25	<210> 51																
	<211> 120																
	<212> БІЛОК																
	<213> Штучна послідовність																
30	<220>																
	<223> фрагмент антитіла																
	<400> 51																
35	Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly	
	1				5					10					15		
40	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Val	Phe	Ser	Ser	Tyr	
				20					25					30			
45	Asp	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Thr	Pro	Glu	Arg	Arg	Leu	Glu	Trp	Val	
			35					40					45				
50	Ala	Tyr	Ile	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Ile	Thr	Tyr	Phe	Pro	Ser	Thr	Val	
	50						55					60					
55	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Val	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	
	65					70					75					80	
60	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	
				85						90					95		
65	Ala	Ala	His	Tyr	Phe	Gly	Ser	Ser	Gly	Pro	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	
				100					105					110			

	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala								
			115					120								
5	<210>	52														
	<211>	702														
	<212>	БИЛОК														
	<213>	Homo sapiens														
10	<400>	52														
	Met	Glu	Ser	Pro	Ser	Ala	Pro	Pro	His	Arg	Trp	Cys	Ile	Pro	Trp	Gln
	1				5					10					15	
15																
	Arg	Leu	Leu	Leu	Thr	Ala	Ser	Leu	Leu	Thr	Phe	Trp	Asn	Pro	Pro	Thr
				20					25					30		
20																
	Thr	Ala	Lys	Leu	Thr	Ile	Glu	Ser	Thr	Pro	Phe	Asn	Val	Ala	Glu	Gly
			35					40					45			
25																
	Lys	Glu	Val	Leu	Leu	Leu	Val	His	Asn	Leu	Pro	Gln	His	Leu	Phe	Gly
		50					55					60				
30																
	Tyr	Ser	Trp	Tyr	Lys	Gly	Glu	Arg	Val	Asp	Gly	Asn	Arg	Gln	Ile	Ile
	65					70					75					80
35																
	Gly	Tyr	Val	Ile	Gly	Thr	Gln	Gln	Ala	Thr	Pro	Gly	Pro	Ala	Tyr	Ser
					85					90					95	
40																
	Gly	Arg	Glu	Ile	Ile	Tyr	Pro	Asn	Ala	Ser	Leu	Leu	Ile	Gln	Asn	Ile
				100					105					110		
45																
	Ile	Gln	Asn	Asp	Thr	Gly	Phe	Tyr	Thr	Leu	His	Val	Ile	Lys	Ser	Asp
			115					120					125			
50																
	Leu	Val	Asn	Glu	Glu	Ala	Thr	Gly	Gln	Phe	Arg	Val	Tyr	Pro	Glu	Leu
		130					135				140					
55																
	Pro	Lys	Pro	Ser	Ile	Ser	Ser	Asn	Asn	Ser	Lys	Pro	Val	Glu	Asp	Lys
	145					150					155					160
60																
	Asp	Ala	Val	Ala	Phe	Thr	Cys	Glu	Pro	Glu	Thr	Gln	Asp	Ala	Thr	Tyr
					165					170					175	
65																
	Leu	Trp	Trp	Val	Asn	Asn	Gln	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Pro	Arg	Leu	Gln
				180					185					190		
70																
	Leu	Ser	Asn	Gly	Asn	Arg	Thr	Leu	Thr	Leu	Phe	Asn	Val	Thr	Arg	Asn
			195					200					205			

UA 120247 C2

	Asp	Thr	Ala	Ser	Tyr	Lys	Cys	Glu	Thr	Gln	Asn	Pro	Val	Ser	Ala	Arg	
	210						215					220					
5	Arg	Ser	Asp	Ser	Val	Ile	Leu	Asn	Val	Leu	Tyr	Gly	Pro	Asp	Ala	Pro	
	225					230					235					240	
10	Thr	Ile	Ser	Pro	Leu	Asn	Thr	Ser	Tyr	Arg	Ser	Gly	Glu	Asn	Leu	Asn	
					245					250					255		
15	Leu	Ser	Cys	His	Ala	Ala	Ser	Asn	Pro	Pro	Ala	Gln	Tyr	Ser	Trp	Phe	
				260					265					270			
20	Val	Asn	Gly	Thr	Phe	Gln	Gln	Ser	Thr	Gln	Glu	Leu	Phe	Ile	Pro	Asn	
			275					280					285				
25	Ile	Thr	Val	Asn	Asn	Ser	Gly	Ser	Tyr	Thr	Cys	Gln	Ala	His	Asn	Ser	
	290						295					300					
30	Asp	Thr	Gly	Leu	Asn	Arg	Thr	Thr	Val	Thr	Thr	Ile	Thr	Val	Tyr	Ala	
	305					310					315					320	
35	Glu	Pro	Pro	Lys	Pro	Phe	Ile	Thr	Ser	Asn	Asn	Ser	Asn	Pro	Val	Glu	
					325					330					335		
40	Asp	Glu	Asp	Ala	Val	Ala	Leu	Thr	Cys	Glu	Pro	Glu	Ile	Gln	Asn	Thr	
				340					345					350			
45	Thr	Tyr	Leu	Trp	Trp	Val	Asn	Asn	Gln	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Pro	Arg	
			355					360					365				
50	Leu	Gln	Leu	Ser	Asn	Asp	Asn	Arg	Thr	Leu	Thr	Leu	Leu	Ser	Val	Thr	
	370					375						380					
55	Arg	Asn	Asp	Val	Gly	Pro	Tyr	Glu	Cys	Gly	Ile	Gln	Asn	Glu	Leu	Ser	
	385					390					395					400	
60	Val	Asp	His	Ser	Asp	Pro	Val	Ile	Leu	Asn	Val	Leu	Tyr	Gly	Pro	Asp	
					405					410					415		
65	Asp	Pro	Thr	Ile	Ser	Pro	Ser	Tyr	Thr	Tyr	Tyr	Arg	Pro	Gly	Val	Asn	
				420					425					430			
70	Leu	Ser	Leu	Ser	Cys	His	Ala	Ala	Ser	Asn	Pro	Pro	Ala	Gln	Tyr	Ser	
			435					440					445				
75	Trp	Leu	Ile	Asp	Gly	Asn	Ile	Gln	Gln	His	Thr	Gln	Glu	Leu	Phe	Ile	
	450						455					460					

UA 120247 C2

	Ser	Asn	Ile	Thr	Glu	Lys	Asn	Ser	Gly	Leu	Tyr	Thr	Cys	Gln	Ala	Asn	465	470	475	480
5	Asn	Ser	Ala	Ser	Gly	His	Ser	Arg	Thr	Thr	Val	Lys	Thr	Ile	Thr	Val	485	490	495	
10	Ser	Ala	Glu	Leu	Pro	Lys	Pro	Ser	Ile	Ser	Ser	Asn	Asn	Ser	Lys	Pro	500	505	510	
15	Val	Glu	Asp	Lys	Asp	Ala	Val	Ala	Phe	Thr	Cys	Glu	Pro	Glu	Ala	Gln	515	520	525	
20	Asn	Thr	Thr	Tyr	Leu	Trp	Trp	Val	Asn	Gly	Gln	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	530	535	540	
25	Pro	Arg	Leu	Gln	Leu	Ser	Asn	Gly	Asn	Arg	Thr	Leu	Thr	Leu	Phe	Asn	545	550	555	560
30	Val	Thr	Arg	Asn	Asp	Ala	Arg	Ala	Tyr	Val	Cys	Gly	Ile	Gln	Asn	Ser	565	570	575	
35	Val	Ser	Ala	Asn	Arg	Ser	Asp	Pro	Val	Thr	Leu	Asp	Val	Leu	Tyr	Gly	580	585	590	
40	Pro	Asp	Thr	Pro	Ile	Ile	Ser	Pro	Pro	Asp	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ser	Gly	595	600	605	
45	Ala	Asn	Leu	Asn	Leu	Ser	Cys	His	Ser	Ala	Ser	Asn	Pro	Ser	Pro	Gln	610	615	620	
50	Tyr	Ser	Trp	Arg	Ile	Asn	Gly	Ile	Pro	Gln	Gln	His	Thr	Gln	Val	Leu	625	630	635	640
55	Phe	Ile	Ala	Lys	Ile	Thr	Pro	Asn	Asn	Asn	Gly	Thr	Tyr	Ala	Cys	Phe	645	650	655	
60	Val	Ser	Asn	Leu	Ala	Thr	Gly	Arg	Asn	Asn	Ser	Ile	Val	Lys	Ser	Ile	660	665	670	
	Thr	Val	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr	Ser	Pro	Gly	Leu	Ser	Ala	Gly	Ala	Thr	675	680	685	
	Val	Gly	Ile	Met	Ile	Gly	Val	Leu	Val	Gly	Val	Ala	Leu	Ile			690	695	700	
	<210> 53																			

<211> 654
 <212> BIJOK
 <213> Macaca fascicularis

5 <400> 53

Gln Leu Thr Ile Glu Ser Arg Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu
 1 5 10 15

10

Val Leu Leu Leu Ala His Asn Val Ser Gln Asn Leu Phe Gly Tyr Ile
 20 25 30

15

Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Ala Ser Arg Arg Ile Gly Ser Cys
 35 40 45

20

Val Ile Arg Thr Gln Gln Ile Thr Pro Gly Pro Ala His Ser Gly Arg
 50 55 60

25

Glu Thr Ile Asp Phe Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val Thr Gln
 65 70 75 80

Ser Asp Thr Gly Ser Tyr Thr Ile Gln Val Ile Lys Glu Asp Leu Val
 85 90 95

30

Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe Arg Val Tyr Pro Glu Leu Pro Lys
 100 105 110

35

Pro Tyr Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Ile Glu Asp Lys Asp Ala
 115 120 125

40

Val Ala Leu Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr Thr Tyr Leu Trp
 130 135 140

45

Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Glu Leu Ser
 145 150 155 160

Ser Asp Asn Arg Thr Leu Thr Val Phe Asn Ile Pro Arg Asn Asp Thr
 165 170 175

50

Thr Ser Tyr Lys Cys Glu Thr Gln Asn Pro Val Ser Val Arg Arg Ser
 180 185 190

55

Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro Thr Ile
 195 200 205

60

Ser Pro Leu Asn Thr Pro Tyr Arg Ala Gly Glu Tyr Leu Asn Leu Thr
 210 215 220

UA 120247 C2

	Cys	His	Ala	Ala	Ser	Asn	Pro	Thr	Ala	Gln	Tyr	Phe	Trp	Phe	Val	Asn	225	230	235	240
5	Gly	Thr	Phe	Gln	Gln	Ser	Thr	Gln	Glu	Leu	Phe	Ile	Pro	Asn	Ile	Thr	245	250	255	
10	Val	Asn	Asn	Ser	Gly	Ser	Tyr	Met	Cys	Gln	Ala	His	Asn	Ser	Ala	Thr	260	265	270	
15	Gly	Leu	Asn	Arg	Thr	Thr	Val	Thr	Ala	Ile	Thr	Val	Tyr	Ala	Glu	Leu	275	280	285	
20	Pro	Lys	Pro	Tyr	Ile	Thr	Ser	Asn	Asn	Ser	Asn	Pro	Ile	Glu	Asp	Lys	290	295	300	
25	Asp	Ala	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Glu	Pro	Glu	Thr	Gln	Asp	Thr	Thr	Tyr	305	310	315	320
30	Leu	Trp	Trp	Val	Asn	Asn	Gln	Arg	Leu	Ser	Val	Ser	Ser	Arg	Leu	Glu	325	330	335	
35	Leu	Ser	Asn	Asp	Asn	Arg	Thr	Leu	Thr	Val	Phe	Asn	Ile	Pro	Arg	Asn	340	345	350	
40	Asp	Thr	Thr	Phe	Tyr	Glu	Cys	Glu	Thr	Gln	Asn	Pro	Val	Ser	Val	Arg	355	360	365	
45	Arg	Ser	Asp	Pro	Val	Thr	Leu	Asn	Val	Leu	Tyr	Gly	Pro	Asp	Ala	Pro	370	375	380	
50	Thr	Ile	Ser	Pro	Leu	Asn	Thr	Pro	Tyr	Arg	Ala	Gly	Glu	Asn	Leu	Asn	385	390	395	400
55	Leu	Ser	Cys	His	Ala	Ala	Ser	Asn	Pro	Ala	Ala	Gln	Tyr	Phe	Trp	Phe	405	410	415	
60	Val	Asn	Gly	Thr	Phe	Gln	Gln	Ser	Thr	Gln	Glu	Leu	Phe	Ile	Pro	Asn	420	425	430	
	Ile	Thr	Val	Asn	Asn	Ser	Gly	Ser	Tyr	Met	Cys	Gln	Ala	His	Asn	Ser	435	440	445	
	Ala	Thr	Gly	Leu	Asn	Arg	Thr	Thr	Val	Thr	Ala	Ile	Thr	Val	Tyr	Val	450	455	460	
	Glu	Leu	Pro	Lys	Pro	Tyr	Ile	Ser	Ser	Asn	Asn	Ser	Asn	Pro	Ile	Glu	465	470	475	480

UA 120247 C2

	Asp	Lys	Asp	Ala	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Glu	Pro	Val	Ala	Glu	Asn	Thr	
					485					490					495		
5	Thr	Tyr	Leu	Trp	Trp	Val	Asn	Asn	Gln	Ser	Leu	Ser	Val	Ser	Pro	Arg	
				500					505					510			
10	Leu	Gln	Leu	Ser	Asn	Gly	Asn	Arg	Ile	Leu	Thr	Leu	Leu	Ser	Val	Thr	
			515					520					525				
15	Arg	Asn	Asp	Thr	Gly	Pro	Tyr	Glu	Cys	Gly	Ile	Gln	Asn	Ser	Glu	Ser	
		530					535					540					
20	Ala	Lys	Arg	Ser	Asp	Pro	Val	Thr	Leu	Asn	Val	Thr	Tyr	Gly	Pro	Asp	
	545					550					555					560	
25	Thr	Pro	Ile	Ile	Ser	Pro	Pro	Asp	Leu	Ser	Tyr	Arg	Ser	Gly	Ala	Asn	
					565					570					575		
30	Leu	Asn	Leu	Ser	Cys	His	Ser	Asp	Ser	Asn	Pro	Ser	Pro	Gln	Tyr	Ser	
			580						585					590			
35	Trp	Leu	Ile	Asn	Gly	Thr	Leu	Arg	Gln	His	Thr	Gln	Val	Leu	Phe	Ile	
		595						600					605				
40	Ser	Lys	Ile	Thr	Ser	Asn	Asn	Asn	Gly	Ala	Tyr	Ala	Cys	Phe	Val	Ser	
		610					615					620					
45	Asn	Leu	Ala	Thr	Gly	Arg	Asn	Asn	Ser	Ile	Val	Lys	Asn	Ile	Ser	Val	
	625					630					635					640	
50	Ser	Ser	Gly	Asp	Ser	Ala	Pro	Gly	Ser	Ser	Gly	Leu	Ser	Ala			
					645					650							
55	<210>	54															
	<211>	214															
	<212>	БІЛОК															
	<213>	Штучна послідовність															
60	<220>																
	<223>	антитіло															
	<400>	54															
55	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	
	1				5					10					15		
60	Glu	Thr	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Asn	Ile	Phe	Ser	Tyr	
				20					25					30			

UA 120247 C2

	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Gln	Gly	Lys	Ser	Pro	Gln	Leu	Leu	Val
	35							40					45			
5	Tyr	Asn	Thr	Arg	Thr	Leu	Ala	Glu	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50						55					60				
10	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Gln	Phe	Ser	Leu	Lys	Ile	Asn	Ser	Leu	Gln	Pro
	65					70					75					80
15	Glu	Asp	Phe	Gly	Ser	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	His	Tyr	Gly	Thr	Pro	Phe
					85					90					95	
20	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala
				100					105					110		
25	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly
			115					120					125			
30	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala
		130					135					140				
35	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln
	145					150					155					160
40	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser
					165					170					175	
45	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr
				180					185					190		
50	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser
			195					200					205			
55	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys										
	210															
60	<210>	55														
	<211>	107														
	<212>	БІЛОК														
	<213>	Штучна послідовність														
65	<220>															
	<223>	антитіло														
70	<400>	55														
75	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
	1				5					10					15	

UA 120247 C2

```

Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Phe Ser Tyr
      20                      25                      30

5  Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Val
      35                      40                      45

10 Tyr Asn Thr Arg Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
      50                      55                      60

15 Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
      65                      70                      75                      80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Phe
      85                      90                      95

20 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
      100                      105

25 <210> 56
    <211> 418
    <212> БІЛОК
    <213> Homo sapiens

30
    <220>
    <221> ДОМЕН
    <222> (1)..(394)
    <223> позаклітинний домен CEACAM1 людини

35
    <220>
    <221> MISC_FEATURE
    <222> (395)..(418)
    <223> розширення з His-міткою

40
    <400> 56

Gln Leu Thr Thr Glu Ser Met Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu
1      5                      10                      15

45 Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln Gln Leu Phe Gly Tyr Ser
      20                      25                      30

50 Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Val Gly Tyr
      35                      40                      45

55 Ala Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Asn Ser Gly Arg
      50                      55                      60

60 Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val Thr Gln
      65                      70                      75                      80

