

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047681**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.08.26

(21) Номер заявки
202191956

(22) Дата подачи заявки
2013.11.20

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(54) **СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИТЕЛ К СЕАСАМ5**

(31) **12306444.6**

(32) **2012.11.20**

(33) **EP**

(43) **2022.06.30**

(62) **201590986; 2013.11.20**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
САНОФИ (FR)

(72) Изобретатель:
**Берн Пьер-Франсуа, Бланш Франсис,
Бушар Эрве, Камерон Беатрис,
Дабдуби Тарик, Декари Стефани,
Феррари Поль, Рак Алексей (FR)**

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

(56) ZHENG Chaogu et al. A Novel Anti-CEACAM5 Monoclonal Antibody, CC4, Suppresses Colorectal Tumor Growth and Enhances NK Cells-Mediated Tumor Immunity. PLoS ONE, 2011, Volume 6, Issue 6, реферат

WO-A1-2012117002

PENG Li et al. The CEA/CD3-Bispecific Antibody MEDI-565 (MT111) Binds a Nonlinear Epitope in the Full-Length but Not a Short Splice Variant of CEA. PLoS ONE, May 2012, Volume 7, Issue 5, реферат

(57) Изобретение относится к антителам, которые связываются с белками CEACAM5 человека и *Mascas fascicularis*, а также выделенным нуклеиновым кислотам, векторам и клеткам-хозяевам, содержащим последовательности, кодирующие указанные антитела. Изобретение также относится к иммуноконъюгатам, содержащим указанные антитела, конъюгированные или связанные с ингибирующим рост средством, и к фармацевтическим композициям, содержащим антитела или иммуноконъюгаты по изобретению. Антитела или иммуноконъюгаты по изобретению используют для лечения злокачественной опухоли или в диагностических целях.

B1

047681

047681

B1

Изобретение относится к антителам, которые специфически связываются с белками CEACAM5 человека и *Mascas fascicularis*, а также к выделенным нуклеиновым кислотам, векторам и клеткам-хозяевам, содержащим последовательности, кодирующие указанные антитела. Изобретение также относится к иммуноконъюгатам, содержащим указанные антитела, конъюгированные или связанные с ингибирующим рост средством, и к фармацевтическим композициям, содержащим антитела или иммуноконъюгаты по изобретению. Изобретение относится к применению антител или иммуноконъюгатов по изобретению для лечения злокачественных опухолей или в диагностических целях.

Раково-эмбриональный антиген (РЭА) представляет собой гликопротеин, вовлеченный в клеточную адгезию. Впервые РЭА идентифицировали в 1965 г. (Gold and Freedman, *J. Exp. Med.*, 121, 439, 1965) в качестве белка, в норме экспрессируемого зародышевым кишечником в течение первых шести месяцев беременности, и выявленного в злокачественных опухолях поджелудочной железы, печени и кишечника. Семейство РЭА принадлежит к иммуноглобулиновому суперсемейству. Семейство РЭА, которое состоит из 18 генов, и подразделяется на две подгруппы белков: подгруппу родственных раково-эмбриональному антигену молекулу клеточной адгезии (CEACAM) и подгруппу специфичного для беременности гликопротеина (Kammerer & Zimmermann, *BMC Biology* 2010, 8:12).

У людей подгруппа CEACAM состоит из 7 членов: CEACAM1, CEACAM3, CEACAM4, CEACAM5, CEACAM6, CEACAM7, CEACAM8.

Многочисленные исследования показали, что CEACAM5, идентичный первоначально идентифицированному РЭА, высоко экспрессирован на поверхности клеток колоректальных опухолей, клеток опухолей желудка, легких, молочных желез, предстательной железы, яичника, шейки матки и мочевого пузыря и слабо экспрессирован в небольшом количестве в нормальных эпителиальных тканях, таких как клетки цилиндрического эпителия и бокаловидные клетки в толстой кишке, слизистые клетки шейки в желудке и клетки плоского эпителия в пищеводе и шейке матки (Hammarström et al., 2002, in "Tumor markers, Physiology, Pathobiology, Technology and Clinical Applications" Eds. Diamandis E. P. et al., AACR Press, Washington pp 375). Таким образом, CEACAM5 может представлять собой терапевтическую мишень, подходящую для подходов опухолеспецифичной направленной доставки, таких как иммуноконъюгаты. Настоящее изобретение относится к моноклональным антителам к CEACAM5 и демонстрирует, что их можно конъюгировать с цитотоксическим средством для индукции цитотоксической активности, способной приводить к уничтожению опухолевых клеток *in vitro*, и для индукции регресса опухоли *in vivo*.

Внеклеточные домены представителей семейства CEACAM состоят из повторяющихся иммуноглобулиноподобных (Ig-подобных) доменов, которые подразделяют на 3 типа, А, В и N, в зависимости от гомологии последовательностей. CEACAM5 содержит семь таких доменов, а именно N, A1, B1, A2, B2, A3 и B3.

Домены CEACAM5 A1, A2 и A3, с одной стороны, и домены CEACAM5 B1, B2 и B3, с другой стороны, демонстрируют высокую гомологию последовательностей, домены А CEACAM5 человека демонстрируют от 84 до 87% парного сходства последовательностей, и домены В - от 69 до 80%. Кроме того, другие представители CEACAM человека, содержащие в своей структуре домены А и/или В, а именно CEACAM1, CEACAM6, CEACAM7 и CEACAM8, демонстрируют гомологию с CEACAM5 человека. В частности, домены А и В белка CEACAM6 человека демонстрируют гомологию последовательностей с доменами А1 и А3, и с любым из доменов В1-В3 CEACAM5 человека, соответственно, которая даже выше, чем гомология, наблюдаемая у доменов А и доменов В CEACAM5 человека.

В целях ориентированной на РЭА диагностики или терапии получено множество антител к РЭА. В качестве проблемы в этой области всегда указывали на специфичность к родственным антигенам, например, Sharkey et al. (1990, *Cancer Research* 50, 2823). Вследствие указанной выше гомологии некоторые из ранее описанных антител могут демонстрировать связывание с повторяющимися эпитопами CEACAM5, присутствующими в различных иммуноглобулиновых доменах, демонстрируя перекрестную реактивность с другими представителями CEACAM, такими как CEACAM1, CEACAM6, CEACAM7 или CEACAM8, с отсутствием специфичности к CEACAM5. Исходя из ориентированной на РЭА терапии, желательна специфичность антител к CEACAM5 так, чтобы они связывались с экспрессирующими CEACAM5 человека опухолевыми клетками, но не связывались с некоторыми нормальными тканями, экспрессирующими других представителей CEACAM. Следует обратить внимание на то, что CEACAM1, CEACAM6 и CEACAM8 описаны, как экспрессируемые нейтрофилами человека и не являющихся человеком приматов (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), где показано, что они регулируют гранулоцитопоз и играют определенную роль в иммунном ответе.

Описан конъюгат антитела к CEACAM6 и лекарственного средства, такой как антитело к CEACAM6 с майтанзиноидом, разработанный Genentech (Strickland et al., 2009 *J. Pathol.*, 218, 380), для которого показано, что он индуцирует зависимость от CEACAM6 гематопозитическую токсичность у не являющихся человеком приматов. Авторы рассматривали эту токсичность, связываемую с накоплением конъюгата антитела с лекарственным средством в костном мозге и элиминацией гранулоцитов и

их клеток-предшественников, как основной фактор опасности. Таким образом, более точно, в терапевтических целях, перекрестная реактивность антитела к SEACAM5 с SEACAM1, SEACAM6, SEACAM7 или SEACAM8 может снижать терапевтический индекс соединения, увеличивая токсичность для нормальных тканей. Таким образом, от получения антител, специфически направленных к SEACAM5, которые перекрестно не реагируют с другими молекулами семейства SEACAM, существует большая польза, особенно для применения в качестве конъюгата антитела с лекарственным средством (ADC) или с любым другим механизмом действия, приводящим к уничтожению клетки-мишени.

Кроме того, поскольку SEACAM5 описан как экспрессированный, хотя и на низком уровне, в некоторых нормальных клеточных тканях, необходимо разработать антитела к SEACAM5, способные связываться с SEACAM5 человека, а также с SEACAM5 яванского макака (*Macaca fascicularis*), так как такие антитела можно легко тестировать в доклинических токсикологических исследованиях у яванских макаков с оценкой их показателей безопасности. Хотя было показано, что эффективность терапевтических антител может зависеть от локализации эпитопа в мишени, как в случае функциональных антител (Doern et al. 2009, J. Biol. Chem. 284 10254), так и в случае, когда вовлечены эффектор-ные функции (Beers et al. Semin. Hematol. 47:107-114), нужно продемонстрировать, что перекрестно-реагирующее антитело человека/обезьяны связывает эпитопы в тех же повторяющихся Ig-подобных гомологичных доменах белков человека и яванского макака.

Комбинация необходимости в видовой перекрестной реактивности таких антител со специфичностью в отношении SEACAM5 человека и *Macaca fascicularis*, например, с отсутствием перекрестной реактивности с другими представителями SEACAM *Macaca fascicularis* и человека, добавляет дополнительный уровень сложности, учитывая общую гомологию последовательностей белков SEACAM человека и *Macaca fascicularis*.

Фактически, общее парное выравнивание последовательности SEACAM5 *Macaca fascicularis* с последовательностью SEACAM5 человека (AAAS1967.1/GI:180223, 702 аминокислот) продемонстрировало только 78,5% идентичность. Гены SEACAM1, SEACAM5 и SEACAM6 *Macaca fascicularis* клонированы и проведено общее выравнивание доменов A, B и N человека и *Macaca fascicularis*. Посредством этого выравнивания предварительно определено, что существует очень мало областей, если они вообще существуют, для локализации идеального эпитопа, которым был бы общим для SEACAM5 человека и макака и не являлся бы общим с другим представителем семейства. По этим причинам ожидалось, что разработка антител, перекрестно реагирующих с SEACAM5 человека и *Macaca fascicularis* без перекрестной реактивности с другими представителями SEACAM человека и *Macaca fascicularis*, будет иметь низкую вероятность успеха. Следует отметить, что ранее описанные антитела к SEACAM5 фактически никогда не были документально доказаны в отношении перекрестной реактивности у *Macaca fascicularis*, с очень небольшими исключениями (MT111, см. ниже).