```

UA 120247 C2

	Asn	Asp	Thr	Gly	Phe	Tyr	Thr	Leu	Gln	Val	Ile	Lys	Ser	Asp	Leu	Val	
					85					90					95		
5	Asn	Glu	Glu	Ala	Thr	Gly	Gln	Phe	His	Val	Tyr	Pro	Glu	Leu	Pro	Lys	
				100					105					110			
10	Pro	Ser	Ile	Ser	Ser	Asn	Asn	Ser	Asn	Pro	Val	Glu	Asp	Lys	Asp	Ala	
			115					120					125				
15	Val	Ala	Phe	Thr	Cys	Glu	Pro	Glu	Thr	Gln	Asp	Thr	Thr	Tyr	Leu	Trp	
		130					135					140					
20	Trp	Ile	Asn	Asn	Gln	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Pro	Arg	Leu	Gln	Leu	Ser	
	145					150					155					160	
25	Asn	Gly	Asn	Arg	Thr	Leu	Thr	Leu	Leu	Ser	Val	Thr	Arg	Asn	Asp	Thr	
					165					170					175		
30	Gly	Pro	Tyr	Glu	Cys	Glu	Ile	Gln	Asn	Pro	Val	Ser	Ala	Asn	Arg	Ser	
				180					185					190			
35	Asp	Pro	Val	Thr	Leu	Asn	Val	Thr	Tyr	Gly	Pro	Asp	Thr	Pro	Thr	Ile	
			195					200					205				
40	Ser	Pro	Ser	Asp	Thr	Tyr	Tyr	Arg	Pro	Gly	Ala	Asn	Leu	Ser	Leu	Ser	
		210					215					220					
45	Cys	Tyr	Ala	Ala	Ser	Asn	Pro	Pro	Ala	Gln	Tyr	Ser	Trp	Leu	Ile	Asn	
	225					230					235					240	
50	Gly	Thr	Phe	Gln	Gln	Ser	Thr	Gln	Glu	Leu	Phe	Ile	Pro	Asn	Ile	Thr	
					245					250					255		
55	Val	Asn	Asn	Ser	Gly	Ser	Tyr	Thr	Cys	His	Ala	Asn	Asn	Ser	Val	Thr	
				260					265						270		
60	Gly	Cys	Asn	Arg	Thr	Thr	Val	Lys	Thr	Ile	Ile	Val	Thr	Glu	Leu	Ser	
			275					280					285				
65	Pro	Val	Val	Ala	Lys	Pro	Gln	Ile	Lys	Ala	Ser	Lys	Thr	Thr	Val	Thr	
		290					295					300					
70	Gly	Asp	Lys	Asp	Ser	Val	Asn	Leu	Thr	Cys	Ser	Thr	Asn	Asp	Thr	Gly	
	305					310					315					320	
75	Ile	Ser	Ile	Arg	Trp	Phe	Phe	Lys	Asn	Gln	Ser	Leu	Pro	Ser	Ser	Glu	
					325					330					335		

UA 120247 C2

	Arg	Met	Lys	Leu	Ser	Gln	Gly	Asn	Thr	Thr	Leu	Ser	Ile	Asn	Pro	Val	
				340					345					350			
5	Lys	Arg	Glu	Asp	Ala	Gly	Thr	Tyr	Trp	Cys	Glu	Val	Phe	Asn	Pro	Ile	
			355					360					365				
10	Ser	Lys	Asn	Gln	Ser	Asp	Pro	Ile	Met	Leu	Asn	Val	Asn	Tyr	Asn	Ala	
		370					375					380					
15	Leu	Pro	Gln	Glu	Asn	Gly	Leu	Ser	Pro	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	
	385					390					395					400	
20	Leu	Asn	Asp	Ile	Phe	Glu	Ala	Gln	Lys	Ile	Glu	Trp	His	His	His	His	
					405					410					415		
25	<210>	57															
	<211>	418															
	<212>	БІЛОК															
	<213>	Macaca fascicularis															
30	<220>																
	<221>	ДОМЕН															
	<222>	(1)..(394)															
	<223>	позаклітинний домен CEACAM1 яванської макаки															
35	<220>																
	<221>	MISC_FEATURE															
	<222>	(395)..(418)															
	<223>	розширення з His-міткою															
40	<400>	57															
45	Gln	Leu	Thr	Ile	Glu	Ser	Arg	Pro	Phe	Asn	Val	Ala	Glu	Gly	Lys	Glu	
	1				5					10					15		
50	Val	Leu	Leu	Leu	Ala	His	Asn	Leu	Ser	Gln	Asn	Leu	Ile	Gly	Tyr	Asn	
				20					25					30			
55	Trp	His	Lys	Gly	Glu	Arg	Val	Asp	Ala	Lys	Arg	Leu	Ile	Val	Ala	Tyr	
			35					40					45				
60	Val	Ile	Glu	Thr	Lys	Gln	Thr	Thr	Pro	Gly	Pro	Ala	His	Ser	Gly	Arg	
		50					55					60					
65	Glu	Met	Ile	Tyr	Ser	Asn	Ala	Ser	Leu	Leu	Ile	Gln	Asn	Val	Thr	Gln	
	65					70					75					80	

UA 120247 C2

	Asn	Asp	Thr	Gly	Ser	Tyr	Thr	Leu	Gln	Val	Ile	Lys	Gly	Asp	Leu	Val	
					85					90					95		
5	Asn	Glu	Glu	Ala	Thr	Gly	Gln	Phe	Arg	Val	Tyr	Pro	Glu	Leu	Pro	Lys	
				100					105					110			
10	Pro	Asn	Ile	Thr	Ile	Asn	Asn	Ser	Asn	Pro	Val	Glu	Asp	Lys	Asp	Val	
			115					120					125				
15	Val	Thr	Phe	Thr	Cys	Glu	Ser	Glu	Ala	Gln	Asp	Thr	Thr	Tyr	Leu	Trp	
		130					135					140					
20	Trp	Val	Asn	Asn	Gln	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Ser	Arg	Leu	Gln	Leu	Ser	
	145					150					155					160	
25	Asn	Gly	Asn	Lys	Thr	Leu	Thr	Leu	Leu	Ser	Val	Leu	Arg	Asn	Asp	Thr	
					165					170					175		
30	Gly	Pro	Tyr	Glu	Cys	Glu	Ile	Gln	Asn	Pro	Val	Ser	Ala	Asn	Arg	Ser	
				180					185					190			
35	Asp	Pro	Val	Thr	Leu	Asn	Val	Thr	Tyr	Gly	Pro	Asp	Thr	Pro	Thr	Ile	
			195					200					205				
40	Ser	Pro	Ser	Asp	Thr	Tyr	Tyr	Arg	Pro	Gly	Ala	Asn	Leu	Ser	Leu	Ser	
		210					215					220					
45	Cys	Ser	Ala	Ala	Ser	Asn	Pro	Pro	Ala	Gln	Tyr	Ser	Trp	Leu	Ile	Asn	
	225					230					235					240	
50	Glu	Thr	Phe	Gln	Gln	Ser	Thr	Gln	Glu	Leu	Phe	Ile	Pro	Asn	Ile	Thr	
					245					250					255		
55	Val	Asn	Asn	Ser	Gly	Ser	Tyr	Thr	Cys	His	Ala	Asn	Asn	Ser	Val	Thr	
				260					265						270		
60	Gly	Arg	Asn	Arg	Thr	Thr	Val	Lys	Met	Ile	Ile	Val	Ser	Glu	Gln	Ser	
			275					280					285				
65	Leu	Val	Val	Ala	Gln	Pro	Gln	Ile	Lys	Ala	Ser	Lys	Thr	Thr	Val	Thr	
		290					295					300					
70	Glu	Asp	Lys	Asp	Tyr	Val	Asn	Leu	Thr	Cys	Ser	Thr	Asn	Asp	Thr	Gly	
	305					310					315					320	
75	Ile	Ser	Ile	Ser	Trp	Phe	Phe	Lys	Asp	Gln	Ser	Leu	Pro	Ser	Ser	Glu	
					325					330					335		

Arg Met Lys Leu Ser Gln Asp Asn Ala Thr Leu Ser Ile Asn Pro Val
340 345 350

5 Lys Arg Glu Asp Ala Gly Asn Tyr Ser Cys Glu Val Phe Asn Leu Ile
355 360 365

10 Ser Lys Asn Arg Ser Asp Pro Ile Val Leu Ile Val Asn Tyr Asn Asn
370 375 380

15 Arg Ala Gln Glu Asn Ile Leu Pro Ala Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly
385 390 395 400

Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His His His His
405 410 415

20 His His

25 <210> 58
<211> 675
<212> БІЛОК
<213> Homo sapiens

30 <220>
<221> ДОМЕН
<222> (1)..(651)
<223> позаклітинний домен CEACAM5 людини

35 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (652)..(675)
<223> розширення з His-міткою

40 <400> 58

45 Lys Leu Thr Ile Glu Ser Thr Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu
1 5 10 15

Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln His Leu Phe Gly Tyr Ser
20 25 30

50 Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Ile Gly Tyr
35 40 45

55 Val Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Tyr Ser Gly Arg
50 55 60

60 Glu Ile Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Ile Ile Gln
65 70 75 80

UA 120247 C2

	Asn	Asp	Thr	Gly	Phe	Tyr	Thr	Leu	His	Val	Ile	Lys	Ser	Asp	Leu	Val
					85					90					95	
5	Asn	Glu	Glu	Ala	Thr	Gly	Gln	Phe	Arg	Val	Tyr	Pro	Glu	Leu	Pro	Lys
				100					105					110		
10	Pro	Ser	Ile	Ser	Ser	Asn	Asn	Ser	Lys	Pro	Val	Glu	Asp	Lys	Asp	Ala
			115					120					125			
15	Val	Ala	Phe	Thr	Cys	Glu	Pro	Glu	Thr	Gln	Asp	Ala	Thr	Tyr	Leu	Trp
		130					135					140				
20	Trp	Val	Asn	Asn	Gln	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Pro	Arg	Leu	Gln	Leu	Ser
	145					150					155					160
25	Asn	Gly	Asn	Arg	Thr	Leu	Thr	Leu	Phe	Asn	Val	Thr	Arg	Asn	Asp	Thr
					165					170					175	
30	Ala	Ser	Tyr	Lys	Cys	Glu	Thr	Gln	Asn	Pro	Val	Ser	Ala	Arg	Arg	Ser
				180					185					190		
35	Asp	Ser	Val	Ile	Leu	Asn	Val	Leu	Tyr	Gly	Pro	Asp	Ala	Pro	Thr	Ile
			195					200					205			
40	Ser	Pro	Leu	Asn	Thr	Ser	Tyr	Arg	Ser	Gly	Glu	Asn	Leu	Asn	Leu	Ser
		210					215					220				
45	Cys	His	Ala	Ala	Ser	Asn	Pro	Pro	Ala	Gln	Tyr	Ser	Trp	Phe	Val	Asn
	225					230					235					240
50	Gly	Thr	Phe	Gln	Gln	Ser	Thr	Gln	Glu	Leu	Phe	Ile	Pro	Asn	Ile	Thr
					245					250					255	
55	Val	Asn	Asn	Ser	Gly	Ser	Tyr	Thr	Cys	Gln	Ala	His	Asn	Ser	Asp	Thr
				260					265						270	
60	Gly	Leu	Asn	Arg	Thr	Thr	Val	Thr	Thr	Ile	Thr	Val	Tyr	Ala	Glu	Pro
			275					280					285			
65	Pro	Lys	Pro	Phe	Ile	Thr	Ser	Asn	Asn	Ser	Asn	Pro	Val	Glu	Asp	Glu
		290					295					300				
70	Asp	Ala	Val	Ala	Leu	Thr	Cys	Glu	Pro	Glu	Ile	Gln	Asn	Thr	Thr	Tyr
	305					310					315					320
75	Leu	Trp	Trp	Val	Asn	Asn	Gln	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Pro	Arg	Leu	Gln
					325					330					335	

UA 120247 C2

	Leu	Ser	Asn	Asp	Asn	Arg	Thr	Leu	Thr	Leu	Leu	Ser	Val	Thr	Arg	Asn	
				340					345					350			
5	Asp	Val	Gly	Pro	Tyr	Glu	Cys	Gly	Ile	Gln	Asn	Glu	Leu	Ser	Val	Asp	
			355					360					365				
10	His	Ser	Asp	Pro	Val	Ile	Leu	Asn	Val	Leu	Tyr	Gly	Pro	Asp	Asp	Pro	
		370					375					380					
15	Thr	Ile	Ser	Pro	Ser	Tyr	Thr	Tyr	Tyr	Arg	Pro	Gly	Val	Asn	Leu	Ser	
	385					390					395					400	
20	Leu	Ser	Cys	His	Ala	Ala	Ser	Asn	Pro	Pro	Ala	Gln	Tyr	Ser	Trp	Leu	
				405						410					415		
25	Ile	Thr	Glu	Lys	Asn	Ser	Gly	Leu	Tyr	Thr	Cys	Gln	Ala	Asn	Asn	Ser	
			435					440					445				
30	Ala	Ser	Gly	His	Ser	Arg	Thr	Thr	Val	Lys	Thr	Ile	Thr	Val	Ser	Ala	
	450						455					460					
35	Glu	Leu	Pro	Lys	Pro	Ser	Ile	Ser	Ser	Asn	Asn	Ser	Lys	Pro	Val	Glu	
	465					470					475					480	
40	Asp	Lys	Asp	Ala	Val	Ala	Phe	Thr	Cys	Glu	Pro	Glu	Ala	Gln	Asn	Thr	
				485						490					495		
45	Thr	Tyr	Leu	Trp	Trp	Val	Asn	Gly	Gln	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Pro	Arg	
				500					505					510			
50	Leu	Gln	Leu	Ser	Asn	Gly	Asn	Arg	Thr	Leu	Thr	Leu	Phe	Asn	Val	Thr	
		515						520					525				
55	Arg	Asn	Asp	Ala	Arg	Ala	Tyr	Val	Cys	Gly	Ile	Gln	Asn	Ser	Val	Ser	
	530						535					540					
60	Ala	Asn	Arg	Ser	Asp	Pro	Val	Thr	Leu	Asp	Val	Leu	Tyr	Gly	Pro	Asp	
	545					550					555					560	
65	Thr	Pro	Ile	Ile	Ser	Pro	Pro	Asp	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ser	Gly	Ala	Asn	
					565					570					575		
70	Leu	Asn	Leu	Ser	Cys	His	Ser	Ala	Ser	Asn	Pro	Ser	Pro	Gln	Tyr	Ser	
			580						585					590			

UA 120247 C2

	Trp	Arg	Ile	Asn	Gly	Ile	Pro	Gln	Gln	His	Thr	Gln	Val	Leu	Phe	Ile	
				595				600					605				
5	Ala	Lys	Ile	Thr	Pro	Asn	Asn	Asn	Gly	Thr	Tyr	Ala	Cys	Phe	Val	Ser	
		610					615					620					
10	Asn	Leu	Ala	Thr	Gly	Arg	Asn	Asn	Ser	Ile	Val	Lys	Ser	Ile	Thr	Val	
	625					630					635					640	
15	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr	Ser	Pro	Gly	Leu	Ser	Ala	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	
					645					650					655		
20	Gly	Leu	Asn	Asp	Ile	Phe	Glu	Ala	Gln	Lys	Ile	Glu	Trp	His	His	His	
				660					665					670			
	His	His	His														
				675													
25	<210>	59															
	<211>	678															
	<212>	БІЛОК															
	<213>	Macaca fascicularis															
30	<220>																
	<221>	ДОМЕН															
	<222>	(1)..(654)															
	<223>	позаклітинний домен CEACAM5 яванської макаки															
35	<220>																
	<221>	MISC_FEATURE															
	<222>	(655)..(678)															
	<223>	розширення з His-міткою															
40	<400>	59															
45	Gln	Leu	Thr	Ile	Glu	Ser	Arg	Pro	Phe	Asn	Val	Ala	Glu	Gly	Lys	Glu	
	1				5					10					15		
50	Val	Leu	Leu	Leu	Ala	His	Asn	Val	Ser	Gln	Asn	Leu	Phe	Gly	Tyr	Ile	
				20					25					30			
55	Trp	Tyr	Lys	Gly	Glu	Arg	Val	Asp	Ala	Ser	Arg	Arg	Ile	Gly	Ser	Cys	
			35					40					45				
60	Val	Ile	Arg	Thr	Gln	Gln	Ile	Thr	Pro	Gly	Pro	Ala	His	Ser	Gly	Arg	
		50					55					60					
	Glu	Thr	Ile	Asp	Phe	Asn	Ala	Ser	Leu	Leu	Ile	Gln	Asn	Val	Thr	Gln	
	65					70					75					80	

UA 120247 C2

	Ser	Asp	Thr	Gly	Ser	Tyr	Thr	Ile	Gln	Val	Ile	Lys	Glu	Asp	Leu	Val
					85					90					95	
5	Asn	Glu	Glu	Ala	Thr	Gly	Gln	Phe	Arg	Val	Tyr	Pro	Glu	Leu	Pro	Lys
				100					105					110		
10	Pro	Tyr	Ile	Thr	Ser	Asn	Asn	Ser	Asn	Pro	Ile	Glu	Asp	Lys	Asp	Ala
			115					120					125			
15	Val	Ala	Leu	Thr	Cys	Glu	Pro	Glu	Thr	Gln	Asp	Thr	Thr	Tyr	Leu	Trp
		130					135					140				
20	Trp	Val	Asn	Asn	Gln	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Pro	Arg	Leu	Glu	Leu	Ser
	145					150					155					160
25	Ser	Asp	Asn	Arg	Thr	Leu	Thr	Val	Phe	Asn	Ile	Pro	Arg	Asn	Asp	Thr
					165					170					175	
30	Thr	Ser	Tyr	Lys	Cys	Glu	Thr	Gln	Asn	Pro	Val	Ser	Val	Arg	Arg	Ser
				180					185					190		
35	Asp	Pro	Val	Thr	Leu	Asn	Val	Leu	Tyr	Gly	Pro	Asp	Ala	Pro	Thr	Ile
			195					200					205			
40	Ser	Pro	Leu	Asn	Thr	Pro	Tyr	Arg	Ala	Gly	Glu	Tyr	Leu	Asn	Leu	Thr
		210					215					220				
45	Cys	His	Ala	Ala	Ser	Asn	Pro	Thr	Ala	Gln	Tyr	Phe	Trp	Phe	Val	Asn
	225					230					235					240
50	Gly	Thr	Phe	Gln	Gln	Ser	Thr	Gln	Glu	Leu	Phe	Ile	Pro	Asn	Ile	Thr
					245					250					255	
55	Val	Asn	Asn	Ser	Gly	Ser	Tyr	Met	Cys	Gln	Ala	His	Asn	Ser	Ala	Thr
				260					265					270		
60	Gly	Leu	Asn	Arg	Thr	Thr	Val	Thr	Ala	Ile	Thr	Val	Tyr	Ala	Glu	Leu
			275					280					285			
65	Pro	Lys	Pro	Tyr	Ile	Thr	Ser	Asn	Asn	Ser	Asn	Pro	Ile	Glu	Asp	Lys
		290					295					300				
70	Asp	Ala	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Glu	Pro	Glu	Thr	Gln	Asp	Thr	Thr	Tyr
	305					310					315					320
75	Leu	Trp	Trp	Val	Asn	Asn	Gln	Arg	Leu	Ser	Val	Ser	Ser	Arg	Leu	Glu
					325					330					335	