В клинических испытаниях уже использовались антитела к SEACAM5 человека, такие как лабетумаб Immunomedics (также известный, как hMN14, Sharkey et al., 1995, Cancer Research 55, 5935). Показано, что это антитело не связывается с родственными антигенами, но перекрестно не реагирует с SEACAM5 *Macaca fascicularis*. Следует отметить, что антитело MT111 Micromet (также известное как антитело MEDI-565 MedImmune) представляет собой биспецифическое антитело, связывающееся с SEACAM5 человека и CD3 человека (Peng et al., PLoS ONE 7(5): e3641; WO 2007/071426). Указано, что MT111 получено посредством слияния одноцепочечного варибельного фрагмента (scFv) антитела, распознающего SEACAM5 человека и яванского макака, с scFv антитела, распознающего CD3 человека (постер Oberst et al., AACR Annual Meeting April 2009 Denver, CO). Также опубликовано, что MT111 не связывается с другими представителями семейства SEACAM (Peng et al., PLoS ONE 7(5): e3641). MT111 связывается с конформационным эпитопом в домене A2 SEACAM5 человека. Этот конформационный эпитоп отсутствует в варианте сплайсинга SEACAM5 человека, который наряду с полноразмерным SEACAM5, экспрессирован на опухолях (Peng et al., PLoS ONE 7(5): e3641). Кроме того, доказательств, что MT111 связывается с тем же эпитопом в SEACAM5 *Macaca fascicularis*, нет.

С целью получения новых антител к поверхностному белку SEACAM5 с оптимальными для терапевтических целей характеристиками авторы изобретения иммунизировали мышей рекомбинантными белками и опухолевыми клетками. Они подвергли скринингу сотни гибридом с использованием ELISA на несколько рекомбинантных белков семейства SEACAM и проточной цитометрии с соответствующими линиями клеток для отбора только иммуноглобулинов (IgG) с преимущественными характеристиками.

Неожиданно, они смогли отобрать гибридомные клоны и получить соответствующие зрелые IgG, которые обладают всеми желаемыми характеристиками. Они с высокой аффинностью специфически связываются с доменом A3-B3 SEACAM5 человека и не распознают белки SEACAM1, SEACAM6, SEACAM7 и SEACAM8 человека. В отношении клеток эти антитела демонстрируют высокую аффинность в отношении опухолевых клеток (в наномолярном диапазоне). Кроме того, эти антитела также связываются с белком SEACAM5 *Macaca fascicularis* с отношением аффинностей у обезьяны/человека менее или равным 10. Антитела по изобретению специфически связываются с доменом A3-B3 SEACAM5 *Macaca fascicularis* и не распознают других представителей SEACAM *Macaca fascicularis*.

Вследствие нацеливания на домен А3-В3 СЕАСАМ5 эти антитела обладают увеличенным потенциалом к поражению опухолей, так как они обладают способностью к связыванию как с полно-размерным СЕАСАМ5 человека, так и с его вариантом сплайсинга, идентифицированным Peng et al. (PLoS ONE 7(5): e3641).

Наконец, СЕАСАМ5 описан в литературе, как плохо интернализирующийся поверхностный белок (рассмотрено в Schmidt et al., 2008, Cancer Immunol. Immunother. 57, 1879) и, таким образом, не может являться подходящей мишенью для конъюгатов антител с лекарственными средствами. Несмотря на то, что было опубликовано на известном уровне техники, авторы изобретения продемонстрировали, что антитела, которые они получили, способны приводить к интернализации комплекса СЕАСАМ5-антитело после связывания и при комбинации с цитотоксическим средством индуцировать цитотоксическую активность в отношении опухолевых клеток *in vitro*. Эти же антитела, комбинированные с цитотоксическим средством, также способны к существенному ингибированию роста опухоли у мышей, несущих первичные опухоли толстой кишки и желудка человека.

Определения

Как используют в настоящем описании, "СЕАСАМ5" означает "родственную раково-эмбриональному антигену молекулу клеточной адгезии 5", также известную как "CD66е" (кластер дифференцировки 66е) или РЭА. СЕАСАМ5 представляет собой гликопротеин, вовлеченный в клеточную адгезию. СЕАСАМ5 высоко экспрессирован, в частности на поверхности клеток колоректальных опухолей, клеток опухолей желудка, легких и матки.

Эталонная последовательность полноразмерного СЕАСАМ5 человека, содержащая сигнальный пептид (положения 1-34) и пропептид (положения 686-702), доступна в базе данных GenBank под номером доступа AAA51967.1 (SEQ ID NO: 52). В европейской популяции идентифицировано пять несинонимичных SNP с частотой, большей 2%, четыре из них локализованы в домене N (в положениях 80, 83, 112, 113), и последний - в домене А2 (в положении 398) СЕАСАМ5 человека (SEQ ID NO: 58). GenBank AAA51967.1 содержит основной гаплотип (I80, V83, I112, I113 и E398).

Последовательность внеклеточного домена СЕАСАМ5 *Macaca fascicularis*, клонированная авторами изобретения, описана в SEQ ID NO: 53.

"Домен" может представлять собой любую область белка, как правило, определяемую на основании гомологий последовательностей, и часто относится к конкретной структурной или функциональной структуре. Известно, что представители семейства СЕАСАМ состоят из Ig-подобных доменов. Термин домен в настоящем описании, используют для обозначения отдельных Ig-подобных доменов, таких как "домен N", или для групп последовательных доменов, таких как "домен А3-В3".

Доменная организация СЕАСАМ5 человека является следующей (на основе последовательности AAA51967.1 GenBank; SEQ ID NO: 52).

Домены СЕАСАМ5 человека	Положения в SEQ ID NO: 52
Домен N	35-142
Домен А1	143-237
Домен В1	238-320
Домен А2	321-415
Домен В2	416-498
Домен А3	499-593
Домен В3	594-685

Таким образом, домен А3-В3 СЕАСАМ5 человека состоит из аминокислот в положениях 499-685 SEQ ID NO: 52.

Доменная организация СЕАСАМ5 *Macaca fascicularis* является следующей (на основе клонированной последовательности внеклеточного домена; SEQ ID NO: 53).

Домены СЕАСАМ5 <i>Macaca fascicularis</i>	Положения в SEQ ID NO: 53
Домен N-А1-В1	-1-286
Домен А2-В2	-287-464
Домен А3-В3	465-654

Таким образом, домен А3-В3 СЕАСАМ5 *Macaca fascicularis* состоит из аминокислот в положениях 465-654 SEQ ID NO: 53.

"Кодирующая последовательность" или последовательность "кодирующая" продукт экспрессии, такой как РНК, полипептид, белок или фермент, представляет собой нуклеотидную последовательность, которая при экспрессии приводит к продукции этих РНК, полипептида, белка или фермента, т.е. нуклеотидная последовательность кодирует аминокислотную последовательность этого полипеп-

тида, белка или фермента. Кодированная белок последовательность может содержать старт-кодон (как правило, ATG) и стоп-кодон.

Как используют в настоящем описании, указание на конкретные белки (например, антитела) может включать полипептид с природной аминокислотной последовательностью, а также на варианты и модифицированные формы вне зависимости от их происхождения или способа получения. Белок с природной аминокислотной последовательностью представляет собой белок с такой же аминокислотной последовательностью, как получают из природных источников. Такие белки с природной последовательностью можно выделять из природных источников или можно получать стандартными рекомбинантными способами и/или способами синтеза. Белки с природной последовательностью конкретно включают природные укороченные или растворимые формы, варианты природных форм (например, альтернативно сплайсированные формы), природные аллельные варианты и формы, включающие посттрансляционные модификации. Белки с природной последовательностью включают белки, несущие посттрансляционные модификации, такие как гликозилирование или фосфорилирование, или другие модификации определенных аминокислотных остатков.

Термин "ген" означает последовательность ДНК, кодирующую или соответствующую конкретной последовательности аминокислот, которая включает весь или часть одного или нескольких белков или ферментов, и может включать или не включать регуляторные последовательности ДНК, такие как промоторные последовательности, которые определяют, например, условия, в которых происходит экспрессия гена. Некоторые гены, которые не являются структурными генами, могут транскрибироваться с ДНК в РНК, но не транслироваться в аминокислотную последовательность. Другие гены могут функционировать в качестве регуляторов структурных генов или в качестве регуляторов транскрипции ДНК. В частности, термин ген может предназначаться для геномной последовательности, кодирующей белок, т.е. последовательности, содержащей последовательности регулятора, промотора, интронов и экзонов.

Последовательность "по меньшей мере на 85% идентичная эталонной последовательности" представляет собой последовательность, по всей своей длине на 85% или более, например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную со всей эталонной последовательностью.

Процент "идентичности последовательностей" можно определять, сравнивая две последовательности, оптимально выровненные в окне сравнения, где часть полинуклеотидной или полипептидной последовательности в окне сравнения для оптимального выравнивания двух последовательностей может содержать добавления или делеции (т.е. пропуски) по сравнению с эталонной последовательностью (которая не содержит добавлений или делеции). Процент рассчитывают, определяя количество положений, в которых в обеих последовательностях находится идентичный остаток основания нуклеиновой кислоты или аминокислоты с получением количества совпадающих положений, деля количество совпадающих положений на общее количество положений в окне сравнения и умножая результат на 100 с получением процента идентичности последовательностей.

Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения проводят посредством глобального парного выравнивания, например, с использованием алгоритма Нидмана и Вунша J. Mol. Biol. 48:443 (1970). Процент идентичности последовательностей можно легко определять, например, с использованием программы Needle, с матрицей BLOSUM62 и следующих параметров штраф за создание пропуска=10, штраф за продление пропуска=0,5.

"Консервативная аминокислотная замена" представляет собой аминокислотную замену, в которой аминокислотный остаток заменяют другим аминокислотным остатком с группой R боковой цепи со сходными химическими свойствами (например, зарядом, размером или гидрофобностью). Как правило, консервативная аминокислотная замена изменяет функциональные свойства белка незначительно. Примеры групп аминокислот, которые содержат боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают: 1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; 2) боковые цепи с алифатической гидроксильной группой: серин и треонин; 3) содержащие амид боковые цепи: аспарагин и глутамин; 4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; 5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; 6) кислотные боковые цепи: аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота и 7) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин. Группы для консервативных аминокислотных замен также можно определять на основе размера аминокислот.

"Антитело" может быть природным или обычным антителом, в котором две тяжелые цепи связаны друг с другом дисульфидными связями, и каждая тяжелая цепь связана дисульфидной связью с легкой цепью. Существует два типа легких цепей, лямбда (λ) и каппа (κ). Существует пять основных классов (или изоформ) тяжелых цепей, которые определяют функциональную активность молекул антител: IgM, IgD, IgG, IgA и IgE. Каждая цепь содержит определенную последовательность доменов. Легкая цепь содержит два домена или области, варибельный домен (VL) и константный домен (CL). Тяжелая цепь содержит четыре домена, варибельный домен (VH) и три константных домена (CH1, CH2 и CH3, в совокупности обозначаемых как CH). Варибельные области легких (VL) и тяжелых (VH) цепей определяют распознавание и специфичность антигена при связывании. Домены константных областей легких (CL) и тяжелых (CH) цепей обеспечивают важные биологические свойства, та-

кие как ассоциация цепей антител, секреция, прохождение трансплацентарного барьера, связывание комплемента и связывание с рецепторами Fc (FcR). Фрагмент Fv представляет собой N-концевую часть фрагмента Fab иммуноглобулина и состоит из переменных частей одной легкой цепи и одной тяжелой цепи. Специфичность антитела заключается в структурной комплементарности участка связывания антитела и антигенной детерминанты. Участки связывания антител составлены из остатков, которые преимущественно находятся в гипервариабельных или определяющих комплементарность областях (CDR). Иногда на общую структуру домена и, таким образом, на участок связывания влияют остатки из негипервариабельных или каркасных областей (FR). Таким образом, определяющие комплементарность области, или CDR, относятся к последовательностям аминокислот, которые совместно определяют аффинность и специфичность связывания природной области Fv природных участков связывания иммуноглобулинов. Каждая из легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов содержит три CDR, обозначаемых CDR1-L, CDR2-L, CDR3-L и CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H, соответственно. Таким образом, обычный антигенсвязывающий участок антитела содержит шесть CDR, включающих набор CDR из каждой области V тяжелой и легкой цепей.

"Каркасные области" (FR) относятся к последовательностям аминокислот, находящихся между CDR, т.е. к тем частям переменных областей легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов, которые являются относительно консервативными у различных иммуноглобулинов одного вида. Каждая из легких и тяжелых цепей иммуноглобулина содержит четыре FR, обозначаемые FR1-L, FR2-L, FR3-L, FR4-L и FR1-H, FR2-H, FR3-H, FR4-H, соответственно.

Как используют в настоящем описании, "каркасная область человека" представляет собой каркасную область, которая по существу идентична (приблизительно на 85% или более, например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) каркасной области природного антитела человека.

В контексте изобретения определение CDR/FR в легких или тяжелых цепях иммуноглобулинов следует проводить на основе определения IMGT (Lefranc et al. Dev. Comp. Immunol., 2003, 27 (1):55-77; www.imgt.org).

Как используют в настоящем описании, термин "антитело" означает обычные антитела и их фрагменты, а также однодоменные антитела и их фрагменты, в частности переменные области тяжелых цепей однодоменных антител, и химерные, гуманизированные, биспецифические или полиспецифические антитела.

Как используют в настоящем описании, антитело или иммуноглобулин также включает "однодоменные антитела", которые описаны совсем недавно и которые представляют собой антитела, у которых определяющие комплементарность области являются частью однодоменного полипептида. Примеры однодоменных антител включают антитела из тяжелых цепей, антитела, лишенные легких цепей от природы, однодоменные антитела, получаемые из обычных, четырехцепочечных антител, сконструированные однодоменные антитела. Однодоменные антитела можно получать у любых видов, включая, но, не ограничиваясь ими, мышь, человека, верблюда, ламу, козу, кролика, корову. Однодоменные антитела могут представлять собой природные однодоменные антитела, известные как антитела из тяжелых цепей, лишенные легких цепей. В частности, антитела из тяжелых цепей, от природы, лишенные легких цепей, продуцируют виды Camelidae, например, верблюд, одногорбый верблюд, лама, альпака и гуанако. В антителах из тяжелых цепей семейства верблюдовых также отсутствует домен CH1.

Переменная область тяжелой цепи этих однодоменных антител, лишенных легких цепей, известна в данной области как "VHH" или "нанотело". Подобно обычным доменам VH, VHH содержит четыре FR и три CDR. Нанотела обладают определенными преимуществами над обычными антителами: они приблизительно в десять раз меньше, чем молекулы IgG, и, как следствие, правильно свернутые функциональные нанотела можно получать посредством экспрессии *in vitro*, достигая при этом высокого выхода. Кроме того, нанотела являются очень стабильными и устойчивыми к действию протеаз. Свойства и продукция нанотел рассмотрены в Harmsen and De Haard HJ (Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007 Nov;77(1):13-22).

Как используют в настоящем описании, термин "моноклональное антитело", или "mAb", относится к молекуле антитела одной аминокислотной последовательности, которая направлена к конкретному антигену, и его не следует истолковывать, как требующий продукции антитела каким-либо конкретным способом. Моноклональное антитело можно получать посредством одного клона В-клетки или гибридомы, а также оно может являться рекомбинантным, т.е. полученным посредством белковой инженерии.

Термин "химерное антитело" относится к сконструированному антителу, которое, в наиболее широком смысле, содержит одну или несколько областей из одного антитела и одну или несколько областей из одного или нескольких других антител. В одном из вариантов осуществления химерное антитело содержит домен VH и домен VL антитела, полученный у не являющегося человеком животного, в ассоциации с доменом CH и доменом CL другого антитела, в одном из вариантов осуществления - антитела человека. В качестве не являющегося человеком животного можно использовать лю-

бое животное, такое как мышь, крыса, хомяк, кролик или т.п. Химерное антитело также может означать полиспецифическое антитело со специфичностью по меньшей мере в отношении двух различных антигенов.

Термин "гуманизированное антитело" относится к антителу, которое полностью или частично происходит от не являющегося человеком животного и которое модифицировано с заменой определенных аминокислот, например, в каркасных областях доменов VH и VL, во избежание или для минимизации иммунного ответа у людей. Константные домены гуманизированного антитела большей частью являются доменами CH и CL человека.

"Фрагменты" (обычных) антител содержат часть интактного антитела, в частности антигенсвязывающую область или варибельной области интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, (dsFv)₂, scFv, sc(Fv)₂, диатела, биспецифические и полиспецифические антитела, полученные из фрагментов антител. Фрагмент обычного антитела также может являться однодоменным антителом, таким как антитело из тяжелой цепи или VHH.

Термин "Fab" означает фрагмент антитела с молекулярной массой приблизительно 50000 и антигенсвязывающей активностью, в котором посредством дисульфидной связи связана приблизительно половина N-концевого участка тяжелой цепи и вся легкая цепь. Как правило, его получают из фрагментов посредством обработки IgG протеазой папаином.

Термин "F(ab')₂" относится к фрагменту антитела с молекулярной массой приблизительно 100000 и антигенсвязывающей активностью, которая немного выше, чем у 2 идентичных фрагментов Fab, связанных дисульфидной связью в шарнирной области. Как правило, его получают из фрагментов, посредством обработки IgG протеазой пепсин.

Термин "Fab" относится к фрагменту антитела с молекулярной массой приблизительно 50000 и антигенсвязывающей активностью, который получают посредством разрушения дисульфидной связи F(ab')₂ в шарнирной области.

Полипептид однопочечного Fv ("scFv") представляет собой ковалентно связанный гетеродимер VH::VL, который, как правило, экспрессирован со слиянием генов, содержащих кодирующие VH и VL гены, связанные кодирующим пептидом линкером. Фрагмент scFv человека по изобретению содержит CDR, которые удерживаются в надлежащей конформации, например, с использованием способов генетической рекомбинации. Двухвалентные и поливалентные фрагменты антител, такие как двухвалентные sc(Fv)₂, могут формироваться или спонтанно, посредством ассоциации одновалентных scFv, или их можно получать, связывая одновалентные scFv пептидным линкером. "dsFv" представляет собой гетеродимер VH::VL, стабилизированный дисульфидной связью. "(dsFv)₂" означает два dsFv, связанных пептидным линкером.

Термин "биспецифическое антитело" или "BsAb" означает антитело, в котором в одной молекуле скомбинированы антигенсвязывающие участки двух антител. Таким образом, BsAb способны связывать два различных антигена одновременно. Для конструирования, модификации и продукции антител или производных антител с желаемым набором свойств связывания и эффекторных функций с возрастающей частотой использовали генную инженерию, как описано например, в EP 2050764 A1.

Термин "полиспецифическое антитело" означает антитело, в котором в одной молекуле скомбинированы антигенсвязывающие участки двух или более антител.

Термин "диатела" относится к небольшим фрагментам антител с двумя антигенсвязывающими участками, где эти фрагменты содержат варибельный домен тяжелой цепи (VH), связанный с варибельным доменом легкой цепи (VL) в одной полипептидной цепи (VH-VL). Используя линкер, который является слишком коротким, чтобы позволить спаривание двух доменов одной и той же цепи, домены принуждают спариваться с комплементарными доменами другой цепи и получают два антигенсвязывающих участка.

Термин "гибридома" означает клетку, которую получают, подвергая В-клетку, полученную посредством иммунизации не являющегося человеком млекопитающего антигеном, клеточному слиянию с миеломной клеткой, полученной у мыши, или т.п., которая продуцирует желаемое моноклональное антитело с антигенной специфичностью.

Под "очищенным" и "выделенным" подразумевают, когда они относятся к полипептиду (т.е. антителу по изобретению) или нуклеотидной последовательности, что указанная молекула присутствует по существу в отсутствие других биологических макромолекул того же типа. Как используют в настоящем описании, термин "очищенный" означает, что присутствует по меньшей мере 75%, 85%, 95%, 96%, 97% или 98% по массе биологических макромолекул одного типа. "Выделенная" молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая конкретный полипептид, относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая по существу не содержит других молекул нуклеиновой кислоты, которые не кодируют указанный полипептид; однако молекула может содержать некоторые дополнительные основания или группы, которые не оказывают неблагоприятного влияния на основные характеристики композиции.

Как используют в настоящем описании, термин "индивидуум" означает млекопитающее, такое как грызун, кошка, собака и примат. Кроме того, индивидуум по изобретению представляет собой человека.

Антитела.