UA 120247 C2

	Leu	Ser	Asn	Asp	Asn	Arg	Thr	Leu	Thr	Val	Phe	Asn	Ile	Pro	Arg	Asn	
				340					345					350			
5	Asp	Thr	Thr	Phe	Tyr	Glu	Cys	Glu	Thr	Gln	Asn	Pro	Val	Ser	Val	Arg	
			355					360					365				
10	Arg	Ser	Asp	Pro	Val	Thr	Leu	Asn	Val	Leu	Tyr	Gly	Pro	Asp	Ala	Pro	
		370					375					380					
15	Thr	Ile	Ser	Pro	Leu	Asn	Thr	Pro	Tyr	Arg	Ala	Gly	Glu	Asn	Leu	Asn	
	385					390					395					400	
20	Leu	Ser	Cys	His	Ala	Ala	Ser	Asn	Pro	Ala	Ala	Gln	Tyr	Phe	Trp	Phe	
				405						410					415		
25	Val	Asn	Gly	Thr	Phe	Gln	Gln	Ser	Thr	Gln	Glu	Leu	Phe	Ile	Pro	Asn	
				420					425					430			
30	Ile	Thr	Val	Asn	Asn	Ser	Gly	Ser	Tyr	Met	Cys	Gln	Ala	His	Asn	Ser	
			435					440					445				
35	Ala	Thr	Gly	Leu	Asn	Arg	Thr	Thr	Val	Thr	Ala	Ile	Thr	Val	Tyr	Val	
		450					455					460					
40	Glu	Leu	Pro	Lys	Pro	Tyr	Ile	Ser	Ser	Asn	Asn	Ser	Asn	Pro	Ile	Glu	
	465					470					475					480	
45	Asp	Lys	Asp	Ala	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Glu	Pro	Val	Ala	Glu	Asn	Thr	
				485						490					495		
50	Thr	Tyr	Leu	Trp	Trp	Val	Asn	Asn	Gln	Ser	Leu	Ser	Val	Ser	Pro	Arg	
				500					505					510			
55	Leu	Gln	Leu	Ser	Asn	Gly	Asn	Arg	Ile	Leu	Thr	Leu	Leu	Ser	Val	Thr	
		515					520						525				
60	Arg	Asn	Asp	Thr	Gly	Pro	Tyr	Glu	Cys	Gly	Ile	Gln	Asn	Ser	Glu	Ser	
		530					535					540					
65	Ala	Lys	Arg	Ser	Asp	Pro	Val	Thr	Leu	Asn	Val	Thr	Tyr	Gly	Pro	Asp	
	545					550					555					560	
70	Thr	Pro	Ile	Ile	Ser	Pro	Pro	Asp	Leu	Ser	Tyr	Arg	Ser	Gly	Ala	Asn	
					565					570					575		
75	Leu	Asn	Leu	Ser	Cys	His	Ser	Asp	Ser	Asn	Pro	Ser	Pro	Gln	Tyr	Ser	
			580						585					590			

Trp Leu Ile Asn Gly Thr Leu Arg Gln His Thr Gln Val Leu Phe Ile
595 600 605

5 Ser Lys Ile Thr Ser Asn Asn Asn Gly Ala Tyr Ala Cys Phe Val Ser
610 615 620

10 Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Asn Ile Ser Val
625 630 635 640

15 Ser Ser Gly Asp Ser Ala Pro Gly Ser Ser Gly Leu Ser Ala Ser Gly
645 650 655

Ser Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp
660 665 670

20 His His His His His His
675

25 <210> 60
<211> 317
<212> БІЛОК
<213> Homo sapiens

30 <220>
<221> ДОМЕН
<222> (1)..(293)
<223> позаклітинний домен CEACAM6 людини

35 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (294)..(317)
<223> розширення з His-міткою

40 <400> 60

Lys Leu Thr Ile Glu Ser Thr Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu
1 5 10 15

45 Val Leu Leu Leu Ala His Asn Leu Pro Gln Asn Arg Ile Gly Tyr Ser
20 25 30

50 Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Ser Leu Ile Val Gly Tyr
35 40 45

55 Val Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Tyr Ser Gly Arg
50 55 60

60 Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val Thr Gln
65 70 75 80

UA 120247 C2

	Asn	Asp	Thr	Gly	Phe	Tyr	Thr	Leu	Gln	Val	Ile	Lys	Ser	Asp	Leu	Val	
					85					90					95		
5	Asn	Glu	Glu	Ala	Thr	Gly	Gln	Phe	His	Val	Tyr	Pro	Glu	Leu	Pro	Lys	
				100					105					110			
10	Pro	Ser	Ile	Ser	Ser	Asn	Asn	Ser	Asn	Pro	Val	Glu	Asp	Lys	Asp	Ala	
			115					120					125				
15	Val	Ala	Phe	Thr	Cys	Glu	Pro	Glu	Val	Gln	Asn	Thr	Thr	Tyr	Leu	Trp	
		130					135					140					
20	Trp	Val	Asn	Gly	Gln	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Pro	Arg	Leu	Gln	Leu	Ser	
	145					150					155					160	
25	Asn	Gly	Asn	Met	Thr	Leu	Thr	Leu	Leu	Ser	Val	Lys	Arg	Asn	Asp	Ala	
					165					170					175		
30	Gly	Ser	Tyr	Glu	Cys	Glu	Ile	Gln	Asn	Pro	Ala	Ser	Ala	Asn	Arg	Ser	
				180					185					190			
35	Asp	Pro	Val	Thr	Leu	Asn	Val	Leu	Tyr	Gly	Pro	Asp	Gly	Pro	Thr	Ile	
			195					200					205				
40	Ser	Pro	Ser	Lys	Ala	Asn	Tyr	Arg	Pro	Gly	Glu	Asn	Leu	Asn	Leu	Ser	
		210					215					220					
45	Cys	His	Ala	Ala	Ser	Asn	Pro	Pro	Ala	Gln	Tyr	Ser	Trp	Phe	Ile	Asn	
	225					230					235					240	
50	Gly	Thr	Phe	Gln	Gln	Ser	Thr	Gln	Glu	Leu	Phe	Ile	Pro	Asn	Ile	Thr	
					245					250					255		
55	Val	Asn	Asn	Ser	Gly	Ser	Tyr	Met	Cys	Gln	Ala	His	Asn	Ser	Ala	Thr	
				260					265					270			
60	Gly	Leu	Asn	Arg	Thr	Thr	Val	Thr	Met	Ile	Thr	Val	Ser	Gly	Ser	Ala	
			275					280					285				
65	Pro	Val	Leu	Ser	Ala	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Leu	Asn	Asp	Ile	Phe	
		290					295					300					
70	Glu	Ala	Gln	Lys	Ile	Glu	Trp	His	His	His	His	His	His	His	His	His	
	305					310						315					
75	<210>																61

<211> 317
 <212> БІЛОК
 <213> Macaca fascicularis

5

<220>
 <221> ДОМЕН
 <222> (1)..(293)
 <223> позаклітинний домен CEACAM6 яванської макаки

10

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (294)..(317)
 <223> розширення з His-міткою

15

<400> 61

Gln Leu Thr Ile Glu Ser Arg Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu
 1 5 10 15

20

Val Leu Leu Leu Ala His Asn Leu Pro Gln Asn Thr Leu Gly Phe Asn
 20 25 30

25

Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Ala Lys Arg Leu Ile Val Ala Tyr
 35 40 45

30

Val Ile Gly Thr Gln Gln Thr Thr Pro Gly Pro Ala His Ser Gly Arg
 50 55 60

35

Glu Met Ile Tyr Ser Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val Thr Gln
 65 70 75 80

Asn Asp Thr Gly Ser Tyr Thr Leu Gln Val Ile Lys Gly Asp Leu Val
 85 90 95

40

Thr Glu Glu Ala Thr Gly Arg Phe Trp Val Tyr Pro Glu Leu Pro Lys
 100 105 110

45

Pro Tyr Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Lys Asp Ala
 115 120 125

50

Val Asp Phe Thr Cys Glu Pro Asp Ile His Ser Thr Thr Tyr Leu Trp
 130 135 140

55

Trp Val Asn Asp Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser
 145 150 155 160

Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Lys Arg Asn Asp Ala
 165 170 175

60

Gly Ala Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Val Ser Ala Asn Leu Ser
180 185 190

5 Asp Pro Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Val Pro Thr Ile
195 200 205

10 Ser Pro Ser Asn Ser Asn Tyr Arg Pro Gly Glu Asn Leu Asn Leu Ser
210 215 220

15 Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Thr Ala Gln Tyr Ser Trp Phe Val Asn
225 230 235 240

Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn Ile Thr
245 250 255

20 Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Met Cys Gln Ala Tyr Asn Ser Ala Thr
260 265 270

25 Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Met Met Ile Thr Val Ser Gly Ser Ala
275 280 285

30 Pro Gly Leu Ser Ala Ser Gly Ser Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe
290 295 300

35 Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His His His His His His
305 310 315

<210> 62
<211> 322
<212> БІЛОК
40 <213> Homo sapiens

<220>
<221> ДОМЕН
45 <222> (1)..(298)
<223> позаклітинний домен CEACAM8 людини

<220>
<221> MISC_FEATURE
50 <222> (299)..(322)
<223> розширення з His-міткою

<400> 62

55 Gln Leu Thr Ile Glu Ala Val Pro Ser Asn Ala Ala Glu Gly Lys Glu
1 5 10 15

60 Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln Asp Pro Arg Gly Tyr Asn
20 25 30

UA 120247 C2

	Trp	Tyr	Lys	Gly	Glu	Thr	Val	Asp	Ala	Asn	Arg	Arg	Ile	Ile	Gly	Tyr	
			35					40					45				
5	Val	Ile	Ser	Asn	Gln	Gln	Ile	Thr	Pro	Gly	Pro	Ala	Tyr	Ser	Asn	Arg	
		50					55					60					
10	Glu	Thr	Ile	Tyr	Pro	Asn	Ala	Ser	Leu	Leu	Met	Arg	Asn	Val	Thr	Arg	
	65					70					75					80	
15	Asn	Asp	Thr	Gly	Ser	Tyr	Thr	Leu	Gln	Val	Ile	Lys	Leu	Asn	Leu	Met	
					85					90					95		
20	Ser	Glu	Glu	Val	Thr	Gly	Gln	Phe	Ser	Val	His	Pro	Glu	Thr	Pro	Lys	
				100					105					110			
25	Pro	Ser	Ile	Ser	Ser	Asn	Asn	Ser	Asn	Pro	Val	Glu	Asp	Lys	Asp	Ala	
			115					120					125				
30	Val	Ala	Phe	Thr	Cys	Glu	Pro	Glu	Thr	Gln	Asn	Thr	Thr	Tyr	Leu	Trp	
		130					135					140					
35	Trp	Val	Asn	Gly	Gln	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Pro	Arg	Leu	Gln	Leu	Ser	
	145					150					155					160	
40	Asn	Gly	Asn	Arg	Thr	Leu	Thr	Leu	Leu	Ser	Val	Thr	Arg	Asn	Asp	Val	
					165					170					175		
45	Gly	Pro	Tyr	Glu	Cys	Glu	Ile	Gln	Asn	Pro	Ala	Ser	Ala	Asn	Phe	Ser	
				180					185					190			
50	Asp	Pro	Val	Thr	Leu	Asn	Val	Leu	Tyr	Gly	Pro	Asp	Ala	Pro	Thr	Ile	
			195					200					205				
55	Ser	Pro	Ser	Asp	Thr	Tyr	Tyr	His	Ala	Gly	Val	Asn	Leu	Asn	Leu	Ser	
		210					215					220					
60	Cys	His	Ala	Ala	Ser	Asn	Pro	Pro	Ser	Gln	Tyr	Ser	Trp	Ser	Val	Asn	
	225					230					235					240	
65	Gly	Thr	Phe	Gln	Gln	Tyr	Thr	Gln	Lys	Leu	Phe	Ile	Pro	Asn	Ile	Thr	
				245						250					255		
70	Thr	Lys	Asn	Ser	Gly	Ser	Tyr	Ala	Cys	His	Thr	Thr	Asn	Ser	Ala	Thr	
				260					265					270			
75	Gly	Arg	Asn	Arg	Thr	Thr	Val	Arg	Met	Ile	Thr	Val	Ser	Asp	Ala	Leu	
			275					280					285				

UA 120247 C2

	Val	Gln	Gly	Ser	Ser	Pro	Gly	Leu	Ser	Ala	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly
	290						295					300				
5	Leu	Asn	Asp	Ile	Phe	Glu	Ala	Gln	Lys	Ile	Glu	Trp	His	His	His	His
	305					310					315					320
	His	His														
10																
	<210>	63														
	<211>	322														
15	<212>	БИЛОК														
	<213>	Macaca fascicularis														
	<220>															
20	<221>	ДОМЕН														
	<222>	(1)..(298)														
	<223>	позаклітинний домен CEACAM8 яванської макаки														
	<220>															
25	<221>	MISC_FEATURE														
	<222>	(299)..(322)														
	<223>	розширення з His-міткою														
	<400>	63														
30	Gln	Leu	Thr	Ile	Glu	Ala	Val	Pro	Ser	Asn	Ala	Ala	Glu	Gly	Lys	Glu
	1				5					10					15	
35	Val	Leu	Leu	Leu	Ala	His	Asn	Leu	Pro	Gln	Asp	Pro	Leu	Gly	Tyr	Asn
				20					25					30		
	Trp	Tyr	Lys	Gly	Glu	Thr	Val	Asp	Ala	Asn	Arg	Arg	Ile	Ile	Gly	Tyr
40			35					40					45			
	Val	Ile	Ala	Thr	Gln	Val	Asn	Ile	Ser	Gly	Pro	Ala	Asp	Ser	Gly	Arg
45		50					55					60				
	Glu	Thr	Ile	Tyr	Pro	Asn	Ala	Thr	Leu	Leu	Met	Gln	Asn	Val	Thr	Arg
	65					70					75					80
50	Asn	Asp	Thr	Gly	Ser	Tyr	Thr	Leu	Gln	Val	Ile	Thr	Leu	Asn	Leu	Val
					85					90					95	
55	Asn	Glu	Glu	Val	Thr	Gly	Gln	Phe	Ser	Val	His	Pro	Glu	Thr	Pro	Lys
				100					105					110		
	Pro	Ser	Ile	Ser	Ser	Asn	Asn	Ser	Asn	Pro	Val	Glu	Asp	Arg	Asp	Ala
60			115					120					125			

UA 120247 C2

	Val	Ala	Leu	Thr	Cys	Glu	Pro	Glu	Thr	Gln	Asn	Thr	Thr	Tyr	Leu	Trp
	130						135					140				
5	Trp	Val	Asn	Gly	Gln	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Pro	Arg	Leu	Gln	Leu	Ser
	145					150					155					160
10	Asp	Gly	Asn	Arg	Thr	Leu	Thr	Leu	Leu	Asn	Val	Thr	Arg	Asn	Asp	Thr
					165					170					175	
15	Gly	Pro	Tyr	Glu	Cys	Glu	Ile	Gln	Asn	Pro	Val	Ser	Val	Asn	Phe	Ser
				180					185					190		
20	Asp	Pro	Val	Thr	Leu	Asn	Val	Leu	Tyr	Gly	Pro	Asp	Ala	Pro	Asn	Ile
			195					200					205			
25	Ser	Pro	Ser	Asp	Thr	Tyr	Tyr	Leu	Pro	Gly	Val	Asn	Leu	Asn	Leu	Ser
	210						215					220				
30	Cys	His	Ala	Ala	Ser	Asn	Pro	Leu	Ala	Gln	Tyr	Ser	Trp	Ser	Val	Asn
	225					230					235					240
35	Gly	Thr	Phe	Gln	Gln	His	Thr	Gln	Asn	Leu	Phe	Ile	Pro	Asn	Ile	Thr
				245						250					255	
40	Ala	Lys	Asn	Ser	Gly	Ser	Tyr	Ala	Cys	His	Ala	Thr	Asn	Ser	Ala	Thr
				260					265					270		
45	Gly	His	Asn	Gly	Thr	Thr	Val	Arg	Met	Ile	Thr	Val	Ser	Asp	Ala	Ser
			275					280					285			
50	Val	Gln	Gly	Ser	Ser	Pro	Gly	Leu	Ser	Ala	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly
	290						295					300				
55	Leu	Asn	Asp	Ile	Phe	Glu	Ala	Gln	Lys	Ile	Glu	Trp	His	His	His	His
	305					310					315					320
60	His	His														
	<210>	64														
	<211>	237														
	<212>	BIJOK														
	<213>	Homo sapiens														
	<220>															
	<221>	ДОМЕН														
	<222>	(1) .. (213)														

<223> позаклітинний домен CEACAM7 людини

<220>

<221> ДОМЕН

5 <222> (214)..(237)

<223> розширення з His-міткою

<400> 64

10 Thr Asn Ile Asp Val Val Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu Val
1 5 10 15

15 Leu Leu Val Val His Asn Glu Ser Gln Asn Leu Tyr Gly Tyr Asn Trp
20 25 30

20 Tyr Lys Gly Glu Arg Val His Ala Asn Tyr Arg Ile Ile Gly Tyr Val
35 40 45

Lys Asn Ile Ser Gln Glu Asn Ala Pro Gly Pro Ala His Asn Gly Arg
50 55 60

25 Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Gly Thr Leu Leu Ile Gln Asn Val Thr His
65 70 75 80

30 Asn Asp Ala Gly Ile Tyr Thr Leu His Val Ile Lys Glu Asn Leu Val
85 90 95

35 Asn Glu Glu Val Thr Arg Gln Phe Tyr Val Phe Ser Glu Pro Pro Lys
100 105 110

40 Pro Ser Ile Thr Ser Asn Asn Phe Asn Pro Val Glu Asn Lys Asp Ile
115 120 125

Val Val Leu Thr Cys Gln Pro Glu Thr Gln Asn Thr Thr Tyr Leu Trp
130 135 140

45 Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Leu Val Ser Pro Arg Leu Leu Leu Ser
145 150 155 160

50 Thr Asp Asn Arg Thr Leu Val Leu Leu Ser Ala Thr Lys Asn Asp Ile
165 170 175

55 Gly Pro Tyr Glu Cys Glu Ile Gln Asn Pro Val Gly Ala Ser Arg Ser
180 185 190

60 Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Arg Tyr Glu Ser Val Gln Ala Ser Ser
195 200 205

UA 120247 C2

```

Pro Asp Leu Ser Ala Ser Gly Ser Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe
 210                               215                   220

5  Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His His His His His His
 225                               230                   235

10 <210> 65
    <211> 292
    <212> BIJOK
    <213> Homo sapiens

15 <220>
    <221> ДОМЕН
    <222> (1)..(286)
    <223> N-A1-B1 hCEACAM5

20 <220>
    <221> MISC_FEATURE
    <222> (287)..(292)
    <223> His-митка

25 <400> 65

Lys Leu Thr Ile Glu Ser Thr Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu
1                               5                   10                   15

30 Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln His Leu Phe Gly Tyr Ser
    20                               25                   30

35 Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Ile Gly Tyr
    35                               40                   45

40 Val Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Tyr Ser Gly Arg
    50                               55                   60

45 Glu Ile Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Ile Ile Gln
    65                               70                   75                   80

Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu His Val Ile Lys Ser Asp Leu Val
    85                               90                   95

50 Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe Arg Val Tyr Pro Glu Leu Pro Lys
    100                               105                   110

55 Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro Val Glu Asp Lys Asp Ala
    115                               120                   125

60 Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Ala Thr Tyr Leu Trp
    130                               135                   140