Авторы изобретения добились успеха в получении, скрининге и отборе специфичных в отношении CEACAM5 антител мыши, которые демонстрируют высокую аффинность в отношении белка CEACAM5 человека и *Macaca fascicularis*, и которые по существу перекрестно не реагируют с белками CEACAM1, CEACAM6, CEACAM7 и CEACAM8 человека, и с белками CEACAM1, CEACAM6 и CEACAM8 *Macaca fascicularis*.

Авторы изобретения определили последовательность переменных областей тяжелых и легких цепей таких моноклональных антител, так называемых антител MAb1, MAb2, MAb3, MAb4 и MAb5.

Так называемое "антитело MAb1" содержит: переменный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности

EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAAS**GFTFSSY**AMSWVRQTPEKRLEWVAT**ISSGGSYIYYLDS**
VKGRFTISRDNKNTLYLQMSLSRSEDTAMYYC**ARPAYYGNPAMDYWGQTSVTVSS** (SEQ ID NO: 31, где CDR представлены полужирными символами), в котором FR1-H охватывает положения аминокислот 1-25, CDR1-H охватывает положения аминокислот 26-33 (SEQ ID NO: 1), FR2-H охватывает положения аминокислот 34-50, CDR2-H охватывает положения аминокислот 51-58 (SEQ ID NO: 2), FR3-H охватывает положения аминокислот 59-96, CDR3-H охватывает положения аминокислот 97-109 (SEQ ID NO: 3), и FR4-H охватывает положения аминокислот 110-120, и переменный домен легкой цепи, состоящий из последовательности
DILMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKAS**QNVGT**NVAWYQQKPGQSPKPLIY**SAS**YRYSQVDPDRFT
GSGSGTDFLTITISNVQSEDLAEYFC**QYNSYPLYT**FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 32, где CDR представлены полужирными символами), в котором FR1-L охватывает положения аминокислот 1-26, CDR1-L охватывает положения аминокислот 27-32 (SEQ ID NO: 4), FR2-L охватывает положения аминокислот 33-49, CDR2-L охватывает положения аминокислот 50-52, FR3-L охватывает положения аминокислот 53-88, CDR3-L охватывает положения аминокислот 89-98 (SEQ ID NO: 6), и FR4-L охватывает положения аминокислот 99-108.

Так называемое "антитело MAb2" содержит: переменный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности

EVQLQESGGVLVKPGGSLKLSCAAS**GFVFS**YDMSWVRQTPEKRLEWVAY**ISSGGGIT**YFPDT
VQGRFTVSRDNKNTLYLQMSLSKSEDTAIYYC**AANYFGSSGPFAY**WGQGLVTVSA (SEQ ID NO: 33, где CDR представлены полужирными символами), в котором FR1-H охватывает положения аминокислот 1-25, CDR1-H охватывает положения аминокислот 26-33 (SEQ ID NO: 7), FR2-H охватывает положения аминокислот 34-50, CDR2-H охватывает положения аминокислот 51-58 (SEQ ID NO: 8), FR3-H охватывает положения аминокислот 59-96, CDR3-H охватывает положения аминокислот 97-109 (SEQ ID NO: 9), и FR4-H охватывает положения аминокислот 110-120, и переменный домен легкой цепи, состоящий из последовательности
DIQMTQSPASLSASVGETVITTCRAS**ENIFSY**LAWYQQKQKSPQLLVY**NTK**TLAEGVPSRFS
GSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYYC**QNHYGTPFT**FGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 34, где CDR представлены полужирными символами), в котором FR1-L охватывает положения аминокислот 1-26, CDR1-L охватывает положения аминокислот 27-32 (SEQ ID NO: 10), FR2-L охватывает положения аминокислот 33-49, CDR2-L охватывает положения аминокислот 50-52, FR3-L охватывает положения аминокислот 53-88, CDR3-L охватывает положения аминокислот 89-97 (SEQ ID NO: 12), и FR4-L охватывает положения аминокислот 98-107.

Также получен вариант антитела MAb2, посредством внесения в CDR2-L замены K52R. Этот вариант, который в настоящем описании обозначен "Mab2_{K52R}", обладает по существу такой же аффинностью в отношении CEACAM5 человека и *Macaca fascicularis*, как и MAb2.

Так называемое "антитело MAb3" содержит: переменный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности

EVKLVESGGGLVKPGGSLTLPCAAS**GFTFSRY**AMSWVRQTPEKRLEWVAS**ISSGGDT**YYPDSV
KGRFTVSRDNARNILFLQMSLSRSEDTGMYYC**ARVNYYDSSFLDW**WGQGLTLTVSS (SEQ ID NO: 35, где CDR представлены полужирными символами), в котором FR1-H охватывает положения аминокислот 1-25, CDR1-H охватывает положения аминокислот 26-33 (SEQ ID NO: 13), FR2-H охватывает положения аминокислот 34-50, CDR2-H охватывает положения аминокислот 51-57 (SEQ ID NO: 14), FR3-H охватывает положения аминокислот 58-95, CDR3-H охватывает положения аминокислот 96-108 (SEQ ID NO: 15), и FR4-H охватывает положения аминокислот 109-119, и переменный домен легкой цепи, состоящий из последовательности
DIVMTQSQRFMSTLEGDRVSVTCKAS**QNVGT**NVAWYQQKPGQSPKALIIY**SAS**YRYSQVDPDRFT
GSGSGTDFLTITISNVQSEDLAEYFC**QYNNYPLYT**FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 36, где CDR представлены полужирными символами), в котором FR1-L охватывает положения аминокислот 1-26, CDR1-L охватывает положения аминокислот 27-32 (SEQ ID NO: 16), FR2-L охватывает положения аминокислот 33-49, CDR2-L охватывает положения аминокислот 50-52, FR3-L охватывает положения аминокислот 53-88, CDR3-L охватывает положения аминокислот 89-98 (SEQ ID NO: 18), и FR4-L охватывает по-

ложения аминокислот 99-108.

Так называемое "антитело MAб4" содержит: вариабельный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности

EVQLVESGGGLVVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYDMSWVRQTPEKRLEWVAFISSYGGRTYYADT
VKGRFTISRDNKNTLYLQMSLKSSEDAMFYCAAHYFGTSGPFAYWGQGLVTVSA (SEQ ID NO: 37, где CDR представлены полужирными символами), в котором FR1-Н охватывает положения аминокислот 1-25, CDR1-Н охватывает положения аминокислот 26-33 (SEQ ID NO: 19), FR2-Н охватывает положения аминокислот 34-50, CDR2-Н охватывает положения аминокислот 51-58 (SEQ ID NO: 20), FR3-Н охватывает положения аминокислот 59-96, CDR3-Н охватывает положения аминокислот 97-109 (SEQ ID NO: 21), и FR4-Н охватывает положения аминокислот 110-120, и вариабельный домен легкой цепи, состоящий из последовательности

DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYFAWYQQKQKGKSPQLLVYNAKILAEVPSRFS
GSGSGTQFSLKINSLQPEDFGTYCYQHNYGIPFTFGSGTKLELK (SEQ ID NO: 38, где CDR представлены полужирными символами), в котором FR1-L охватывает положения аминокислот 1-26, CDR1-L охватывает положения аминокислот 27-32 (SEQ ID NO: 22), FR2-L охватывает положения аминокислот 33-49, CDR2-L охватывает положения аминокислот 50-52, FR3-L охватывает положения аминокислот 53-88, CDR3-L охватывает положения аминокислот 89-97 (SEQ ID NO: 24), и FR4-L охватывает положения аминокислот 98-107.

Так называемое "антитело MAб5" содержит: вариабельный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности

ELQLVESGGVLVVKPGGSLKLSCAASGFAFSSYDMSWVRQTPEKRLEWVTYINSGGGITYYPDT
VKGRFTISRDNARNTLYLQMSLKSSEDTAIYYCTAHYFGSSGPFAYWGQGLVTVSA (SEQ ID NO: 39, где CDR представлены полужирными символами), в котором FR1-Н охватывает положения аминокислот 1-25, CDR1-Н охватывает положения аминокислот 26-33 (SEQ ID NO: 25), FR2-Н охватывает положения аминокислот 34-50, CDR2-Н охватывает положения аминокислот 51-58 (SEQ ID NO: 26), FR3-Н охватывает положения аминокислот 59-96, CDR3-Н охватывает положения аминокислот 97-109 (SEQ ID NO: 27), и FR4-Н охватывает положения аминокислот 110-120, и вариабельный домен легкой цепи, состоящий из последовательности

DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLAWYQQKQKGKSPQLLVYNAKTLTEGVPSRFS
GSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYCYQHNYGTPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 40, где CDR представлены полужирными символами), в котором FR1-L охватывает положения аминокислот 1-26, CDR1-L охватывает положения аминокислот 27-32 (SEQ ID NO: 28), FR2-L охватывает положения аминокислот 33-49, CDR2-L охватывает положения аминокислот 50-52, FR3-L охватывает положения аминокислот 53-88, CDR3-L охватывает положения аминокислот 89-97 (SEQ ID NO: 30), и FR4-L охватывает положения аминокислот 98-107.

Таким образом, изобретение относится к антителу, которое связывается с CEACAM5 человека и *Mascaca fascicularis*.

В одном из вариантов осуществления антитело по изобретению связывается с доменами A3-B3 CEACAM5 человека и *Mascaca fascicularis*. Более конкретно, антитело может связываться с доменами A3-B3 человека и *Mascaca fascicularis* вне зависимости от того, экспрессированы ли они в выделенной форме или находятся в растворимом внеклеточном домене или в заякоренном в мембране полноразмерном белке CEACAM5.

Специфичность антител к домену A3-B3 CEACAM5 человека является выгодной, так как в европеоидной популяции в этом домене не сообщалось ни об одном SNP с частотой, большей 2%, что минимизирует риск того, в части популяции эпитоп(ы) антитела в CEACAM5 изменены.

Изобретение также относится к антителу, конкурирующему за связывание с доменом A3-B3 белков CEACAM5 человека и *Mascaca fascicularis* с антителом, содержащим вариабельные области тяжелых и легких цепей антитела, выбранного из группы, состоящей из так называемых антител MAб1, MAб2, MAб2_{K52R}, MAб3, MAб4 и MAб5, т.е. выбранных из группы, состоящей из:

- а) антитела, содержащего вариабельный домен тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 31 и вариабельный домен легкой цепи последовательности SEQ ID NO: 32;
- б) антитела, содержащего вариабельный домен тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 33 и вариабельный домен легкой цепи последовательности SEQ ID NO: 34;
- в) антитела, содержащего вариабельный домен тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 33 и вариабельный домен легкой цепи последовательности SEQ ID NO: 34, в котором К в положении 52 заменен на R;
- г) антитела, содержащего вариабельный домен тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 35 и вариабельный домен легкой цепи последовательности SEQ ID NO: 36;
- д) антитела, содержащего вариабельный домен тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 37 и вариабельный домен легкой цепи последовательности SEQ ID NO: 38; и

f) антитела, содержащего вариабельный домен тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 39 и вариабельный домен легкой цепи последовательности SEQ ID NO: 40.

Способность антитела-кандидата конкурировать за связывание с доменом А3-В3 белков СЕАСАМ5 человека и *Macaca fascicularis* с антителом, содержащим вариабельные области тяжелых и легких цепей антитела, выбранного из группы, состоящей из антитела МАb1, МАb2, МАb3, МАb4 и МАb5 (далее обозначаемых как "эталонное" антитело) можно легко оценивать, например, посредством конкурентного ELISA, где антиген (т.е. домен А3-В3 СЕАСАМ5 человека или *Macaca fascicularis*, или полипептид, содержащий или состоящий из фрагмента СЕАСАМ5 человека или *Macaca fascicularis*, содержащего домен А3-В3, в частности внеклеточный домен СЕАСАМ5 человека или *Macaca fascicularis*) связан с твердой подложкой и добавляют два раствора, содержащих антитело-кандидат и эталонное антитело, соответственно, и антителам дают возможность конкурировать за связывание с антигеном. Затем можно измерять количество эталонного антитела, связанного с антигеном, и сравнивать с количеством эталонного антитела, связанным с антигеном, когда его измеряют относительно отрицательного контроля (например, раствора, не содержащего антитела). Количество связанного эталонного антитела в присутствии антитела-кандидата, уменьшенное по сравнению с количеством связанного эталонного антитела в присутствии отрицательного контроля, означает, что антитело-кандидат конкурировало с эталонным антителом. В целях удобства эталонное антитело для облегчения детекции связанного эталонного антитела можно метить (например, флуоресцентно). Можно проводить повторные измерения с серийными разведениями антитела-кандидата и/или эталонного антитела.

Согласно одному из вариантов осуществления, такое антитело и, например, антитело, которое конкурирует за связывание с доменом А3-В3 белков СЕАСАМ5 человека и *Macaca fascicularis* с антителом, как определено в b), c), e) и f) выше, связывается с двумя областями домена А3-В3 белка СЕАСАМ5 человека, которые состоят из аминокислот в положениях 109-115 (SEQ ID NO: 76) и аминокислот в положениях 131-143 (SEQ ID NO: 77) домена А3-В3 белка СЕАСАМ5 человека, соответственно. Фактически, идентифицировано, что конформационный эпитоп для антитела МАb2 лежит в областях 109-115 и 131-143 домена А3-В3 белка СЕАСАМ5 человека, и так как МАb2, МАb4 и МАb5 являются структурно близкородственными, авторы изобретения полагают, что указанные антитела связываются с одним и тем же эпитопом.

Согласно одному из вариантов осуществления, антитело по изобретению специфично к поверхностным белкам СЕАСАМ5 человека и *Macaca fascicularis*. В одном из вариантов осуществления антитело по изобретению не связывается или по существу перекрестно не реагирует с белками СЕАСАМ1 человека, СЕАСАМ6 человека, СЕАСАМ7 человека, СЕАСАМ8 человека, СЕАСАМ1 *Macaca fascicularis*, СЕАСАМ6 *Macaca fascicularis* и СЕАСАМ8 *Macaca fascicularis*.

В частности, антитело не связывается или по существу перекрестно не реагирует с внеклеточным доменом указанных выше белков СЕАСАМ5 человека и *Macaca fascicularis*.

Полноразмерный белок СЕАСАМ1 человека доступен в базе данных GenBank под номером доступа NP_001703.2 (SEQ ID NO: 11). Внеклеточный домен СЕАСАМ1 человека состоит из аминокислот в положениях 35-428 SEQ ID NO: 11. Полноразмерный белок СЕАСАМ6 человека доступен в базе данных GenBank под номером доступа NP_002474.3 (SEQ ID NO: 71). Внеклеточный домен СЕАСАМ6 человека состоит из аминокислот в положениях 35-327 SEQ ID NO: 71.

Полноразмерный белок СЕАСАМ7 человека доступен в базе данных GenBank под номером доступа NP_008821.1 (SEQ ID NO: 72). Внеклеточный домен СЕАСАМ7 человека состоит из аминокислот в положениях 36-248 SEQ ID NO: 72.

Полноразмерный белок СЕАСАМ8 человека доступен в базе данных GenBank под номером доступа NP_001807.2 (SEQ ID NO: 73). Внеклеточный домен СЕАСАМ8 человека состоит из аминокислот в положениях 35-332 SEQ ID NO: 73.

Внеклеточный домен СЕАСАМ1 *M. fascicularis* состоит из аминокислот в положениях 35-428 полноразмерного белка, т.е. аминокислот 1-394 SEQ ID NO: 57.

Внеклеточный домен СЕАСАМ6 *M. fascicularis* состоит из аминокислот в положениях 35-327 полноразмерного белка, т.е. аминокислот 1-293 SEQ ID NO: 61.

Внеклеточный домен СЕАСАМ8 *M. fascicularis* состоит из аминокислот в положениях 35-332 полноразмерного белка, т.е. аминокислот 1-298 SEQ ID NO: 63.

"Аффинность" в теории определяют равновесной ассоциацией целого антитела и антигена. Ее можно экспериментально оценить рядом известных способов, таких как измерение скоростей ассоциации и диссоциации с использованием поверхностного плазмонного резонанса или измерение EC_{50} (или кажущейся K_D) в иммунохимическом анализе (ELISA, FACS). В этих анализах EC_{50} представляет собой концентрацию антитела, которая индуцирует ответ посередине между исходным уровнем и максимумом после определенного времени экспозиции при определенной концентрации антигена при ELISA (твердофазного иммуноферментного анализа) или клеток, экспрессирующих антиген, при FACS (активируемая флуоресценцией сортировка клеток).

Моноклональное антитело, связывающееся с антигеном 1 (Ag1), "перекрестно реагирует" с ан-

тигеном 2 (Ag2), когда EC_{50} находятся в сходном диапазоне для обоих антигенов. В настоящем описании моноклональное антитело, связывающееся с Ag1, перекрестно реагирует с Ag2, когда отношение аффинности в отношении Ag2 к аффинности в отношении Ag1 является равным или меньшим 10 (например, 5, 2, 1 или 0,5), где аффинность в отношении обоих антител измеряют одним и тем же способом.

Моноклональное антитело, связывающееся с Ag1, "не является по существу перекрестно реагирующим" с Ag2, когда аффинности в отношении двух антигенов различаются очень сильно. Если связывание является слишком низким, аффинность в отношении Ag2 может быть неизмеримой. В настоящем описании моноклональное антитело, связывающееся с Ag1, не является по существу перекрестно реагирующим с Ag2, когда связывание моноклонального антитела с Ag2 составляет менее 5% от связывания того же моноклонального антитела с Ag1 в тех же экспериментальных условиях и при той же концентрации антитела. На практике используемая концентрация антитела должна представлять собой EC_{50} или концентрацию, необходимую для достижения плато насыщения, получаемого при использовании Ag1.

Моноклональное антитело "специфически связывается с" или "специфично в отношении" Ag1, когда оно по существу перекрестно не реагирует с Ag2. Таким образом, антитело по изобретению обладает отношением аффинности в отношении SEACAM5 человека к аффинности в отношении SEACAM5 *Macaca fascicularis*, которое составляет ≤ 10 , например, ≤ 5 , ≤ 2 , ≤ 1 или $\leq 0,5$. Таким образом, полипептид по изобретению можно использовать в токсикологических исследованиях, проводимых у обезьян, так как профиль токсичности, наблюдаемый у обезьян, будет соответствовать предполагаемым потенциальным неблагоприятным воздействиям у людей.

Вариант осуществления изобретения обладает аффинностью в отношении SEACAM5 человека или SEACAM5 *Macaca fascicularis*, или того и другого, которая составляет ≤ 10 нМ, например, ≤ 5 нМ, ≤ 3 нМ, ≤ 1 нМ или $\leq 0,1$ нМ, например, аффинностью от 0,01 нМ до 5 нМ и/или аффинностью от 0,1 нМ до 5 нМ или от 0,1 нМ до 1 нМ.

Аффинность в отношении SEACAM5 человека или в отношении SEACAM5 *Macaca fascicularis* можно определить как значение EC_{50} в ELISA с использованием в качестве иммобилизованного антигена растворимого рекомбинантного SEACAM5.

Антитело по изобретению также может обладать кажущейся константой диссоциации (кажущейся KD), как можно определить посредством анализа FACS на линии опухолевых клеток MKN45 (DSMZ, ACC 409) или на ксенотрансплантате опухолевых клеток, полученных у пациента (CR-IGR-034P доступно в Oncodesign Biotechnology, коллекция опухолей CReMEC), которая составляет ≤ 25 нМ, например, ≤ 20 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 5 нМ, ≤ 3 нМ или ≤ 1 нМ. Кажущаяся KD может находиться диапазоне 0,01-20 нМ, или может находиться в диапазоне 0,1-20 нМ, 0,1-10 нМ или 0,1-5 нМ.

Кроме того, показано, что антителами по изобретению можно детектировать экспрессию SEACAM5 посредством иммуногистохимии в замороженных и фиксированных в формалине и погруженных в парафин (FFPE) тканевых срезах.

На фиг. 7 представлены выравнивания последовательностей областей VH и VL антител MAb1, MAb2, MAb3, MAb4 и MAb5. Сравнение последовательностей CRD-N и CDR-L свидетельствует, что структурно MAb2, MAb4 и MAb5, с одной стороны, и MAb1 и MAb3, с другой стороны, являются близкородственными, причем указанные антитела, вероятно, связываются с одним и тем же эпитопом. Сравнение последовательностей CRD-N и CDR-L дополнительно установило положения CDR, которые в двух группах антител являются строго консервативными и которые, таким образом, полагают важными для специфичности, тогда как другие положения можно подвергать заменам.