```

UA 120247 C2

	Trp	Val	Asn	Asn	Gln	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Pro	Arg	Leu	Gln	Leu	Ser	
	145					150					155					160	
5	Asn	Gly	Asn	Arg	Thr	Leu	Thr	Leu	Phe	Asn	Val	Thr	Arg	Asn	Asp	Thr	
					165					170					175		
10	Ala	Ser	Tyr	Lys	Cys	Glu	Thr	Gln	Asn	Pro	Val	Ser	Ala	Arg	Arg	Ser	
				180					185					190			
15	Asp	Ser	Val	Ile	Leu	Asn	Val	Leu	Tyr	Gly	Pro	Asp	Ala	Pro	Thr	Ile	
			195					200					205				
20	Ser	Pro	Leu	Asn	Thr	Ser	Tyr	Arg	Ser	Gly	Glu	Asn	Leu	Asn	Leu	Ser	
		210					215					220					
25	Cys	His	Ala	Ala	Ser	Asn	Pro	Pro	Ala	Gln	Tyr	Ser	Trp	Phe	Val	Asn	
	225					230					235					240	
30	Gly	Thr	Phe	Gln	Gln	Ser	Thr	Gln	Glu	Leu	Phe	Ile	Pro	Asn	Ile	Thr	
					245					250					255		
35	Val	Asn	Asn	Ser	Gly	Ser	Tyr	Thr	Cys	Gln	Ala	His	Asn	Ser	Asp	Thr	
				260					265					270			
40	Gly	Leu	Asn	Arg	Thr	Thr	Val	Thr	Thr	Ile	Thr	Val	Tyr	Ala	His	His	
			275					280					285				
45	His	His	His	His													
			290														
50	<210>	66															
	<211>	184															
	<212>	БИЛОК															
	<213>	Homo sapiens															
55	<220>																
	<221>	ДОМЕХ															
	<222>	(1)..(178)															
	<223>	A2-B2 hCEACAM5															
60	<220>																
	<221>	MISC_FEATURE															
	<222>	(179)..(184)															
	<223>	His-mitka															
	<400>	66															
	Glu	Pro	Pro	Lys	Pro	Phe	Ile	Thr	Ser	Asn	Asn	Ser	Asn	Pro	Val	Glu	
	1				5					10					15		

UA 120247 C2

```

Asp Glu Asp Ala Val Ala Leu Thr Cys Glu Pro Glu Ile Gln Asn Thr
      20                      25                      30

5  Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg
      35                      40                      45

10 Leu Gln Leu Ser Asn Asp Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr
      50                      55                      60

15 Arg Asn Asp Val Gly Pro Tyr Glu Cys Gly Ile Gln Asn Glu Leu Ser
      65                      70                      75                      80

Val Asp His Ser Asp Pro Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp
      85                      90                      95

20 Asp Pro Thr Ile Ser Pro Ser Tyr Thr Tyr Tyr Arg Pro Gly Val Asn
      100                     105                     110

25 Leu Ser Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser
      115                     120                     125

30 Trp Leu Ile Asp Gly Asn Ile Gln Gln His Thr Gln Glu Leu Phe Ile
      130                     135                     140

35 Ser Asn Ile Thr Glu Lys Asn Ser Gly Leu Tyr Thr Cys Gln Ala Asn
      145                     150                     155                     160

Asn Ser Ala Ser Gly His Ser Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Thr Val
      165                     170                     175

40 Ser Ala His His His His His His
      180

45 <210> 67
    <211> 193
    <212> БИЛОК
    <213> Homo sapiens

50
    <220>
    <221> ДОМЕН
    <222> (1)..(187)
    <223> A3-B3 hCEACAM5

55
    <220>
    <221> MISC_FEATURE
    <222> (188)..(193)
    <223> His-митка

60
    <400> 67

```


UA 120247 C2

	Glu	Leu	Pro	Lys	Pro	Ser	Ile	Ser	Ser	Asn	Asn	Ser	Lys	Pro	Val	Glu	
	1				5					10					15		
5	Asp	Lys	Asp	Ala	Val	Ala	Phe	Thr	Cys	Glu	Pro	Glu	Ala	Gln	Asn	Thr	
				20					25					30			
	Thr	Tyr	Leu	Trp	Trp	Val	Asn	Gly	Gln	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Pro	Arg	
10			35					40					45				
	Leu	Gln	Leu	Ser	Asn	Gly	Asn	Arg	Thr	Leu	Thr	Leu	Phe	Asn	Val	Thr	
15		50					55					60					
	Arg	Asn	Asp	Ala	Arg	Ala	Tyr	Val	Cys	Gly	Ile	Gln	Asn	Ser	Val	Ser	
	65					70					75					80	
20																	
	Ala	Asn	Arg	Ser	Asp	Pro	Val	Thr	Leu	Asp	Val	Leu	Tyr	Gly	Pro	Asp	
					85					90					95		
25	Thr	Pro	Ile	Ile	Ser	Pro	Pro	Asp	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ser	Gly	Ala	Asn	
				100					105					110			
30	Leu	Asn	Leu	Ser	Cys	His	Ser	Ala	Ser	Asn	Pro	Ser	Pro	Gln	Tyr	Ser	
			115					120					125				
	Trp	Arg	Ile	Asn	Gly	Ile	Pro	Gln	Gln	His	Thr	Gln	Val	Leu	Phe	Ile	
35		130					135					140					
	Ala	Lys	Ile	Thr	Pro	Asn	Asn	Asn	Gly	Thr	Tyr	Ala	Cys	Phe	Val	Ser	
	145					150					155					160	
40																	
	Asn	Leu	Ala	Thr	Gly	Arg	Asn	Asn	Ser	Ile	Val	Lys	Ser	Ile	Thr	Val	
					165					170					175		
45	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr	Ser	Pro	Gly	Leu	Ser	Ala	His	His	His	His	His	
				180					185					190			
50	His																
	<210>	68															
	<211>	310															
55	<212>	BIJOK															
	<213>	Macaca fascicularis															
	<220>																
60	<221>	ДОМЕН															
	<222>	(1) .. (286)															

```

<223> домен N-A1-B1 CEACAM5 яванської макаки

<220>
<221> MISC_FEATURE
5 <222> (287)..(310)
<223> розширення з His-міткою

<400> 68

10 Gln Leu Thr Ile Glu Ser Arg Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu
   1             5             10             15

Val Leu Leu Leu Ala His Asn Val Ser Gln Asn Leu Phe Gly Tyr Ile
15             20             25             30

Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Ala Ser Arg Arg Ile Gly Ser Cys
20             35             40             45

Val Ile Arg Thr Gln Gln Ile Thr Pro Gly Pro Ala His Ser Gly Arg
25             50             55             60

Glu Thr Ile Asp Phe Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val Thr Gln
30             65             70             75             80

Ser Asp Thr Gly Ser Tyr Thr Ile Gln Val Ile Lys Glu Asp Leu Val
35             85             90             95

Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe Arg Val Tyr Pro Glu Leu Pro Lys
40             100            105            110

Pro Tyr Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Ile Glu Asp Lys Asp Ala
45             115            120            125

Val Ala Leu Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr Thr Tyr Leu Trp
50             130            135            140

Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Glu Leu Ser
55             145            150            155            160

Ser Asp Asn Arg Thr Leu Thr Val Phe Asn Ile Pro Arg Asn Asp Thr
60             165            170            175

Thr Ser Tyr Lys Cys Glu Thr Gln Asn Pro Val Ser Val Arg Arg Ser
             180            185            190

Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro Thr Ile
             195            200            205

```

Ser Pro Leu Asn Thr Pro Tyr Arg Ala Gly Glu Tyr Leu Asn Leu Thr
210 215 220

5 Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Thr Ala Gln Tyr Phe Trp Phe Val Asn
225 230 235 240

10 Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn Ile Thr
245 250 255

15 Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Met Cys Gln Ala His Asn Ser Ala Thr
260 265 270

Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Ala Ile Thr Val Tyr Ala Ser Gly
275 280 285

20 Ser Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp
290 295 300

25 His His His His His His
305 310

30 <210> 69
<211> 202
<212> БІЛЮК
<213> Macaca fascicularis

35 <220>
<221> ДОМЕН
<222> (1)..(178)
<223> домен A2-B2 CEACAM5 яванської макаки

40 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (179)..(202)
<223> розширення з His-міткою

45 <400> 69

Glu Leu Pro Lys Pro Tyr Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Ile Glu
1 5 10 15

50 Asp Lys Asp Ala Val Thr Leu Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr
20 25 30

55 Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Arg Leu Ser Val Ser Ser Arg
35 40 45

60 Leu Glu Leu Ser Asn Asp Asn Arg Thr Leu Thr Val Phe Asn Ile Pro
50 55 60

UA 120247 C2

```

Arg Asn Asp Thr Thr Phe Tyr Glu Cys Glu Thr Gln Asn Pro Val Ser
65                      70                      75                      80

5  Val Arg Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp
    85                      90                      95

10 Ala Pro Thr Ile Ser Pro Leu Asn Thr Pro Tyr Arg Ala Gly Glu Asn
    100                      105                      110

15 Leu Asn Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Ala Ala Gln Tyr Phe
    115                      120                      125

20 Trp Phe Val Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile
    130                      135                      140

25 Pro Asn Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Met Cys Gln Ala His
    145                      150                      155                      160

30 Asn Ser Ala Thr Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Ala Ile Thr Val
    165                      170                      175

35 Tyr Val Ser Gly Ser Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln
    180                      185                      190

Lys Ile Glu Trp His His His His His His
35      195                      200

<210> 70
<211> 214
<212> БІЛЮК
40 <213> Macaca fascicularis

<220>
<221> ДОМЕН
45 <222> (1)..(190)
    <223> домен A3-B3 CEACAM5 яванської макаки

<220>
<221> MISC_FEATURE
50 <222> (191)..(214)
    <223> розширення з His-міткою

<400> 70

55 Glu Leu Pro Lys Pro Tyr Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Ile Glu
    1                      5                      10                      15

60 Asp Lys Asp Ala Val Thr Leu Thr Cys Glu Pro Val Ala Glu Asn Thr
    20                      25                      30

```

UA 120247 C2

	Thr	Tyr	Leu	Trp	Trp	Val	Asn	Asn	Gln	Ser	Leu	Ser	Val	Ser	Pro	Arg	
			35					40					45				
5	Leu	Gln	Leu	Ser	Asn	Gly	Asn	Arg	Ile	Leu	Thr	Leu	Leu	Ser	Val	Thr	
		50					55					60					
10	Arg	Asn	Asp	Thr	Gly	Pro	Tyr	Glu	Cys	Gly	Ile	Gln	Asn	Ser	Glu	Ser	
	65					70					75					80	
15	Ala	Lys	Arg	Ser	Asp	Pro	Val	Thr	Leu	Asn	Val	Thr	Tyr	Gly	Pro	Asp	
					85					90					95		
20	Thr	Pro	Ile	Ile	Ser	Pro	Pro	Asp	Leu	Ser	Tyr	Arg	Ser	Gly	Ala	Asn	
				100					105					110			
25	Leu	Asn	Leu	Ser	Cys	His	Ser	Asp	Ser	Asn	Pro	Ser	Pro	Gln	Tyr	Ser	
			115					120					125				
30	Trp	Leu	Ile	Asn	Gly	Thr	Leu	Arg	Gln	His	Thr	Gln	Val	Leu	Phe	Ile	
		130					135					140					
35	Ser	Lys	Ile	Thr	Ser	Asn	Asn	Asn	Gly	Ala	Tyr	Ala	Cys	Phe	Val	Ser	
	145					150					155					160	
40	Asn	Leu	Ala	Thr	Gly	Arg	Asn	Asn	Ser	Ile	Val	Lys	Asn	Ile	Ser	Val	
					165					170					175		
45	Ser	Ser	Gly	Asp	Ser	Ala	Pro	Gly	Ser	Ser	Gly	Leu	Ser	Ala	Ser	Gly	
				180					185					190			
50	Ser	Gly	Ser	Gly	Leu	Asn	Asp	Ile	Phe	Glu	Ala	Gln	Lys	Ile	Glu	Trp	
			195					200					205				
55	His	His	His	His	His	His											
		210															
60	<210>	71															
	<211>	344															
	<212>	БИЛОК															
	<213>	Homo sapiens															
55	<400>	71															
	Met	Gly	Pro	Pro	Ser	Ala	Pro	Pro	Cys	Arg	Leu	His	Val	Pro	Trp	Lys	
	1				5					10					15		
60	Glu	Val	Leu	Leu	Thr	Ala	Ser	Leu	Leu	Thr	Phe	Trp	Asn	Pro	Pro	Thr	
				20					25					30			

UA 120247 C2

	Thr	Ala	Lys	Leu	Thr	Ile	Glu	Ser	Thr	Pro	Phe	Asn	Val	Ala	Glu	Gly	
			35					40					45				
5	Lys	Glu	Val	Leu	Leu	Leu	Ala	His	Asn	Leu	Pro	Gln	Asn	Arg	Ile	Gly	
		50					55					60					
10	Tyr	Ser	Trp	Tyr	Lys	Gly	Glu	Arg	Val	Asp	Gly	Asn	Ser	Leu	Ile	Val	
	65					70					75					80	
15	Gly	Tyr	Val	Ile	Gly	Thr	Gln	Gln	Ala	Thr	Pro	Gly	Pro	Ala	Tyr	Ser	
					85					90					95		
20	Gly	Arg	Glu	Thr	Ile	Tyr	Pro	Asn	Ala	Ser	Leu	Leu	Ile	Gln	Asn	Val	
				100					105					110			
25	Thr	Gln	Asn	Asp	Thr	Gly	Phe	Tyr	Thr	Leu	Gln	Val	Ile	Lys	Ser	Asp	
			115					120					125				
30	Leu	Val	Asn	Glu	Glu	Ala	Thr	Gly	Gln	Phe	His	Val	Tyr	Pro	Glu	Leu	
		130					135					140					
35	Pro	Lys	Pro	Ser	Ile	Ser	Ser	Asn	Asn	Ser	Asn	Pro	Val	Glu	Asp	Lys	
	145					150					155					160	
40	Asp	Ala	Val	Ala	Phe	Thr	Cys	Glu	Pro	Glu	Val	Gln	Asn	Thr	Thr	Tyr	
					165					170					175		
45	Leu	Trp	Trp	Val	Asn	Gly	Gln	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Pro	Arg	Leu	Gln	
				180					185					190			
50	Leu	Ser	Asn	Gly	Asn	Met	Thr	Leu	Thr	Leu	Leu	Ser	Val	Lys	Arg	Asn	
			195					200					205				
55	Asp	Ala	Gly	Ser	Tyr	Glu	Cys	Glu	Ile	Gln	Asn	Pro	Ala	Ser	Ala	Asn	
		210					215					220					
60	Arg	Ser	Asp	Pro	Val	Thr	Leu	Asn	Val	Leu	Tyr	Gly	Pro	Asp	Gly	Pro	
	225					230					235					240	
65	Thr	Ile	Ser	Pro	Ser	Lys	Ala	Asn	Tyr	Arg	Pro	Gly	Glu	Asn	Leu	Asn	
					245					250					255		
70	Leu	Ser	Cys	His	Ala	Ala	Ser	Asn	Pro	Pro	Ala	Gln	Tyr	Ser	Trp	Phe	
				260					265					270			
75	Ile	Asn	Gly	Thr	Phe	Gln	Gln	Ser	Thr	Gln	Glu	Leu	Phe	Ile	Pro	Asn	
			275					280					285				

UA 120247 C2

	Ile	Thr	Val	Asn	Asn	Ser	Gly	Ser	Tyr	Met	Cys	Gln	Ala	His	Asn	Ser	
	290						295					300					
5	Ala	Thr	Gly	Leu	Asn	Arg	Thr	Thr	Val	Thr	Met	Ile	Thr	Val	Ser	Gly	
	305					310					315					320	
10	Ser	Ala	Pro	Val	Leu	Ser	Ala	Val	Ala	Thr	Val	Gly	Ile	Thr	Ile	Gly	
					325					330					335		
15	Val	Leu	Ala	Arg	Val	Ala	Leu	Ile									
				340													
	<210>	72															
	<211>	265															
	<212>	BIJOK															
20	<213>	Homo sapiens															
	<400>	72															
25	Met	Gly	Ser	Pro	Ser	Ala	Cys	Pro	Tyr	Arg	Val	Cys	Ile	Pro	Trp	Gln	
	1				5					10					15		
30	Gly	Leu	Leu	Leu	Thr	Ala	Ser	Leu	Leu	Thr	Phe	Trp	Asn	Leu	Pro	Asn	
				20					25					30			
35	Ser	Ala	Gln	Thr	Asn	Ile	Asp	Val	Val	Pro	Phe	Asn	Val	Ala	Glu	Gly	
			35					40					45				
40	Tyr	Asn	Trp	Tyr	Lys	Gly	Glu	Arg	Val	His	Ala	Asn	Tyr	Arg	Ile	Ile	
	65					70					75					80	
45	Gly	Tyr	Val	Lys	Asn	Ile	Ser	Gln	Glu	Asn	Ala	Pro	Gly	Pro	Ala	His	
				85						90					95		
50	Asn	Gly	Arg	Glu	Thr	Ile	Tyr	Pro	Asn	Gly	Thr	Leu	Leu	Ile	Gln	Asn	
				100					105					110			
55	Val	Thr	His	Asn	Asp	Ala	Gly	Phe	Tyr	Thr	Leu	His	Val	Ile	Lys	Glu	
			115					120					125				
60	Asn	Leu	Val	Asn	Glu	Glu	Val	Thr	Arg	Gln	Phe	Tyr	Val	Phe	Ser	Glu	
		130					135					140					
60	Pro	Pro	Lys	Pro	Ser	Ile	Thr	Ser	Asn	Asn	Phe	Asn	Pro	Val	Glu	Asn	
	145					150					155					160	