Авторами изобретения дополнительно идентифицировано, что остатки в положениях 101-109 VH MAb2 (т.е. остатки CDR3-H) и остатки в положениях 47-54 и 88-104 VL MAb2 (т.е. области, содержащие CDR2-L и CDR3-L, соответственно) составляют часть или формируют паратоп антитела для домена A3B3 SEACAM5 человека.

Кроме того, посредством замен единичных кислот остатки в положениях 27, 28, 29, 31, 51, 52, 89, 90, 93, 94, 96 и 97 VL MAb2 (т.е. в пределах CDR1-L, CDR2-L и CDR3-L) и остатки в положениях 26-31, 51-58, 97, 103, 104, 107 и 109 VH MAb2 (т.е. в пределах CDR1-H, всей CDR2-H и в пределах CDR3-H) идентифицированы как нейтральные в отношении связывания с внеклеточными доменами SEACAM5 человека и яванского макака. Кроме того, показано, что остатки в положениях 30 и 92 VL MAb2 (т.е. в пределах CDR1-L и CDR3-L) и остатки в положениях 98 и 100 VH MAb2 (т.е. в пределах CDR3-H) допускают консервативную замену. Так как MAb2, MAb4 и MAb5 несут один и тот же набор 6 CDR или очень близкородственных CDR, полагают, что вариации в одних и тех же положениях MAb4 или MAb5 в последовательностях VH или VL, или как VH, так и CL также приводят к вариантам антител, сохраняющих специфичность и/или аффинность связывания в отношении SEACAM5 человека и яванского макака.

Следует отметить, что, поскольку все остатки CDR2-H идентифицированы как нейтральные в отношении связывания с внеклеточным доменом SEACAM5 человека и яванского макака, авторы изобретения полагают, что CDR2-H может не участвовать во взаимодействии. Таким образом, в анти-

телах по изобретению CDR2-H может иметь любую последовательность из 6-10 аминокислот, что является характерной длиной последовательностей CDR2-H в антителах человека.

Таким образом, антитело по изобретению содержит:

а) CDR1-H, состоящую из последовательности $X_1X_2X_3X_4X_5X_6YD$ (SEQ ID NO: 83), где каждый из X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 и X_6 представляет собой любую аминокислоту; и

CDR2-H, состоящую из последовательности длиной 6-10 аминокислот, предпочтительно последовательности длиной 8 аминокислот, в которой в любом положении может находиться любая аминокислота; и

CDR3-H, состоящую из последовательности $X_1X_2HX_3FGX_4X_5GPX_6AX_7$ (SEQ ID NO: 84), где каждый из X_1 , X_4 , X_5 , X_6 , и X_7 представляет собой любую аминокислоту, X_2 представляет собой А или S, и X_3 представляет собой Y, F или W; и/или

б) CDR1-L, состоящую из последовательности $X_1X_2X_3X_4X_5Y$ (SEQ ID NO: 85), где каждый из X_1 , X_2 , X_3 и X_5 представляет собой любую аминокислоту, и X_4 представляет собой Y, F или W; и

CDR2-L, состоящую из последовательности NX_1X_2 , где каждый из X_1 и X_2 представляет собой любую аминокислоту; и

CDR3-L, состоящую из последовательности $X_1X_2HX_3X_4X_5X_6X_7$ (SEQ ID NO: 86), где каждый из X_1 , X_2 , X_4 , X_5 , X_6 и X_7 представляет собой любую аминокислоту, X_3 представляет собой Y, F или W.

В одном из вариантов осуществления в CDR1-H, состоящей из последовательности $X_1X_2X_3X_4X_5X_6YD$ (SEQ ID NO: 83), где X_1 представляет собой G, или X_2 представляет собой F, или X_3 представляет собой T, A или V, или X_4 представляет собой F, или X_5 представляет собой S, или X_6 представляет собой S, или любую их комбинацию.

В одном из вариантов осуществления CDR2-H состоит из последовательности $IX_1SX_2GGX_3T$ (SEQ ID NO: 79), где X_1 представляет собой S или N (в частности S), X_2 представляет собой Y или G (в частности G), X_3 представляет собой R или I. В дополнительном варианте осуществления X_3 представляет собой I.

В одном из вариантов осуществления в CDR3-H, состоящей из последовательности $X_1X_2HX_3FGX_4X_5GPX_6AX_7$ (SEQ ID NO: 84), X_1 представляет собой A или T, или X_4 представляет собой T или S, или X_5 представляет собой S, или X_6 представляет собой F, или X_7 представляет собой Y, или любую их комбинацию.

В одном из вариантов осуществления в CDR1-L, состоящей из последовательности $X_1X_2X_3X_4X_5Y$ (SEQ ID NO: 85), где X_1 представляет собой E, или X_2 представляет собой N, или X_3 представляет собой I, или X_5 представляет собой S, или любую их комбинацию.

В одном из вариантов осуществления CDR2-L состоит из последовательности NX_1X_2 , где X_1 представляет собой A или T, и X_2 представляет собой K или R.

В одном из вариантов осуществления в CDR3-L, состоящей из последовательности $X_1X_2HX_3X_4X_5PX_6X_7$ (SEQ ID NO: 86), X_1 представляет собой Q, или X_2 представляет собой H, или X_4 представляет собой G, или X_5 представляет собой T, или X_6 представляет собой F, или X_7 представляет собой T, или любую их комбинацию. Согласно одному из вариантов осуществления антитело по изобретению содержит:

а) CDR1-H, состоящую из последовательности GFX_1FSSYD (SEQ ID NO: 78), где X_1 представляет собой T, A или V; и

CDR2-H, состоящую из последовательности $IX_1SX_2GGX_3T$ (SEQ ID NO: 79), где X_1 представляет собой S или N (в частности S), X_2 представляет собой Y или G (в частности G), X_3 представляет собой R или I; и

CDR3-H, состоящую из последовательности $X_1AHYFGX_2SGPFAY$ (SEQ ID NO: 80), где X_1 представляет собой A или T (в частности A), и X_2 представляет собой T или S; и/или

б) CDR1-L, состоящую из последовательности ENIFSY (SEQ ID NO: 10) или ENIYSY (SEQ ID NO: 22); и

CDR2-L, состоящую из последовательности NX_1X_2 , где X_1 представляет собой A или T, и X_2 представляет собой K или R, в частности R; в частности CDR2-L, состоящую из NAK, NTK и NTR; и

CDR3-L, состоящую из последовательности QNHYGTPFT (SEQ ID NO: 12) или QNHYGIPFT (SEQ ID NO: 24).

Согласно одному из вариантов осуществления, в CDR2-H X_1 представляет собой S или N, X_2 представляет собой G, и X_3 представляет собой I.

Согласно одному из вариантов осуществления, CDR2-H состоит из ISSGGGIT (SEQ ID NO: 8), ISSYGGRT (SEQ ID NO: 20) или INSGGGIT (SEQ ID NO: 26).

Согласно одному из вариантов осуществления, в CDR3-H X_1 представляет собой A или T, и X_2 представляет собой S.

Согласно одному из вариантов осуществления, CDR3-H состоит из AAHYFGSSGPFAY (SEQ ID NO: 9), AAHYFGTSGPFAY (SEQ ID NO: 21) или TAYHYFGSSGPFAY (SEQ ID NO: 27).

Любая комбинация этих вариантов осуществления включена в изобретение.

Альтернативно, антитело по изобретению содержит:

а) CDR1-H, состоящую из последовательности GFTFSX₁YX₂ (SEQ ID NO: 81), где X₁ представляет собой R или S, в частности S, и X₂ представляет собой A или D; и

CDR2-H, состоящую из последовательности ISSGGX₁X₂X₃ (SEQ ID NO: 82), где X₁ отсутствует, представляет собой S или G (в частности G), X₂ представляет собой D, Y или I, и X₃ представляет собой T или I; и

CDR3-H, состоящую из последовательности ARPAYYGNPAMDY (SEQ ID NO: 3) или ARVNY-YDSSFLDW (SEQ ID NO: 15); и/или

б) CDR1-L, состоящую из последовательности QNVGTN (SEQ ID NO: 4); и

CDR2-L, состоящую из последовательности SAS; и

CDR3-L, состоящую из последовательности QQYNSYPLYT (SEQ ID NO: 6) или QQYNNYPLYT (SEQ ID NO: 18).

Согласно одному из вариантов осуществления, CDR2-H состоит из последовательности ISSGGSYI (SEQ ID NO: 2) или ISSGGDT (SEQ ID NO: 14).

Согласно одному из вариантов осуществления, CDR2-H состоит из последовательности ISSGGSYI (SEQ ID NO: 2), и CDR3-H состоит из последовательности ARPAYYGNPAMDY (SEQ ID NO: 3).

Согласно одному из вариантов осуществления, CDR2-H состоит из ISSGGDT (SEQ ID NO: 14), и CDR3-H состоит из последовательности ARVNYDSSFLDW (SEQ ID NO: 15).

Согласно одному из вариантов осуществления, антитело по изобретению содержит последовательности CDR тяжелых и/или легких цепей одного из так называемых антител к CEACAM5 MAb1, MAb2, MAb2_{K52R}, MAb3, MAb4 и MAb5.

Таким образом, изобретение относится к антителу, которое содержит:

а) CDR1-H с последовательностью GFTFSSYA (SEQ ID NO: 1) или с последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 1 одной заменой аминокислоты; CDR2-H с последовательностью ISSGGSYI (SEQ ID NO: 2) или с последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 2 одной или несколькими заменами аминокислот; CDR3-H с последовательностью ARPAYYGNPAMDY (SEQ ID NO: 3) или с последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 3 одной заменой аминокислоты; CDR1-L с последовательностью QNVGTN (SEQ ID NO: 4) или с последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 4 одной заменой аминокислоты; CDR2-L с последовательностью SAS или с последовательностью, отличающейся от SAS одной заменой аминокислоты, и CDR3-L с последовательностью QQYNSYPLYT (SEQ ID NO: 6) или с последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 6 одной заменой аминокислоты; или

б) CDR1-H с последовательностью GFVFSSYD (SEQ ID NO: 7) или с последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 7 одной заменой аминокислоты; CDR2-H с последовательностью ISSGGGIT (SEQ ID NO: 8) или с последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 8 одной или несколькими заменами аминокислот; CDR3-H с последовательностью AANYFGSSGPFAY (SEQ ID NO: 9) или с последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 9 одной или несколькими заменами аминокислот; CDR1-L с последовательностью ENIFSY (SEQ ID NO: 10) или с последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 10 одной заменой аминокислоты; CDR2-L с последовательностью NTK или NTR или с последовательностью, отличающейся от NTK или NTR одной заменой аминокислоты, и CDR3-L с последовательностью QHNYGTPFT (SEQ ID NO: 12) или с последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 12 одной заменой аминокислоты; или

в) CDR1-H с последовательностью GFTFSRYA (SEQ ID NO: 13) или с последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 13 одной заменой аминокислоты; CDR2-H с последовательностью ISSGGDT (SEQ ID NO: 14) или с последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 14 одной или несколькими заменами аминокислот; CDR3-H с последовательностью ARVNYDSSFLDW (SEQ ID NO: 15) или с последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 15 одной заменой аминокислоты; CDR1-L с последовательностью QNVGTN (SEQ ID NO: 16) или с последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 16 одной заменой аминокислоты; CDR2-L с последовательностью SAS или с последовательностью, отличающейся от SAS одной заменой аминокислоты, и CDR3-L с последовательностью QQYNNYPLYT (SEQ ID NO: 18) или с последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 18 одной заменой аминокислоты; или

г) CDR1-H с последовательностью GFTFSSYD (SEQ ID NO: 19) или с последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 19 одной заменой аминокислоты; CDR2-H с последовательностью ISSYGGRT (SEQ ID NO: 20) или с последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 20 одной или несколькими заменами аминокислот; CDR3-H с последовательностью AANYFGTSGPFAY (SEQ ID NO: 21) или с последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 21 одной или несколькими заменами аминокислот; CDR1-L с последовательностью ENIYSY (SEQ ID NO: 22) или с последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 22 одной заменой аминокислоты; CDR2-L с последовательностью NAK или с последовательностью, отличающейся от NAK одной или несколькими заменами аминокислот, и CDR3-L с последовательностью QHNYGIPFT (SEQ ID NO: 24) или с последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 24 одной заменой аминокислоты; или

е) антитела, содержащего CDR1-H с последовательностью GFAFSSYD (SEQ ID NO: 25) или с

последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 25 одной заменой аминокислоты; CDR2-H с последовательностью INSGGGIT (SEQ ID NO: 26) или с последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 26 одной или несколькими заменами аминокислот; CDR3-H с последовательностью TАНYFGSSGPFAY (SEQ ID NO: 27) или с последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 27 одной или несколькими заменами аминокислот; CDR1-L с последовательностью ENIYSY (SEQ ID NO: 28) или с последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 28 одной заменой аминокислоты; CDR2-L с последовательностью NAK; или с последовательностью, отличающейся от NAK одной или несколькими заменами аминокислот, и CDR3-L с последовательностью QННYGTPT (SEQ ID NO: 30) или с последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 30 одной заменой аминокислоты.

Одну или несколько отдельных аминокислот в одной или нескольких из указанных выше последовательностей CDR можно изменять посредством замены, в частности, посредством консервативной замены. Такое изменение может предназначаться, например, для удаления участка гликозилирования или участка дезамидирования в связи с гуманизацией антитела.

На основе выравниваний последовательностей областей VH и VL MAb1, MAb2, MAb3, MAb4 и MAb5 и на основе одиночных замен аминокислот в варианте антитела MAb2, аминокислоту можно заменять

в CDR1-H в одном или нескольких положениях 1-6, например, в положении 3 CDR1-H с последовательностью GFVFSSYD (SEQ ID NO: 7), GFTFSSYD (SEQ ID NO: 19) или GFAFSSYD (SEQ ID NO: 25) или в положении 6 CDR1-H с последовательностью GFTFSSYA (SEQ ID NO: 1) или GFTFSRYA (SEQ ID NO: 13); и/или

в CDR2-H в одном или нескольких любых положениях или в одном, двух или трех положениях 2, 4 и 7 CDR2-H с последовательностью ISSGGGIT (SEQ ID NO: 8), ISSYGGRT (SEQ ID NO: 20) или INSGGGIT (SEQ ID NO: 26), или в одном, двух или трех положениях 6, 7 и 8 (где последовательность состоит из 8 аминокислот) CDR2-H с последовательностью ISSGGSYI (SEQ ID NO: 2) или ISSGGDT (SEQ ID NO: 14); и/или см. выше;

в CDR3-H в одном или нескольких положениях 1, 7, 8, 11 и 13, например, в одном или двух положениях 1 и 7 CDR3-H с последовательностью ААНYFGSSGPFAY (SEQ ID NO: 9), ААНYFGTSGPFAY (SEQ ID NO: 21) или TАНYFGSSGPFAY (SEQ ID NO: 27), или в положении 3, 4, 7, 8, 9, 10 или 11 последовательностей АРPAYYGNPAMDY (SEQ ID NO: 3) или АRVNYYDSSFLDW (SEQ ID NO: 15); и /или

в CDR1-L в одном или нескольких положениях 1-5, в частности в одном или нескольких положениях 1, 2, 3 и 5 или в положении 4 CDR1-L с последовательностью ENIFSY (SEQ ID NO: 10) или ENIYSY (SEQ ID NO: 28); и/или

в CDR2-L в положениях 2 и/или 3 последовательности NAK, NTK или NTR, в частности, по меньшей мере в положении 3, если присутствует К.

В таком случае, например, К в положении 3 CDR2-L можно заменять на R; и/или в CDR3-L в одном или нескольких положениях 1, 2, 5, 6, 8 и 9, например, в положении 6 CDR3-L с последовательностью QННYGIPT (SEQ ID NO: 24) или QННYGTPT (SEQ ID NO: 30), или в положении 5 CDR3-L с последовательностью QQYNSYPLYT (SEQ ID NO: 6) или QQYNNYPLYT (SEQ ID NO: 18).

Согласно одному из вариантов осуществления, в антителах по изобретению положение 5 CDR3-H с последовательностью ААНYFGSSGPFAY (SEQ ID NO: 9), ААНYFGTSGPFAY (SEQ ID NO: 21) или TАНYFGSSGPFAY (SEQ ID NO: 27); и/или

положение 6 CDR1-L с последовательностью ENIFSY (SEQ ID NO: 10) или ENIYSY (SEQ ID NO: 28); и/или

положение 3 CDR3-L с последовательностью QННYGIPT (SEQ ID NO: 24) или QННYGTPT (SEQ ID NO: 30) является(ются) немодифицированным(ми).

Согласно одному из вариантов осуществления, в CDR1-H с последовательностью GFVFSSYD (SEQ ID NO: 7), GFTFSSYD (SEQ ID NO: 19) или GFAFSSYD (SEQ ID NO: 25) аминокислота, на которую заменяют аминокислоту в положении 3 CDR1-H, выбрана из группы, состоящей из Т, А или V.

Согласно одному из вариантов осуществления, в CDR1-H с последовательностью GFTFSSYA (SEQ ID NO: 1) или GFTFSRYA (SEQ ID NO: 13), аминокислота, на которую заменяют аминокислоту в положении 6 CDR1-H, представляет собой R или S.

Согласно одному из вариантов осуществления, в CDR3-H с последовательностью ААНYFGSSGPFAY (SEQ ID NO: 9), ААНYFGTSGPFAY (SEQ ID NO: 21) или TАНYFGSSGPFAY (SEQ ID NO: 27) аминокислота, на которую заменяют аминокислоту в положении 1 CDR3-H, представляет собой А или Т, и/или аминокислота, на которую заменяют аминокислоту в положении 7 CDR3-H, представляет собой Т или S.

Согласно одному из вариантов осуществления, в CDR3-H с последовательностью АРPAYYGNPAMDY (SEQ ID NO: 3) или АRVNYYDSSFLDW (SEQ ID NO: 15) аминокислота, на которую заменяют аминокислоту в положении 3 CDR3-H, представляет собой V или Р, в положении 4 представляет собой А или N, в положении 7 представляет собой D или G, в положении 8 представляет собой S или

N, в положении 9 представляет собой S или P, в положении 10 представляет собой F или A, или в положении 11 представляет собой W или Y.

Согласно одному из вариантов осуществления, аминокислота, на которую заменяют аминокислоту в положении 4 CDR1-L, представляет собой Y или F.

Согласно одному из вариантов осуществления, в CDR2-L с последовательностью NAK, NTK или NTR аминокислота, на которую заменяют аминокислоту в положении 2 CDR2-L, представляет собой A или T.

Согласно одному из вариантов осуществления, в CDR3-L с последовательностью QQYNSY-PLYT (SEQ ID NO: 6) или QQYNNYPLYT (SEQ ID NO: 18) аминокислота, на которую заменяют аминокислоту в положении 5 CDR3-L, представляет собой N или S.

Согласно одному из вариантов осуществления, в CDR3-L с последовательностью QHHYGIPFT (SEQ ID NO: 24) или QHHYGTPT (SEQ ID NO: 30) аминокислота, на которую заменяют аминокислоту в положении 6 CDR3-L, представляет собой I или T.

Любая комбинация указанных выше вариантов осуществления включена в изобретение.

В одном из вариантов осуществления антитело по изобретению представляет собой обычное антитело, такое как обычное моноклональное антитело или фрагмент антитела, биспецифическое или полиспецифическое антитело.

В одном из вариантов осуществления антитело по изобретению содержит или состоит из IgG или его фрагмента.

Изобретение также относится к антителам, как определено выше, дополнительно содержащим по меньшей мере варибельный домен тяжелой цепи и/или варибельный домен легкой цепи одного из пяти так называемых антител к SEACAM5 MAb1, MAb2, MAb3, MAb4 и MAb5.