UA 120247 C2

	Lys	Asp	Ile	Val	Val	Leu	Thr	Cys	Gln	Pro	Glu	Thr	Gln	Asn	Thr	Thr	
					165					170					175		
5	Tyr	Leu	Trp	Trp	Val	Asn	Asn	Gln	Ser	Leu	Leu	Val	Ser	Pro	Arg	Leu	
				180					185					190			
10	Leu	Leu	Ser	Thr	Asp	Asn	Arg	Thr	Leu	Val	Leu	Leu	Ser	Ala	Thr	Lys	
			195					200					205				
15	Asn	Asp	Ile	Gly	Pro	Tyr	Glu	Cys	Glu	Ile	Gln	Asn	Pro	Val	Gly	Ala	
		210					215					220					
20	Ser	Arg	Ser	Asp	Pro	Val	Thr	Leu	Asn	Val	Arg	Tyr	Glu	Ser	Val	Gln	
	225					230					235					240	
25	Ala	Ser	Ser	Pro	Asp	Leu	Ser	Ala	Gly	Thr	Ala	Val	Ser	Ile	Met	Ile	
					245					250					255		
30	Gly	Val	Leu	Ala	Gly	Met	Ala	Leu	Ile								
				260					265								
	<210>	73															
	<211>	349															
	<212>	BIJOK															
	<213>	Homo sapiens															
	<400>	73															
35	Met	Gly	Pro	Ile	Ser	Ala	Pro	Ser	Cys	Arg	Trp	Arg	Ile	Pro	Trp	Gln	
	1				5					10					15		
40	Gly	Leu	Leu	Leu	Thr	Ala	Ser	Leu	Phe	Thr	Phe	Trp	Asn	Pro	Pro	Thr	
				20					25					30			
45	Thr	Ala	Gln	Leu	Thr	Ile	Glu	Ala	Val	Pro	Ser	Asn	Ala	Ala	Glu	Gly	
			35					40					45				
50	Lys	Glu	Val	Leu	Leu	Leu	Val	His	Asn	Leu	Pro	Gln	Asp	Pro	Arg	Gly	
	50						55					60					
55	Tyr	Asn	Trp	Tyr	Lys	Gly	Glu	Thr	Val	Asp	Ala	Asn	Arg	Arg	Ile	Ile	
	65					70				75					80		
60	Gly	Tyr	Val	Ile	Ser	Asn	Gln	Gln	Ile	Thr	Pro	Gly	Pro	Ala	Tyr	Ser	
					85					90					95		
65	Asn	Arg	Glu	Thr	Ile	Tyr	Pro	Asn	Ala	Ser	Leu	Leu	Met	Arg	Asn	Val	
				100					105					110			

UA 120247 C2

	Thr	Arg	Asn	Asp	Thr	Gly	Ser	Tyr	Thr	Leu	Gln	Val	Ile	Lys	Leu	Asn	
			115					120					125				
5	Leu	Met	Ser	Glu	Glu	Val	Thr	Gly	Gln	Phe	Ser	Val	His	Pro	Glu	Thr	
		130					135					140					
10	Pro	Lys	Pro	Ser	Ile	Ser	Ser	Asn	Asn	Ser	Asn	Pro	Val	Glu	Asp	Lys	
	145					150					155					160	
15	Asp	Ala	Val	Ala	Phe	Thr	Cys	Glu	Pro	Glu	Thr	Gln	Asn	Thr	Thr	Tyr	
					165					170					175		
20	Leu	Trp	Trp	Val	Asn	Gly	Gln	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Pro	Arg	Leu	Gln	
				180					185					190			
25	Leu	Ser	Asn	Gly	Asn	Arg	Thr	Leu	Thr	Leu	Leu	Ser	Val	Thr	Arg	Asn	
			195					200					205				
30	Asp	Val	Gly	Pro	Tyr	Glu	Cys	Glu	Ile	Gln	Asn	Pro	Ala	Ser	Ala	Asn	
		210					215					220					
35	Phe	Ser	Asp	Pro	Val	Thr	Leu	Asn	Val	Leu	Tyr	Gly	Pro	Asp	Ala	Pro	
	225					230					235					240	
40	Thr	Ile	Ser	Pro	Ser	Asp	Thr	Tyr	Tyr	His	Ala	Gly	Val	Asn	Leu	Asn	
					245					250					255		
45	Leu	Ser	Cys	His	Ala	Ala	Ser	Asn	Pro	Pro	Ser	Gln	Tyr	Ser	Trp	Ser	
				260					265					270			
50	Val	Asn	Gly	Thr	Phe	Gln	Gln	Tyr	Thr	Gln	Lys	Leu	Phe	Ile	Pro	Asn	
			275					280					285				
55	Ile	Thr	Thr	Lys	Asn	Ser	Gly	Ser	Tyr	Ala	Cys	His	Thr	Thr	Asn	Ser	
		290					295					300					
60	Ala	Thr	Gly	Arg	Asn	Arg	Thr	Thr	Val	Arg	Met	Ile	Thr	Val	Ser	Asp	
	305					310					315					320	
65	Ala	Leu	Val	Gln	Gly	Ser	Ser	Pro	Gly	Leu	Ser	Ala	Arg	Ala	Thr	Val	
				325						330					335		
70	Ser	Ile	Met	Ile	Gly	Val	Leu	Ala	Arg	Val	Ala	Leu	Ile				
				340					345								
75	<210>																74

<211> 120
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 5 <220>
 <223> MAb2_VHg2
 <400> 74
 10 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 15 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Val Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 20 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 25 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 30 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 35 Ala Ala His Tyr Phe Gly Ser Ser Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 40
 <210> 75
 <211> 107
 <212> БІЛОК
 45 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> MAb2_VLg5
 50 <400> 75
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 55 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Phe Ser Tyr
 20 25 30
 60 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asn Thr Arg Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

5 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

10 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Phe
85 90 95

15 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 76
<211> 7
<212> БІЛОК
20 <213> Штучна послідовність

<220>
<223> залишки в положеннях 109-115 АЗВЗ СЕАСАМ5 людини

25 <400> 76

Ser Gly Ala Asn Leu Asn Leu
1 5

30 <210> 77
<211> 13
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

35 <220>
<223> залишки в положеннях 131-143 АЗВЗ СЕАСАМ5 людини

<400> 77

40 Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln His Thr Gln Val Leu Phe
1 5 10

45 <210> 78
<211> 8
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

50 <220>
<223> КОДУЮЧА ПОСЛІДОВНІСТЬ

<220>
<221> MISC_FEATURE
55 <222> (3)..(3)
<223> Хаа являє собою Т, А або V

<400> 78

60 Gly Phe Xaa Phe Ser Ser Tyr Asp
1 5

<210> 79
 <211> 8
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 5
 <220>
 <223> КОДУЮЧА ПОСЛІДОВНІСТЬ

 10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Хаа являє собою S або N (зокрема S)

 15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Хаа являє собою Y або G (зокрема G)

 20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Хаа являє собою R або I (зокрема I)

 25 <400> 79

 Ile Xaa Ser Xaa Gly Gly Xaa Thr
 1 5

 30
 <210> 80
 <211> 13
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 35
 <220>
 <223> КОДУЮЧА ПОСЛІДОВНІСТЬ

 40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Хаа являє собою A або T (зокрема A)

 45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Хаа являє собою T або S (зокрема S)

 50 <400> 80

 Xaa Ala His Tyr Phe Gly Xaa Ser Gly Pro Phe Ala Tyr
 1 5 10

 55
 <210> 81
 <211> 8
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність
 60
 <220>

<223> КОДУЮЧА ПОСЛІДОВНІСТЬ

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Хаа являє собою R або S, зокрема S

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> Хаа являє собою A або D

15 <400> 81
 Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Tyr Xaa
 1 5

20 <210> 82
 <211> 8
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

25 <220>
 <223> КОДУЮЧА ПОСЛІДОВНІСТЬ

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Хаа відсутній, являє собою S або G (зокрема G)

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Хаа являє собою D, Y або I

40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> Хаа являє собою T або I (зокрема T)

45 <400> 82
 Ile Ser Ser Gly Gly Xaa Xaa Xaa
 1 5

50 <210> 83
 <211> 8
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

55 <220>
 <223> КОДУЮЧА ПОСЛІДОВНІСТЬ

60 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(6)

<223> Хаа являє собою будь-яку амінокислоту

<400> 83

5 Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Tyr Asp
1 5

10 <210> 84
<211> 13
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

15 <220>
<223> КОДУЮЧА ПОСЛІДОВНІСТЬ

20 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Хаа являє собою будь-яку амінокислоту

25 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Хаа являє собою А або S

30 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Хаа являє собою Y, F або W

35 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(8)
<223> Хаа являє собою будь-яку амінокислоту

40 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> Хаа являє собою будь-яку амінокислоту

45 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> Хаа являє собою будь-яку амінокислоту

<400> 84

50 Хаа Хаа His Хаа Phe Gly Хаа Хаа Gly Pro Хаа Ala Хаа
1 5 10

55 <210> 85
<211> 6
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

60 <220>
<223> КОДУЮЧА ПОСЛІДОВНІСТЬ

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(3)
 <223> Хаа являє собою будь-яку амінокислоту
 5
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Хаа являє собою Y, F або W
 10
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Хаа являє собою будь-яку амінокислоту
 15
 <400> 85
 Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Tyr
 1 5
 20
 <210> 86
 <211> 9
 <212> БІЛОК
 25 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> КОДУЮЧА ПОСЛІДОВНІСТЬ
 30
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(2)
 <223> Хаа являє собою будь-яку амінокислоту
 35
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Хаа являє собою Y, F або W
 40
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(6)
 <223> Хаа являє собою будь-яку амінокислоту
 45
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(9)
 <223> Хаа являє собою будь-яку амінокислоту
 50
 <400> 86
 Хаа Хаа His Хаа Хаа Хаа Pro Хаа Хаа
 1 5
 55
 <210> 87
 <211> 449
 <212> БІЛОК
 60 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> послідовність важкого ланцюга huMAb2-3

<400> 87

5

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

10

Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Val Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

15

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Arg Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

20

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ile Thr Tyr Ala Pro Ser Thr Val
50 55 60

25

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

30

Ala Ala His Tyr Phe Gly Ser Ser Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

35

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

40

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

45

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

50

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

55

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

60

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

UA 120247 C2

	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	
	225					230				235						240	
5	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	
					245					250					255		
10	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	
				260					265					270			
15	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
			275					280					285				
20	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	
		290					295					300					
25	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	
	305					310					315					320	
30	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	
					325					330					335		
35	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	
				340					345					350			
40	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	
			355					360					365				
45	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	
		370					375					380					
50	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	
	385					390					395					400	
55	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	
					405					410					415		
60	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	
				420					425					430			
65	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	
			435					440					445				
70	Gly																
75																	
80	<210>																88

<211> 214
 <212> БІЛОК
 <213> Штучна послідовність

5 <220>
 <223> послідовність легкого ланцюга huMAb2-3

<400> 88

10 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

15 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Phe Ser Tyr
 20 25 30

20 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Val
 35 40 45

Tyr Asn Thr Arg Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

25 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

30 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Phe
 85 90 95

35 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

40 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

45 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

50 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

55 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

60 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

5 <210> 89
<211> 449
<212> БІЛОК
<213> Штучна послідовність

10 <220>
<223> VH1-IgG1 важкого ланцюга MAb2

<400> 89

15 Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

20 Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Val Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

25 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Arg Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ile Thr Tyr Phe Pro Ser Thr Val
50 55 60

30 Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

35 Leu Gln Met Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

40 Ala Ala His Tyr Phe Gly Ser Ser Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

45 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

50 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

55 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

60 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

UA 120247 C2

	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys
			195					200					205			
5	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp
		210					215					220				
10	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly
	225					230					235					240
	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile
				245						250					255	
15	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu
				260					265					270		
20	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His
			275					280					285			
25	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg
		290					295					300				
30	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys
	305					310					315					320
	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu
					325					330					335	
35	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr
				340					345					350		
40	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu
			355					360					365			
45	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp
		370					375					380				
50	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val
	385					390					395					400
	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp
					405					410					415	
55	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His
				420					425					430		
60	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro
			435					440					445			
	Gly															

<210> 90
 <211> 214
 <212> БІЛЮК
 <213> Штучна послідовність
 5
 <220>
 <223> VL1d легкого ланцюга MAb2
 <400> 90
 10 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 15 Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Phe Ser Tyr
 20 25 30
 20 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Val
 35 40 45
 Tyr Asn Thr Arg Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 25 Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 30 Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Phe
 85 90 95
 35 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 40 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 45 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 50 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 55 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 60 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Виділене антитіло або його зв'язувальний фрагмент, що зв'язується з доменом A3-B3 білків CEACAM5 людини і *Macaca fascicularis*, що містить:
 - а) CDR1-H послідовності SEQ ID NO:1, CDR2-H послідовності SEQ ID NO:2, CDR3-H послідовності SEQ ID NO:3; CDR1-L послідовності SEQ ID NO:4, CDR2-L послідовності SAS і CDR3-L послідовності SEQ ID NO:6; або
 - б) CDR1-H послідовності SEQ ID NO:7, CDR2-H послідовності SEQ ID NO:8, CDR3-H послідовності SEQ ID NO:9; CDR1-L послідовності SEQ ID NO:10, CDR2-L послідовності NTK або NTR і CDR3-L послідовності SEQ ID NO:12; або
 - в) CDR1-H послідовності SEQ ID NO:13, CDR2-H послідовності SEQ ID NO:14, CDR3-H послідовності SEQ ID NO:15; CDR1-L послідовності SEQ ID NO:16, CDR2-L послідовності SAS і CDR3-L послідовності SEQ ID NO:18; або
 - г) CDR1-H послідовності SEQ ID NO:19, CDR2-H послідовності SEQ ID NO:20, CDR3-H послідовності SEQ ID NO:21; CDR1-L послідовності SEQ ID NO:22, CDR2-L послідовності NAK і CDR3-L послідовності SEQ ID NO:24; або
 - д) CDR1-H послідовності SEQ ID NO:25, CDR2-H послідовності SEQ ID NO:26, CDR3-H послідовності SEQ ID NO:27; CDR1-L послідовності SEQ ID NO:28; CDR2-L послідовності NAK і CDR3-L послідовності SEQ ID NO:30.
2. Виділене антитіло або його зв'язувальний фрагмент за п. 1, що:
 - а) зв'язується з доменом A3-B3 білків CEACAM5 людини і *Macaca fascicularis*; і
 - б) по суті перехресно не реагує з CEACAM1 людини, CEACAM6 людини, CEACAM7 людини, CEACAM8 людини, CEACAM1 *Macaca fascicularis*, CEACAM6 *Macaca fascicularis* і CEACAM8 *Macaca fascicularis*, де антитіло або його зв'язувальний фрагмент містить варіабельний домен важкого ланцюга і легкого ланцюга антитіла, вибраного з групи, що складається з:
 - а) антитіла, що містить варіабельний домен важкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:31 і варіабельний домен легкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:32;
 - б) антитіла, що містить варіабельний домен важкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:33 і варіабельний домен легкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:34;
 - в) антитіла, що містить варіабельний домен важкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:33 і варіабельний домен легкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:34, в якому K в положенні 52 замінений на R;
 - г) антитіла, що містить варіабельний домен важкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:35 і варіабельний домен легкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:36;
 - д) антитіла, що містить варіабельний домен важкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:37 і варіабельний домен легкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:38; і
 - е) антитіла, що містить варіабельний домен важкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:39 і варіабельний домен легкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:40.
3. Антитіло або його зв'язувальний фрагмент за п. 1 або 2, що зв'язується з доменом A3-B3 CEACAM5 людини і *Macaca fascicularis*:
 - а) зі співвідношенням афінності відносно CEACAM5 людини і афінності відносно CEACAM5 *Macaca fascicularis*, що дорівнює ≤ 12 ; або
 - б) з афінністю відносно CEACAM5 людини і/або CEACAM5 *Macaca fascicularis*, що дорівнює ≤ 10 нМ, або
 - в) і а, і б.
4. Антитіло або його зв'язувальний фрагмент за п. 1 або 2, що зв'язується з двома областями домена A3-B3 білка CEACAM5 людини, що містить послідовності SEQ ID NO:76 і SEQ ID NO:77, відповідно.
5. Антитіло або його зв'язувальний фрагмент за будь-яким із пп. 1-4, що містить:
 - а) варіабельний домен важкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:31 і варіабельний домен легкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:32; або
 - б) варіабельний домен важкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:33 і варіабельний домен легкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:34; або
 - в) варіабельний домен важкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:35 і варіабельний домен легкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:36; або
 - г) варіабельний домен важкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:37 і варіабельний домен легкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:38; або
 - д) варіабельний домен важкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:39 і варіабельний домен

легкого ланцюга послідовності SEQ ID NO:40.

6. Антитіло або його зв'язувальний фрагмент за будь-яким із пп. 1-5, що є химерним або гуманізованим антитілом.

7. Антитіло або його зв'язувальний фрагмент за будь-яким із пп. 1-6, що містить:

5 а) важкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO:41 і легкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO:42; або

б) важкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO:43 і легкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO:44; або

10 в) важкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO:45 і легкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO:46; або

д) важкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO:47 і легкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO:48; або

е) важкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO:49 і легкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO:50.

8. Антитіло або його зв'язувальний фрагмент за будь-яким із пп. 1-6, який містить:

15 а) важкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:5 або SEQ ID NO:74; і

б) легкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:55 або SEQ ID NO:75.

9. Антитіло або його зв'язувальний фрагмент за будь-яким із пп. 1-8, який містить:

20 а) важкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO:51 і легкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO:17, або

б) важкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO:5 і легкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO:23, або

в) важкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO:5 і легкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO:29, або

25 д) важкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO:51 і легкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO:55, або

е) важкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO:74 і легкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO:75.

10. Виділене антитіло або зв'язувальний фрагмент, що зв'язується з доменом A3-B3 білків CEACAM5 людини і *Macaca fascicularis*, і що містить:

30 а) важкий ланцюг, що складається з послідовності SEQ ID NO:87 і

б) легкий ланцюг, що складається з послідовності SEQ ID NO:88.

11. Антитіло або його зв'язувальний фрагмент за будь-яким із пп. 1-10, що являє собою біспецифічне або мультиспецифічне антитіло.

35 12. Антитіло або його зв'язувальний фрагмент за будь-яким із пп. 1-11, де фрагмент вибраний з групи, що складається з Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, (dsFv)₂, scFv, sc(Fv)₂ і діатіл.

13. Виділена нуклеїнова кислота, що містить послідовність, що кодує антитіло або його зв'язувальний фрагмент за будь-яким із пп. 1-12.

14. Клітина-хазяїн для експресії антитіла або його зв'язувального фрагмента за будь-яким із пп. 1-12, яка була трансформована нуклеїновою кислотою за п. 13.

40 15. Імунокон'югат, що містить антитіло або його зв'язувальний фрагмент за будь-яким із пп. 1-12, кон'югований або пов'язаний щонайменше з одним інгібуючим ріст агентом.

16. Імунокон'югат за п. 15, де вказаний інгібуючий ріст агент являє собою цитотоксичний засіб або радіоактивний ізотоп.

45 17. Імунокон'югат за п. 15 або 16, де вказаний інгібуючий ріст агент вибраний з групи, що складається з хіміотерапевтичних засобів, ферментів, антибіотиків і токсинів, таких як низькомолекулярні токсини або ферментативно активні токсини, таксоїдів, алкалоїдів барвінку, таксанів, майтанзиноїду або аналогів майтанзиноїду, томамїцину або похідних піролобензодіазепіну, похідних криптофіцину, похідних лептопіцину, ауристатину або аналогів доластатину, пролікарських засобів, інгібіторів топоізомерази II, ДНК-алкілюючого засобу, антитубулінових засобів і CC-1065 або аналогів CC-1065.

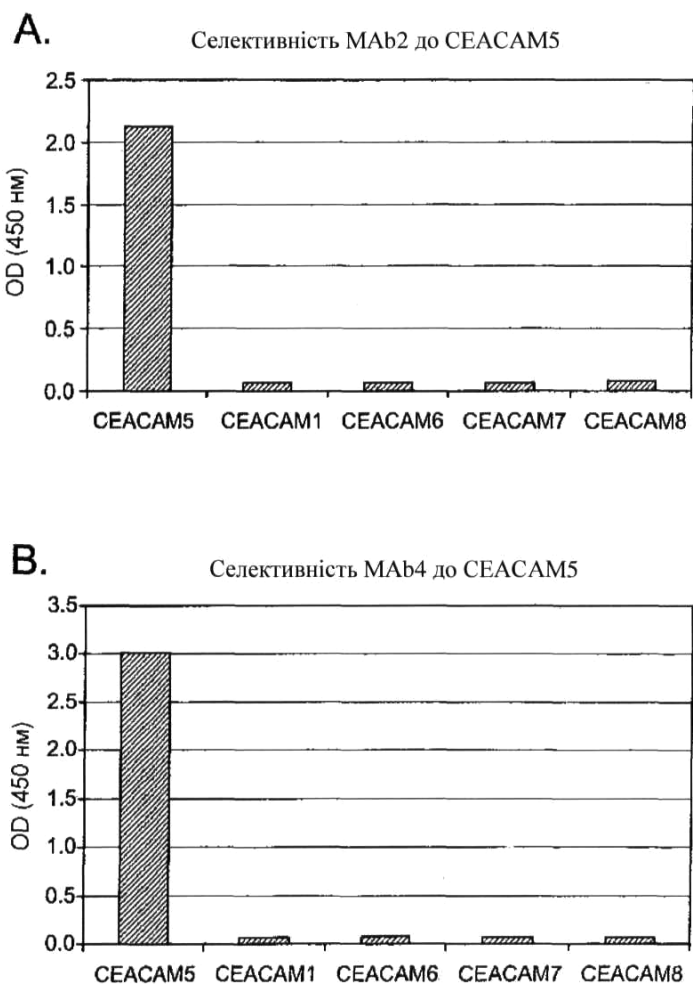
50 18. Імунокон'югат за пп. 15-17, де вказаний інгібуючий ріст агент являє собою (N²-деацетил-N²-(3-меркапто-1-оксопропіл)майтанзин) DM1 або N²-деацетил-N²-(4-метил-4-меркапто-1-оксопентил)майтанзин (DM4).

55 19. Імунокон'югат за будь-яким із пп. 15-18, де антитіло ковалентно зв'язано розщеплюваним або нерозщеплюваним лінкером щонайменше з одним інгібуючим ріст агентом.

20. Імунокон'югат за п. 19, де вказаний лінкер вибраний з групи, що складається з N-сукцинімідилпіридилдитіобутирату (SPDB), 4-(піридин-2-ілдисульфаніл)-2-сульфомасляної кислоти (сульфо-SPDB) і сукцинімідил(N-малеїмідометил)циклогексан-1-карбоксилату (SMCC).

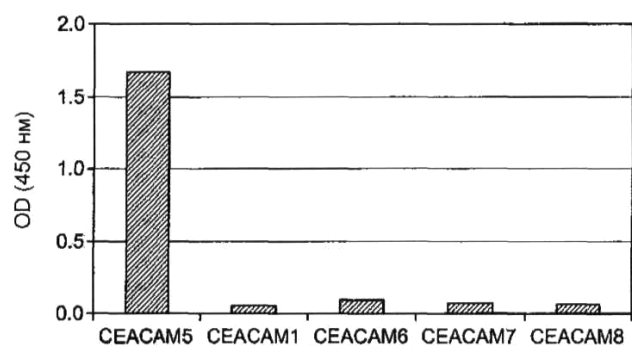
60 21. Імунокон'югат за будь-яким із пп. 15-20, де антитіло містить важкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO:5 і легкий ланцюг з послідовністю SEQ ID NO:29.

22. Імунокон'югат за будь-яким із пп. 15-21, де імунокон'югат характеризується відношенням лікарського засобу до антитіла (DAR) в діапазоні від 1 до 10.
23. Імунокон'югат за будь-яким із пп. 15-22, де антитіло містить важкий ланцюг, що складається з послідовності SEQ ID NO:87, і легкий ланцюг, що складається з послідовності SEQ ID NO:88.
- 5 24. Фармацевтична композиція для лікування злоякісного новоутворення, що містить антитіло за будь-яким із пп. 1-12 або імунокон'югат за будь-яким із пп. 15-23 і фармацевтично прийнятний носій.
25. Застосування антитіла або його зв'язувального фрагмента за будь-яким із пп. 1-12 для лікування злоякісного новоутворення.
- 10 26. Застосування за п. 25, де злоякісним новоутворенням є злоякісне новоутворення, що експресує CEACAM5.
27. Застосування за п. 25 або 26, де злоякісна пухлина являє собою колоректальний рак, рак шлунка, легень, шийки матки, підшлункової залози, стравоходу, яєчника, щитовидної залози, сечового міхура, ендометрія, молочної залози, печінки, передміхурової залози або шкіри.
- 15 28. Застосування імунокон'югата за будь-яким із пп. 15-23 для лікування злоякісного новоутворення.
29. Застосування за п. 28, де злоякісним новоутворенням є злоякісне новоутворення, що експресує CEACAM5.
30. Застосування за п. 28 або 29, де злоякісна пухлина являє собою колоректальний рак, рак шлунка, легень, шийки матки, підшлункової залози, стравоходу, яєчника, щитовидної залози, сечового міхура, ендометрія, молочної залози, печінки, передміхурової залози або шкіри.
- 20 31. Застосування антитіла фармацевтичної композиції за п. 24 для лікування злоякісного новоутворення.
32. Застосування за п. 31, де злоякісним новоутворенням є злоякісне новоутворення, що експресує CEACAM5.
- 25 33. Застосування за п. 31 або 32, де злоякісна пухлина являє собою колоректальний рак, рак шлунка, легень, шийки матки, підшлункової залози, стравоходу, яєчника, щитовидної залози, сечового міхура, ендометрія, молочної залози, печінки, передміхурової залози або шкіри.
34. Застосування антитіла або його зв'язувального фрагмента за будь-яким із пп. 1-12 для ex vivo детекції експресії CEACAM5 в біологічному зразку, взятому у індивідуума.
- 30 35. Застосування за п. 34, де вказане антитіло має детектовану молекулу або речовину.
36. Застосування за п. 34 або 35, яке призначене для діагностики присутності у індивідуума злоякісної пухлини, визначення сприйнятливості пацієнта зі злоякісною пухлиною до терапевтичного засобу, націленого на CEACAM5, або контролю ефективності терапії злоякісної пухлини, яка несе CEACAM5, або детекції рецидиву злоякісної пухлини після терапії злоякісної пухлини, яка несе CEACAM5.
- 35

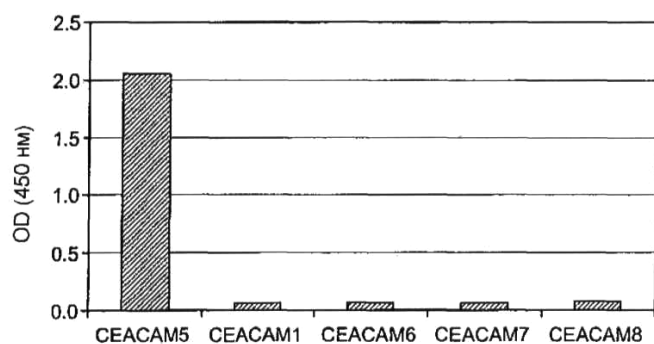


Фіг. 1 Початок

C. Селективність MAb3 до CEACAM5

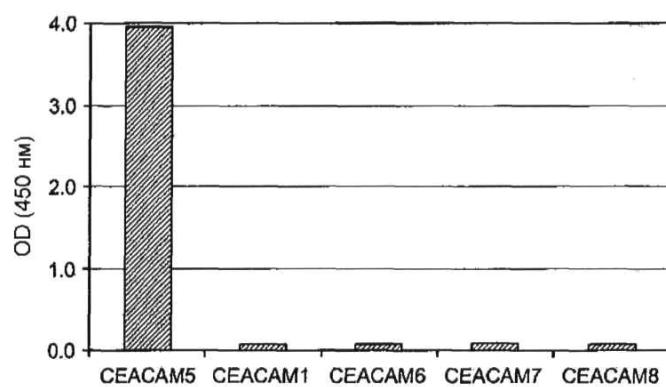


D. Селективність MAb5 до CEACAM5

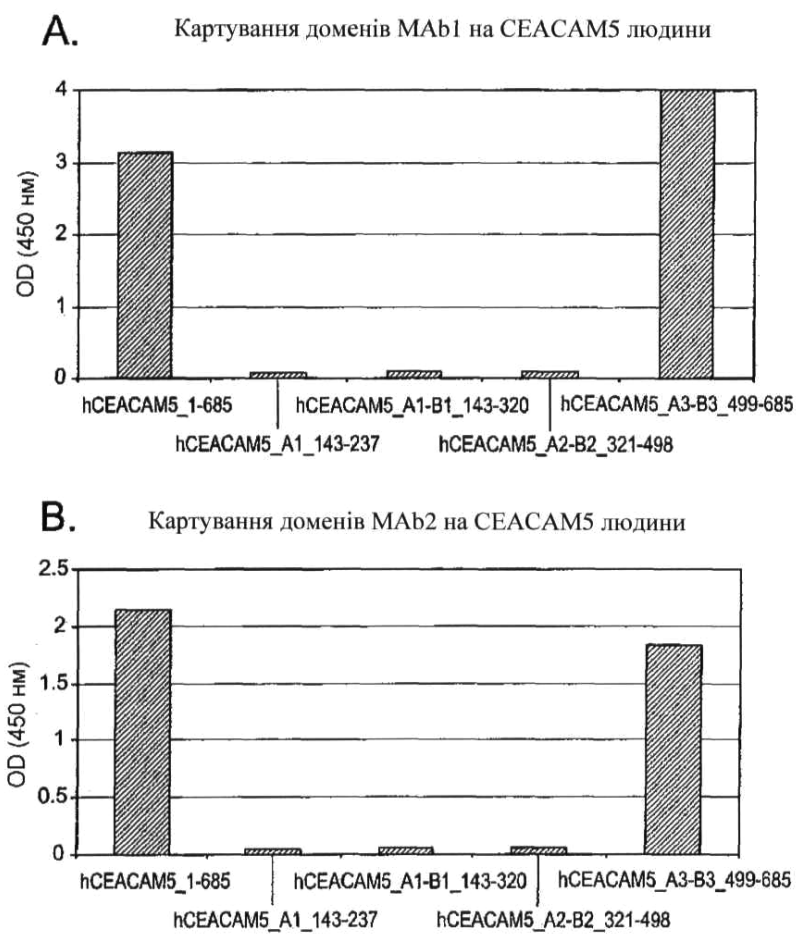


Фіг. 1 Продовження

E. Селективність MAb1 до CEACAM5

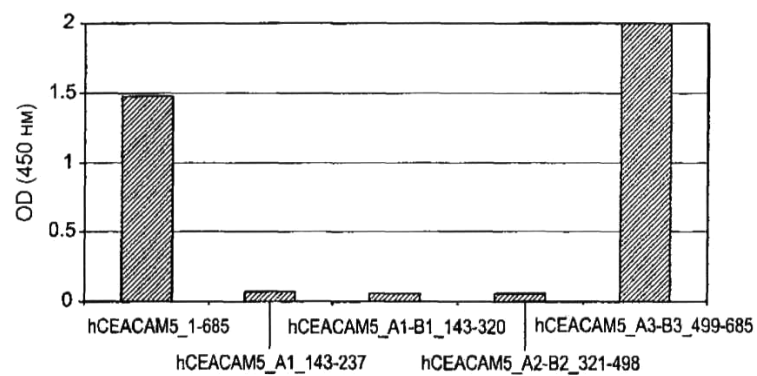


Фіг. 1 Кінець

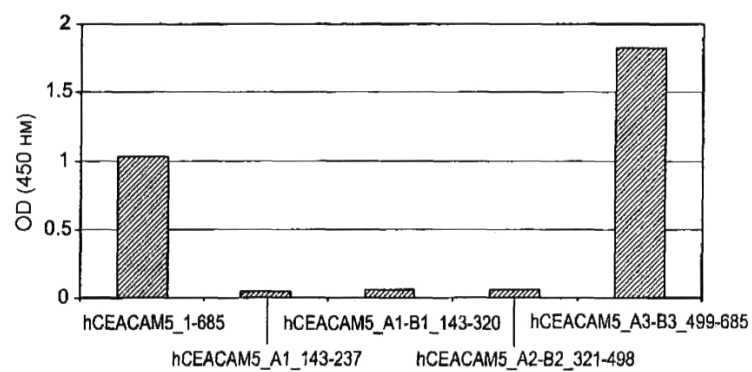


Фіг. 2 Початок

C. Картування доменів MAb1 на CEACAM5 людини

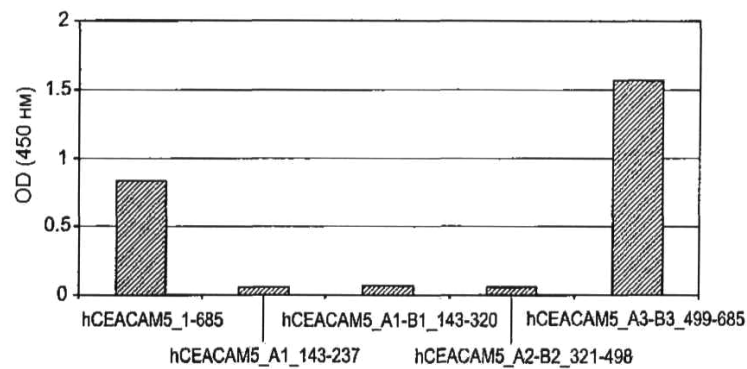


D. Картування доменів MAb3 на CEACAM5 людини



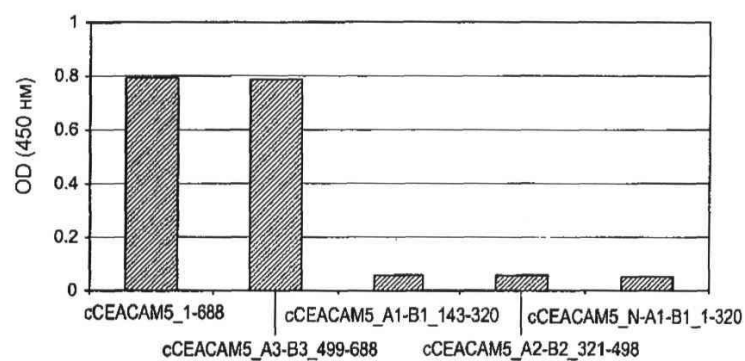
Фіг. 2 Продовження

E. Картування доменів MAb5 на CEACAM5 людини

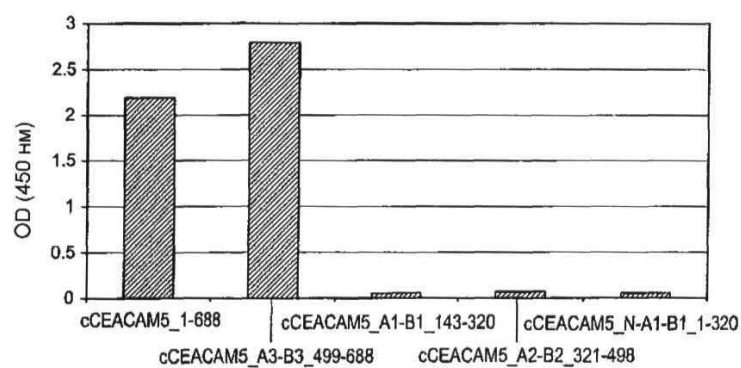


Фіг. 2 Кінець

A. Картування доменів MAb1 на CEACAM5 Суно



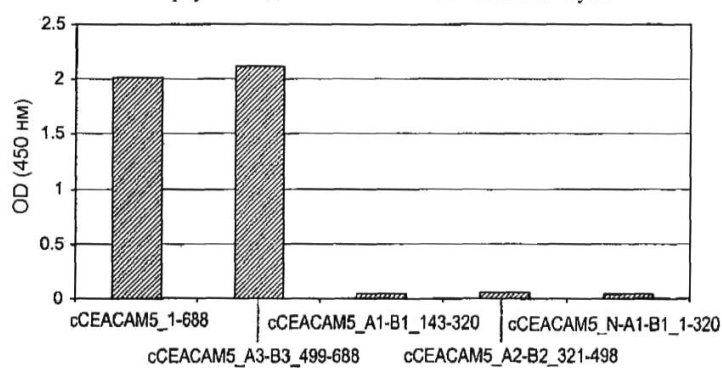
B. Картування доменів MAb2 на CEACAM5 Суно



Фіг. 3 Початок

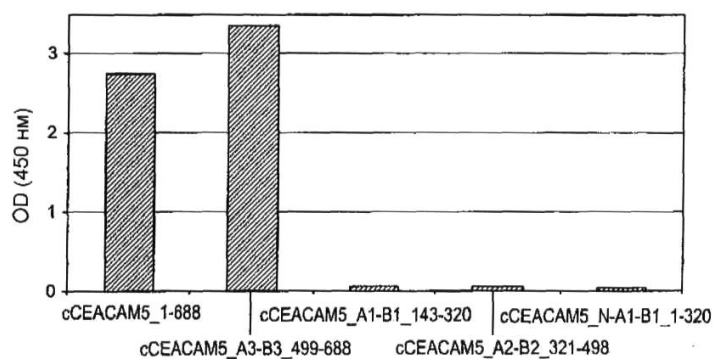
C.

Картування доменів MAb3 на CEACAM5 Суно



D.

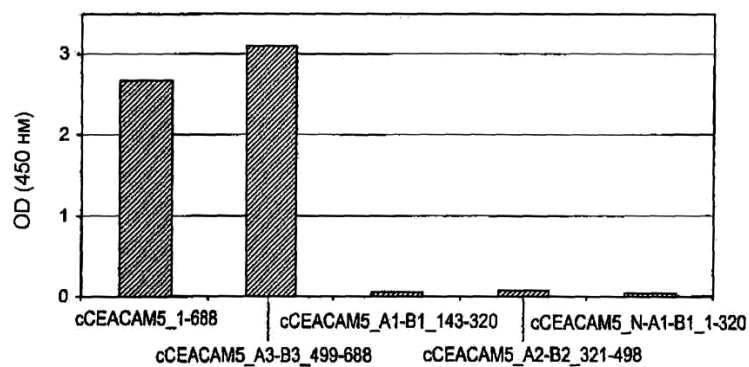
Картування доменів MAb4 на CEACAM5 Суно



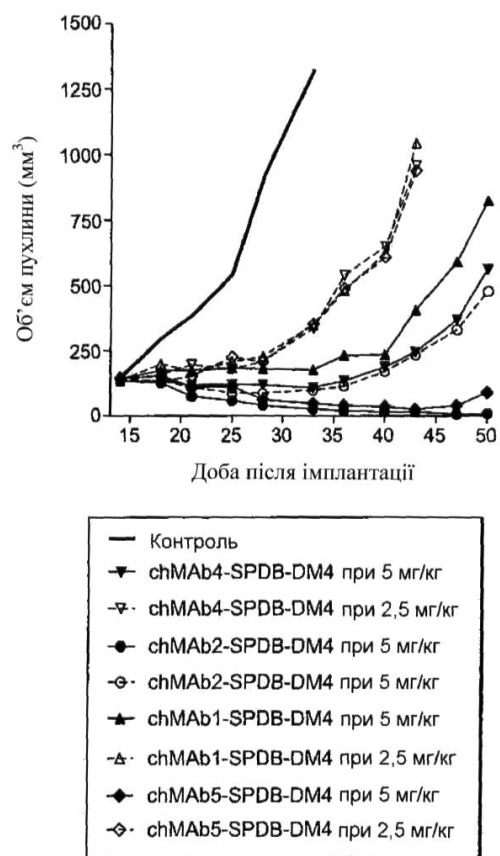
Фіг. 3 Продовження

E.

Картування доменів MAb5 на CEACAM5 Суно



Фіг. 3 Кінець



Фіг. 4

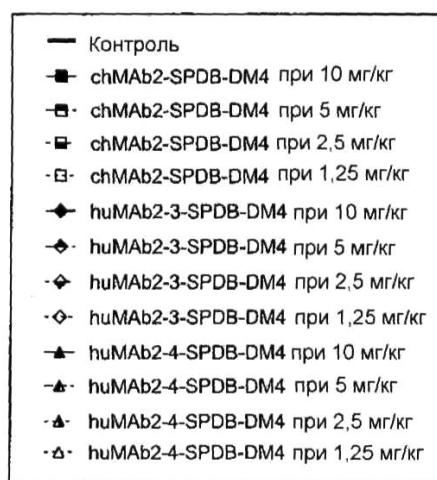
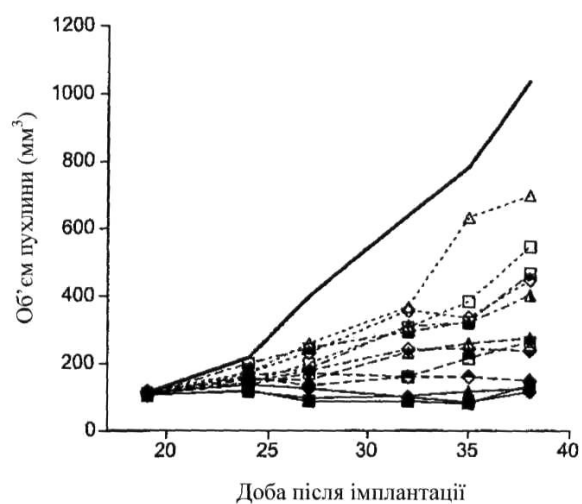
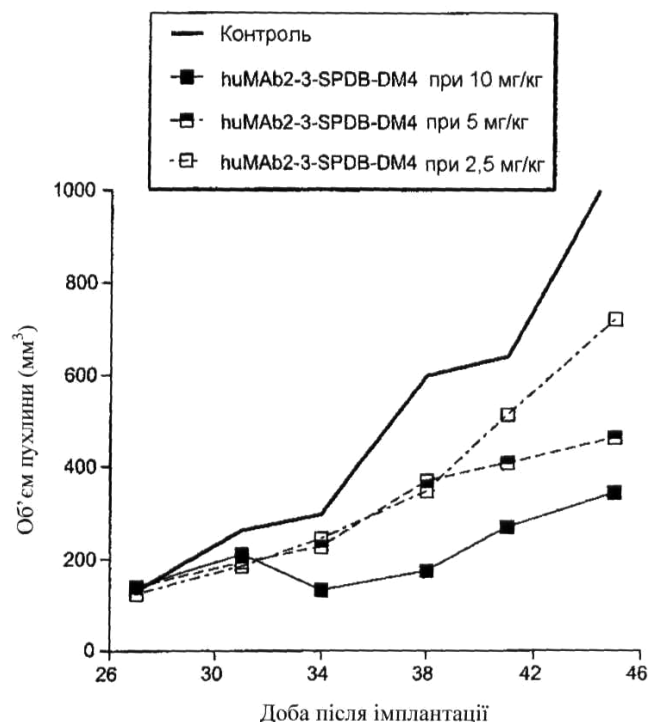


Fig. 5



Фиг. 6

MAb3 VH	(1)	EVKLVESGGGLVKPGGSLTLPCAAS GFTFSRY AMSWVRQTPEKRLEWVAS ISSGG-DT YY
MAb1 VH	(1)	EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAAS GFTFSSY AMSWVRQTPEKRLEWVAT ISSGGSYI YY
MAb4 VH	(1)	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAAS GFTFSSYD MSWVRQTPEKRLEWVAF ISSYGCRT YY
MAb5 VH	(1)	ELQLVESGGVLVKPGGSLKLSCAAS GFAFSSYD MSWVRQTPEKRLEWVTY INSGGGIT YY
MAb2 VH	(1)	EVQLQESGGVLVKPGGSLKLSCAAS GFVFSSYD MSWVRQTPEKRLEWVAY ISSGGGIT YF

MAb3 VH	(60)	PDSVKGRFTVSRDNARNILFLQMSLLRSED TGMYYCAR VNYYDSSF LDDWGQGTTLTVSS
MAb1 VH	(61)	LDSVKGRFTISRDNANTLYLQMSLLRSED TAMYCAR PAYYGNP AMDYWGQGTSTVTVSS
MAb4 VH	(61)	ADTVKGRFTISRDNANTLYLQMSLLKSED TAMYFCA AAHYFGTSGPF AYWGQGTTLVTVSE
MAb5 VH	(61)	PDTVKGRFTISRDNARNTLYLQMSLLKSED TAIYYC TAHYFGSSGPF AYWGQGTTLVTVSA
MAb2 VH	(61)	PDTVQGRFTVSRDNANTLYLQMNLSKSED TAIYYC AAHYFGSSGPF AYWGQGTTLVTVSA

MAb3 VH	(1)	DIVMTQSQRFMSTLEGDRVSVTCAS QNVGT NVAWYQQKPGQSPKALIY SAS YRYSGVDP
MAb1 VH	(1)	DILMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCAS QNVGT NVAWYQQKPGQSPKPLIY SAS YRYSGVDP
MAb4 VH	(1)	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRAS ENIYSY FAWYQQKQKSPQLLVY NAK ILAEGVPS
MAb5 VH	(1)	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRAS ENIYSY LAWYQQKQKSPQLLVY NAK ILTEGVPS
MAb2 VH	(1)	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRAS ENIFS YLAWYQQKQKSPQLLVY NTK ILAEGVPS

MAb3 VH	(61)	RFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFC QQYNNYPLY TFGGGSKLEIK
MAb1 VH	(61)	RFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFC QQYNSYPLY TFGGGSKLEIK
MAb4 VH	(61)	RFTGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGTYIC QH HYGIP-FTFGSGTKLEIK
MAb5 VH	(61)	RFTGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYIC QH HYGTP-FTFGSGTKLEIK
MAb2 VH	(61)	RFTGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYIC QH HYGTP-FTFGSGTKLEIK

Фиг. 7

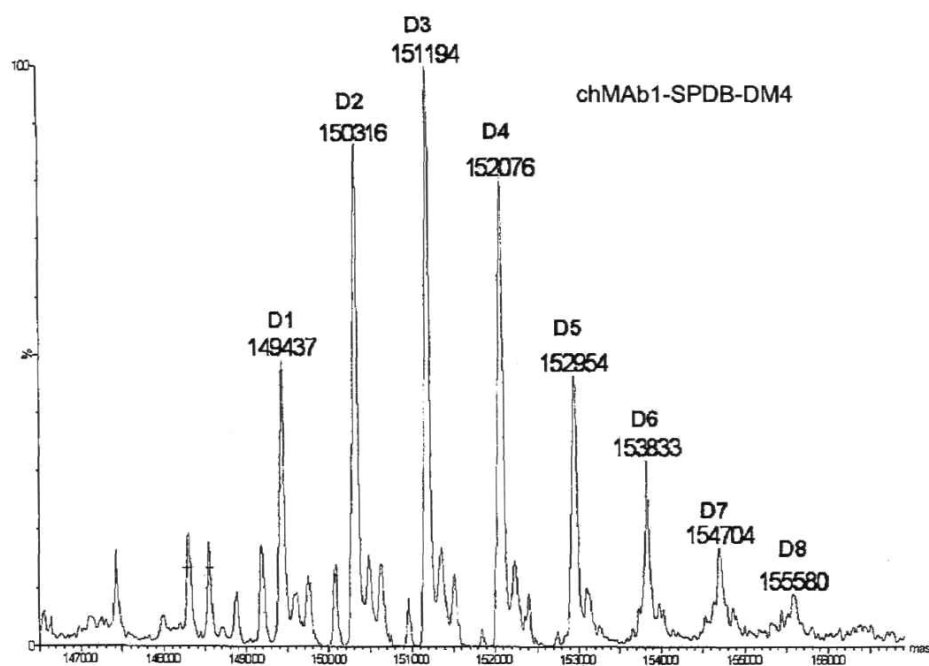


Fig. 8

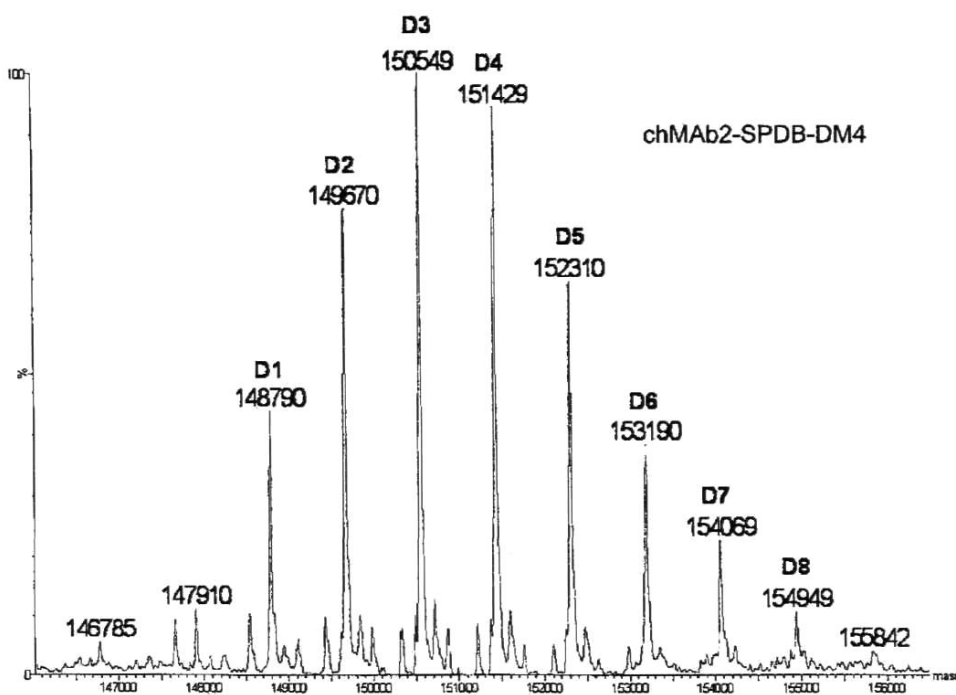


Fig. 9

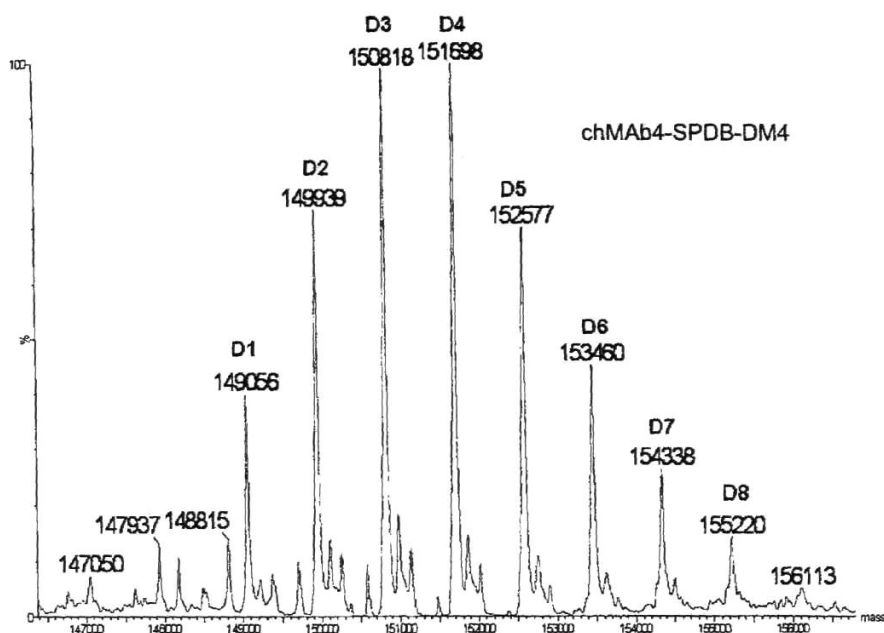


Fig. 10

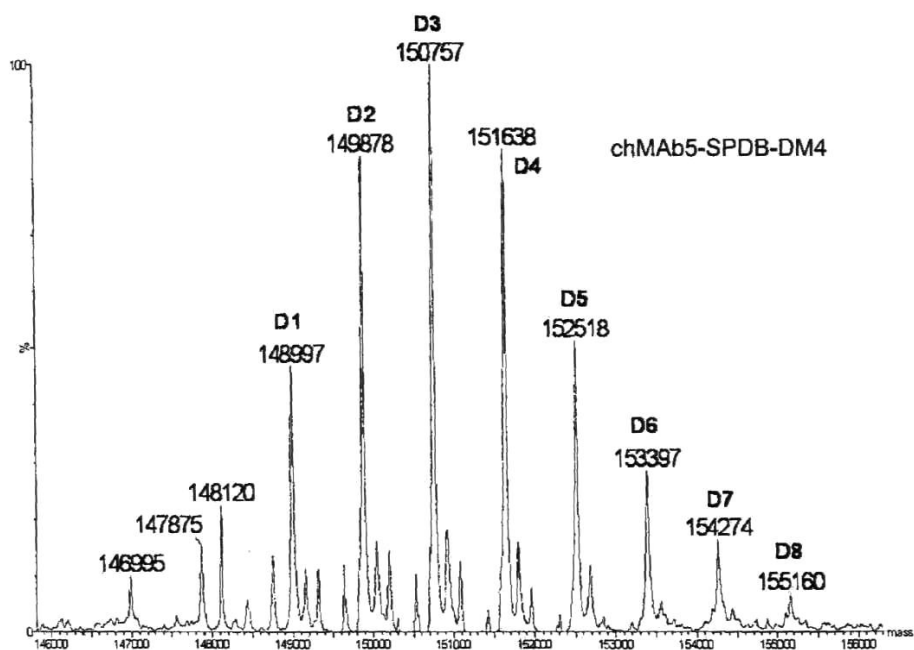


Fig. 11

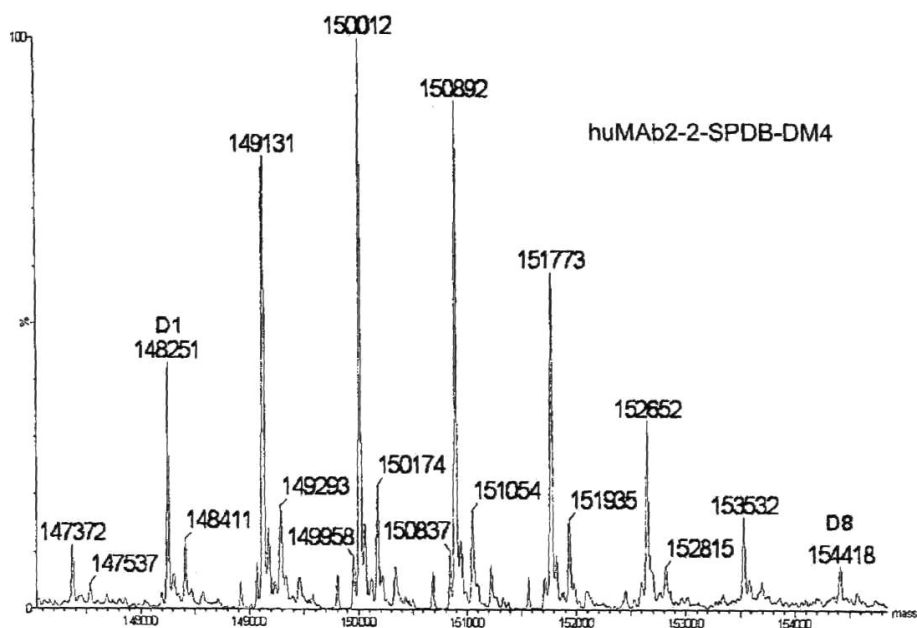


Fig. 12

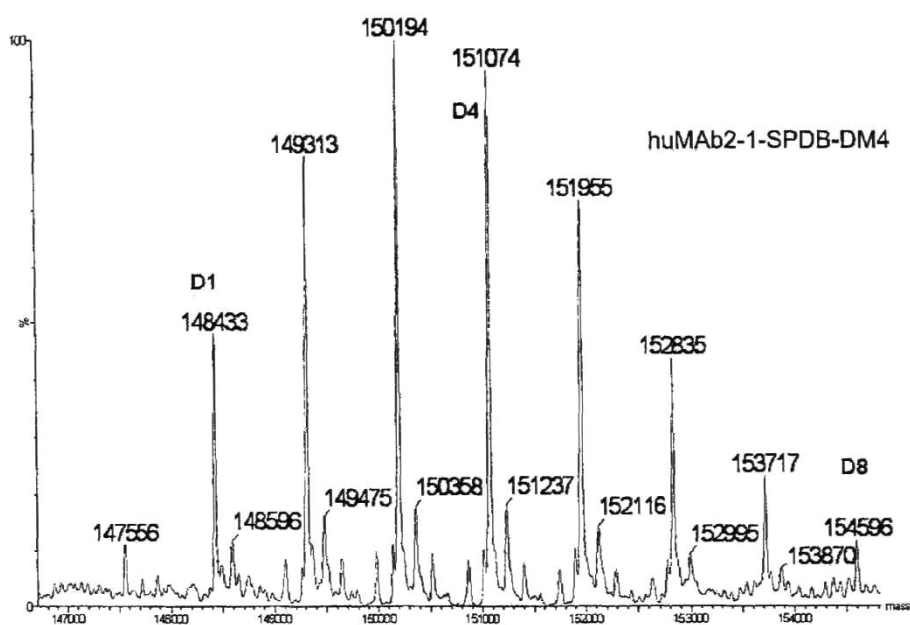


Fig. 13

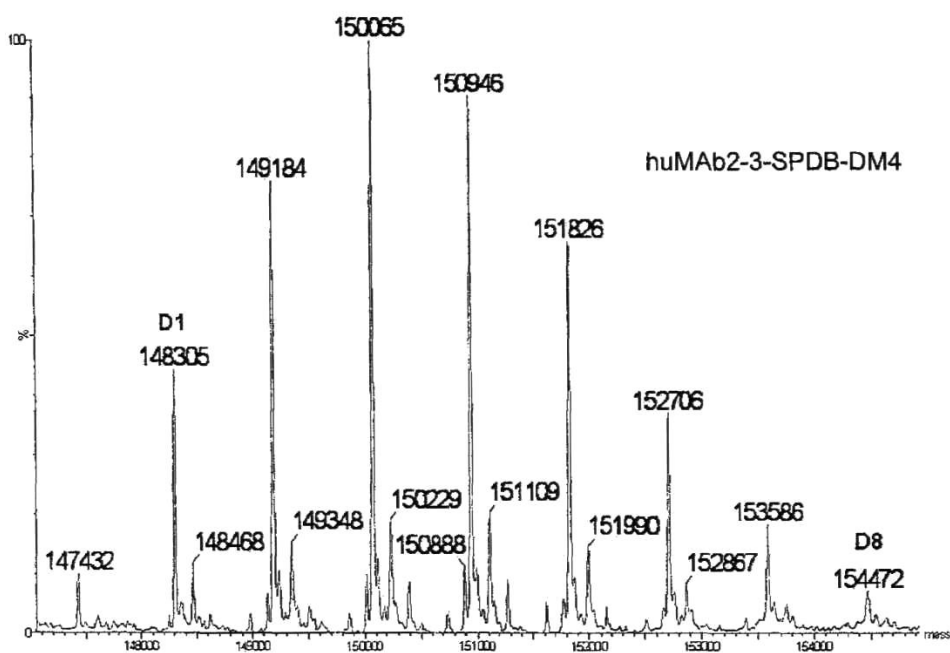


Fig. 14

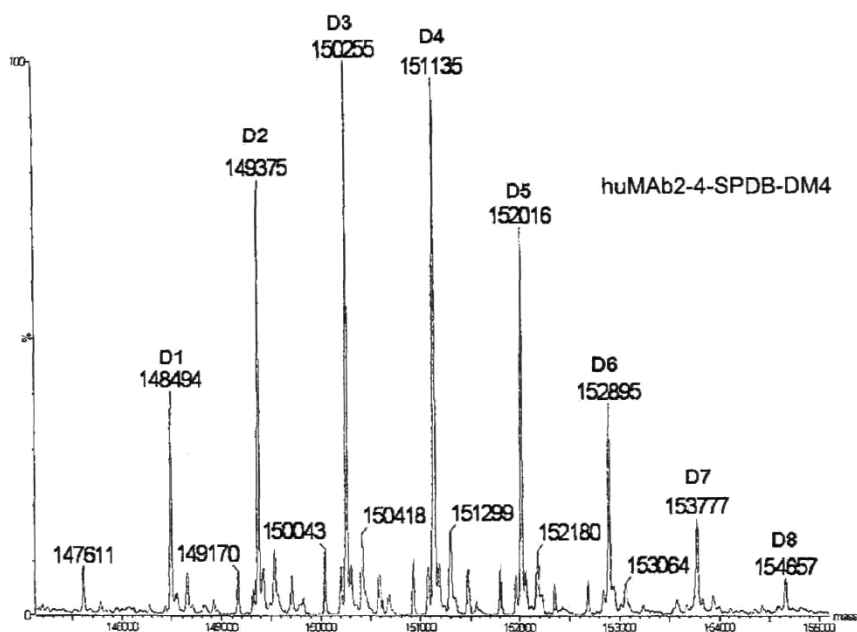


Fig. 15



Fig. 16

% сигналу, що залишився, через 50 секунд

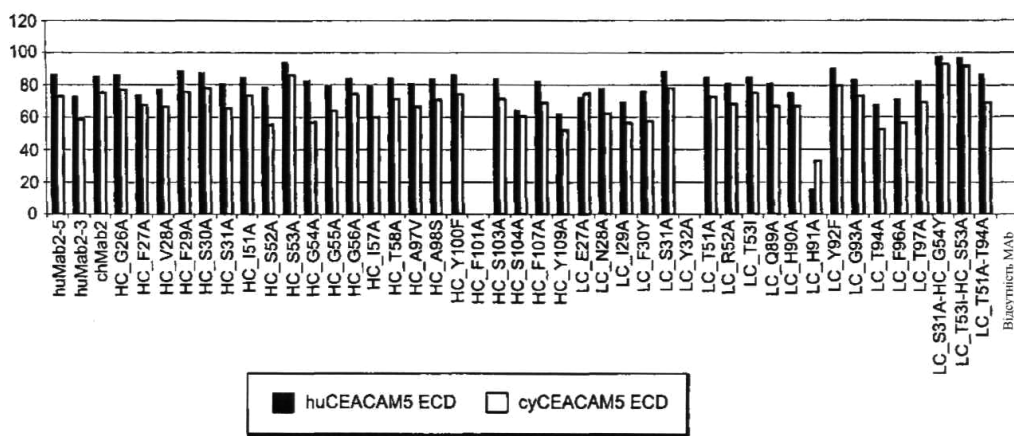


Fig. 17

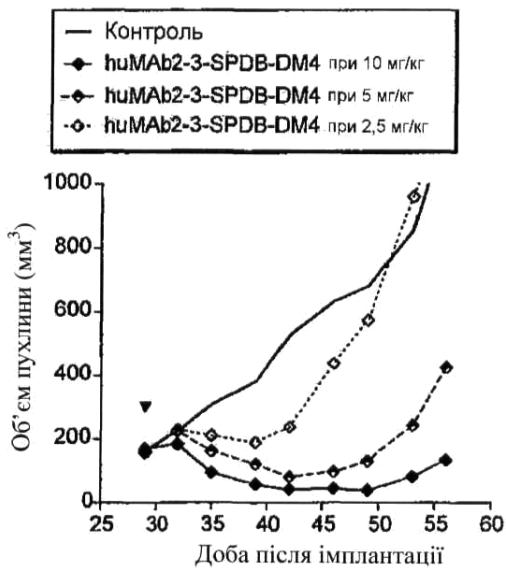
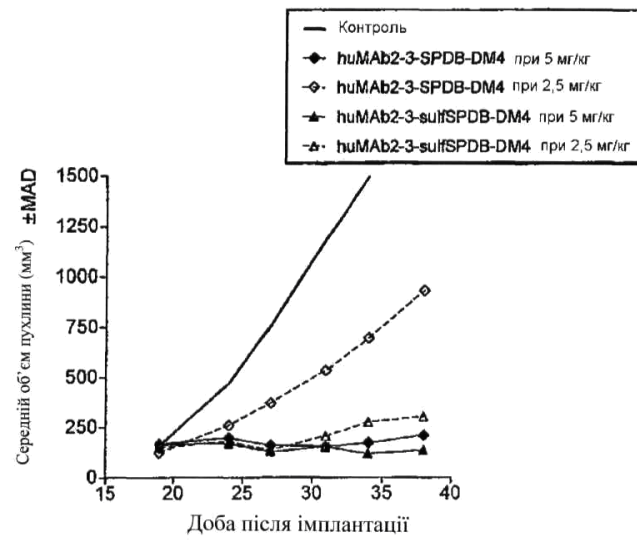
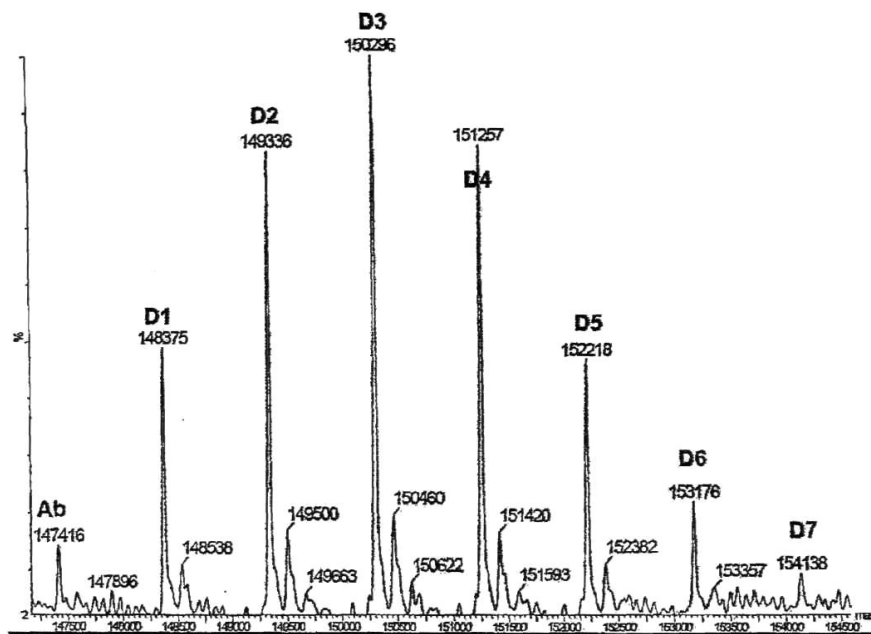


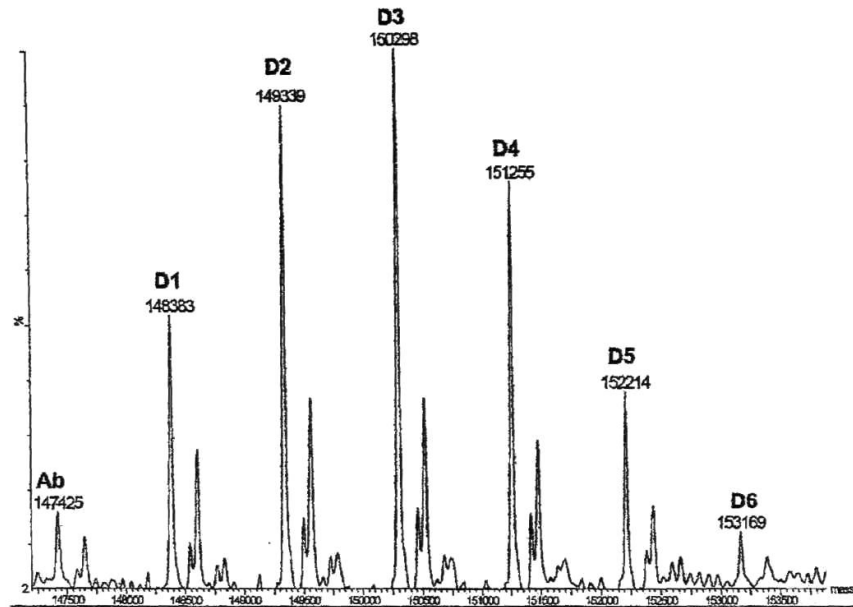
Fig. 18



Фіг. 19



Фіг. 20



Фіг. 21

Вирівнювання варіабельних доменів важких ланцюгів

Mab2	SEQ ID NO: 33	(1)	EVQLQESGGVLVKPGGSLKLSCAAS	GFVFS SYDMSWVRQTPEKRLEWVAY ISSGGG ITYF (60)	
Mab4	SEQ ID NO: 37	(1)	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAAS	GFTFS SYDMSWVRQTPEKRLEWVAF ISSYGG RTYY (60)	
Mab5	SEQ ID NO: 39	(1)	ELQLVESGGVLVKPGGSLKLSCAAS	GFAPFS SYDMSWVRQTPEKRLEWVTY INSSGG GITYY (60)	
Гуманізована	VH1a	SEQ ID NO: 5	(1)	EVQLQESGGVLVKPGGSLKLSCAAS	GFVFS SYDMSWVRQTPERGLEWVAY ISSGGG ITYA (60)
Гуманізована	VH1	SEQ ID NO: 51	(1)	EVQLQESGGVLVKPGGSLKLSCAAS	GFVFS SYDMSWVRQTPERRLEWVAY ISSGGG ITYF (60)
Гуманізована	VHg2	SEQ ID NO: 74	(1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFVFS SYDMSWVRQAPGKLEWVS YISSGG ITYY (60)

Mab2	SEQ ID NO: 33	(61)	PDTVQGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKSEDTAIYYC	AAHYFGSSGPF AYWGQGLVTVSA (120)	
Mab4	SEQ ID NO: 37	(61)	ADTVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKSEDTAMFYC	AAHYFGTSGPF AYWGQGLVTVSA (120)	
Mab5	SEQ ID NO: 39	(61)	PDTVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKSEDTAIYYC	TAHYFGSSGPF AYWGQGLVTVSA (120)	
Гуманізована	VH1a	SEQ ID NO: 5	(61)	PSTVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLTSEDTAVYYC	AAHYFGSSGPF AYWGQGLVTVSS (120)
Гуманізована	VH1	SEQ ID NO: 51	(61)	PSTVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLTSEDTAIYYC	AAHYFGSSGPF AYWGQGLVTVSA (120)
Гуманізована	VHg2	SEQ ID NO: 74	(61)	ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	AAHYFGSSGPF AYWGQGLVTVSS (120)




In		: Положення в CDR, що допускають будь-яку заміну
In		: Положення в CDR, що допускають тільки консервативну заміну
In		: Положення в CDR, що не допускають ніяких змін

Фіг. 22

Вирівнювання варіабельних доменів легких ланцюгів

Mab2	SEQ ID NO:34	(1) DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRAS ENIFSYLAWYQQKQKSPQLLVY NTKTLAEGVPS (60)
Mab4	SEQ ID NO:38	(1) DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRAS ENIYSYFAWYQQKQKSPQLLVY NAKILAEGVPS (60)
Mab5	SEQ ID NO:40	(1) DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRAS ENIYSYLAWYQQKQKSPQLLVY NAKTLTEGVPS (60)
Гуманізована VL1	SEQ ID NO:17	(1) DIQMTQSPASLSASVGDVTITCRAS ENIFSYLAWYQQKPGKSPKLLVY NTKTLAEGVPS (60)
Гуманізована VL1a	SEQ ID NO:23	(1) DIQMTQSPASLSASVGDRTITCRAS ENIFSYLAWYQQKPGKSPKLLVY NTKTLAEGVPS (60)
Гуманізована VL1c	SEQ ID NO:29	(1) DIQMTQSPASLSASVGDRTITCRAS ENIFSYLAWYQQKPGKSPKLLVY NTKTLAEGVPS (60)
Гуманізована VL1d	SEQ ID NO:55	(1) DIQMTQSPASLSASVGDVTITCRAS ENIFSYLAWYQQKPGKSPKLLVY NTKTLAEGVPS (60)
Гуманізована VLg5	SEQ ID NO:75	(1) DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRAS ENIFSYLAWYQQKPGKAPKLLIY NTKTLQSGVPS (60)

Mab2	SEQ ID NO:34	(61) RFGSGSGGTQFSLKINSLQPEDFGSYYC QHNYGTPFT FGSGTKLEIK (107)
Mab4	SEQ ID NO:38	(61) RFGSGSGGTQFSLKINSLQPEDFGTYYC QHNYGIPTT FGSGTKLEIK (107)
Mab5	SEQ ID NO:40	(61) RFGSGSGGTQFSLKINSLQPEDFGSYYC QHNYGTPFT FGSGTKLEIK (107)
Гуманізована VL1	SEQ ID NO:17	(61) RFGSGSGGTQFSLTISSLQPEDFGSYYC QHNYGTPFT FGSGTKLEIK (107)
Гуманізована VL1a	SEQ ID NO:23	(61) RFGSGSGGTDFSLTISSLQPEDFATYYC QHNYGTPFT FGSGTKLEIK (107)
Гуманізована VL1c	SEQ ID NO:29	(61) RFGSGSGGTDFSLTISSLQPEDFATYYC QHNYGTPFT FGSGTKLEIK (107)
Гуманізована VL1d	SEQ ID NO:55	(61) RFGSGSGGTQFSLTISSLQPEDFGSYYC QHNYGTPFT FGSGTKLEIK (107)
Гуманізована VLg5	SEQ ID NO:75	(61) RFGSGSGGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QHNYGTPFT FGSGTKLEIK (107)

In		Положення в CDR, що допускають будь-яку заміну
In		Положення в CDR, що допускають тільки консервативну заміну
In		Положення в CDR, що не допускають ніяких змін

Фіг. 23

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601