Таким образом, один из вариантов осуществления изобретения относится к антителу, которое содержит:

а) варибельный домен тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 31 или с последовательностью, по меньшей мере на 85% идентичной ей, и/или варибельный домен легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 32 или с последовательностью, по меньшей мере на 85% идентичной ей; или

б) варибельный домен тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 33 или с последовательностью, по меньшей мере на 85% идентичной ей, и/или варибельный домен легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 34 или с последовательностью, по меньшей мере на 85% идентичной ей; или

в) варибельный домен тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 35 или с последовательностью, по меньшей мере на 85% идентичной ей, и/или варибельный домен легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 36 или с последовательностью, по меньшей мере на 85% идентичной ей; или

г) варибельный домен тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 37 или с последовательностью, по меньшей мере на 85% идентичной ей, и/или варибельный домен легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 38 или с последовательностью, по меньшей мере на 85% идентичной ей; или

е) варибельный домен тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 39 или с последовательностью, по меньшей мере на 85% идентичной ей, и/или варибельный домен легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 40 или с последовательностью, по меньшей мере на 85% идентичной ей. Например, последовательность варибельного домена тяжелой или легкой цепи при необходимости может отличаться от эталонной последовательности SEQ ID NO: 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 одной или несколькими заменами аминокислот, в частности одной или несколькими консервативными заменами аминокислот и/или заменами на канонические остатки. В одном из вариантов осуществления последовательность варибельного домена тяжелой или легкой цепи может отличаться от эталонной последовательности SEQ ID NO: 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 только консервативными заменами аминокислот.

По существу, в одной или нескольких из каркасных областей FR1-L, FR2-L, FR3-L, FR4-L и/или FR1-H, FR2-H, FR3-H, FR4-H по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 присутствуют изменения последовательности.

Однако также возможны замены аминокислот в одной или нескольких CDR. В одном из вариантов осуществления последовательность варибельного домена легкой цепи может отличаться от последовательности SEQ ID NO: 34 по меньшей мере заменой K на R в положении 52 SEQ ID NO: 34 (в CDR2-L).

Антитело по изобретению и его фрагмент могут соответственно представлять собой антитело мыши и фрагмент антитела мыши.

Антитело также может представлять собой химерное антитело, и в одном из вариантов осуществления антитело мыши/человека, например, антитело, содержащее варибельные домены тяжелых и легких цепей мыши и домен CH и домен CL антитела человека. Полипептид может представлять собой фрагмент такого антитела.

Согласно одному из вариантов осуществления, антитело по изобретению представляет собой:

а) химерное антитело, содержащее или состоящее из тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 41 или с последовательностью, по меньшей мере на 85% идентичной ей, или легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 42 или с последовательностью, по меньшей мере на 85% идентичной ей (т.е. тяжелой и/или легкой цепи chMAb1, как описано в примере 5); или из тяжелой цепи и легкой цепи или,

б) химерное антитело, содержащее или состоящее из тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 43 или с последовательностью, по меньшей мере на 85% идентичной ей, или легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 44 или с последовательностью, по меньшей мере на 85% идентичной ей (т.е. тяжелой и/или легкой цепи chMAb2, как описано в примере 5); или из тяжелой цепи и легкой цепи или,

с) химерное антитело, содержащее или состоящее из тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 45 или с последовательностью, по меньшей мере на 85% идентичной ей, или легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 46 или с последовательностью, по меньшей мере на 85% идентичной ей (т.е. тяжелой и/или легкой цепи chMAb3, как описано в примере 5); или из тяжелой цепи и легкой цепи или,

д) химерное антитело, содержащее или состоящее из тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 47 или с последовательностью, по меньшей мере на 85% идентичной ей, или легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 48 или с последовательностью, по меньшей мере на 85% идентичной ей, (т.е. тяжелой и/или легкой цепи chMAb4, как описано в примере 5); или из тяжелой цепи и легкой цепи или,

е) химерное антитело, содержащее или состоящее из тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 49 или с последовательностью, по меньшей мере на 85% идентичной ей, или легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 50 или с последовательностью, по меньшей мере на 85% идентичной ей (т.е. тяжелой и/или легкой цепи chMAb5, как описано в примере 5); или из тяжелой цепи и легкой цепи или,

ф) фрагмент химерного антитела, определенного в а), б), с), д) или е).

Антитело также может представлять собой гуманизированное антитело или фрагмент гуманизированного антитела. В одном из вариантов осуществления антитело по изобретению может представлять собой результат гуманизации любого из химерных антител, определенных выше в а), б), с), д), е) или ф).

В данной области известно множество способов гуманизации последовательности антитела; см. например, обзор Almagro & Fransson (2008) *Front Biosci.* 13: 1619-1633. Одним из широко используемых способов является прививка CDR, или реконструкция антител, которая включает прививку последовательностей CDR донорного антитела, как правило, антитела мыши, в каркас антитела человека с различной специфичностью. Так как прививка CDR может снижать специфичность и аффинность связывания и, таким образом, биологическую активность, не принадлежащего человеку антитела с привитой CDR, в выбранных положениях антитела с привитой CDR можно вносить обратные мутации для сохранения специфичности и аффинности связывания исходного антитела. Идентификацию положения для возможных обратных мутаций можно проводить с использованием информации, доступной в литературе и в базах данных антител. Аминокислотные остатки, которые являются кандидатами для обратных мутаций, как правило, являются остатками, которые расположены на поверхности молекул антител, тогда как остатки, которые находятся внутри или которые имеют низкую степень поверхностной экспозиции, обычно не заменяют. Альтернативным прививке CDR и обратным мутациям способом гуманизации является изменение поверхности, при котором не расположенные на поверхности остатки, происходящие из не принадлежащего человеку антитела, сохраняют, тогда, как поверхностные остатки изменяют на принадлежащие антителу человека остатки. Другой альтернативный способ известен как "направляемый отбор" (Jespers et al. (1994) *Biotechnology* 12, 899), и его можно использовать для получения из антитела мыши полностью принадлежащего человеку антитела, сохраняющего эпитоп и характеристики связывания исходного антитела.

У химерных антител гуманизация, как правило, включает модификацию каркасных областей последовательностей переменных областей.

Аминокислотные остатки, которые являются частью CDR, как правило, в связи с гуманизацией не изменяют, хотя в определенных случаях изменять отдельные аминокислотные остатки CDR может быть желательным, например, для удаления участка гликозилирования, участка дезамидирования или нежелательного остатка цистеина. N-связанное гликозилирование происходит посредством присоединения олигосахаридной цепи к остатку аспарагина в трипептидной последовательности Asn-X-Ser или Asn-X-Thr, где X может представлять собой любую аминокислоту за исключением Pro. Удаления N-связанного участка гликозилирования можно достигать посредством мутирования остатков Asn или Ser/Thr в другие остатки, например, посредством консервативной замены. Дезамидирование остатков аспарагина и глутамина может происходить в зависимости от таких факторов, как pH и поверхностная экспозиция. Особенно чувствительны к дезамидированию остатки аспарагина, преимущественно

ственно, когда они находятся в последовательности Asn-Gly, и в меньшей степени в других дипептидных последовательностях, таких как Asn-Ala. Таким образом, когда в последовательности CDR присутствует такой участок дезамидирования, например, Asn-Gly, может быть желательно удалить этот участок, как правило, посредством консервативной замены с удалением одного из участвующих остатков. Замена в последовательности CDR с удалением одного из участвующих остатков также предназначена для включения в настоящее изобретение.

Беря в качестве примера так называемое "антитело MAb2", гуманизованное антитело или его фрагмент в вариабельной области тяжелой цепи могут содержать следующие мутации: Р вместо G в положении 9; и/или G вместо V в положении 10; и/или S вместо K в положении 19; и/или R вместо K в положении 43; и/или G вместо R в положении 44; и/или А вместо F в положении 60; и/или S вместо D в положении 62; и/или K вместо Q в положении 65; и/или Т вместо К в положении 87; и/или V вместо I в положении 89; и/или S вместо А в положении 113; где положения приведены в соответствии с SEQ ID NO: 33.

Также рассматривая так называемое "антитело MAb2" в качестве примера, гуманизованное антитело или его фрагмент в вариабельной области легкой цепи может содержать следующие мутации: D вместо E в положении 17; и/или R вместо T в положении 18; и/или P вместо Q в положении 40; и/или K вместо Q в положении 45; и/или R вместо K в положении 52; и/или D вместо Q в положении 70; и/или T вместо K в положении 74; и/или S вместо N в положении 76; и/или А вместо G в положении 84; и/или Т вместо S в положении 85; где положения приведены в соответствии с SEQ ID NO: 34.

В одном из вариантов осуществления антитело по изобретению представляет собой гуманизованное антитело, содержащее или состоящее из тяжелой цепи, содержащей указанные ниже мутации, где положения приведены в соответствии с SEQ ID NO: 33:

а) Р вместо G в положении 9; и G вместо V в положении 10; и S вместо K в положении 19; и R вместо K в положении 43; и S вместо D в положении 62; и K вместо Q в положении 65; и T вместо K в положении 87; или

б) Р вместо G в положении 9; и G вместо V в положении 10; и S вместо K в положении 19; и R вместо K в положении 43; и G вместо R в положении 44; и А вместо F в положении 60; и S вместо D в положении 62; и K вместо Q в положении 65; и Т вместо К в положении 87; и V вместо I в положении 89; и S вместо А в положении 113; и/или гуманизованное антитело, содержащее легкую цепь, содержащую указанные ниже мутации, где положения приведены в соответствии с SEQ ID NO: 34:

с) D вместо E в положении 17; и P вместо Q в положении 40; и K вместо Q в положении 45; и T вместо K в положении 74; и S вместо N в положении 76; или

д) D вместо E в положении 17; и R вместо T в положении 18; и P вместо Q в положении 40; и K вместо Q в положении 45; и D вместо Q в положении 70; и T вместо K в положении 74; и S вместо N в положении 76; и А вместо G в положении 84; и Т вместо S в положении 85; или

е) D вместо E в положении 17; и R вместо T в положении 18; и P вместо Q в положении 40; и K вместо Q в положении 45; и R вместо K в положении 52; и D вместо Q в положении 70; и T вместо K в положении 74; и S вместо N в положении 76; и А вместо G в положении 84; и Т вместо S в положении 85.

В одном из вариантов осуществления антитело по изобретению представляет собой гуманизованное антитело, полученное посредством прививки CDR антитела по изобретению в каркасные области альтернативного антитела, более конкретно в каркасные области, принадлежащие человеку. Взятие в качестве примера MAb2, 6 привитых CDR MAb2_{K52R} в принадлежащий человеку каркас, состоящий из генов IGHV3-23 и IGKV1D-39, и проведение трех обратных мутаций, соответствующих положениям 34 и 53 в VL (SEQ ID NO: 34) и положению 50 в VH (SEQ ID NO: 33), привело к получению антитела, содержащего вариабельный домен тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 74 и вариабельный домен легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 75.

В одном из вариантов осуществления антитело по изобретению представляет собой гуманизованное антитело, содержащее или состоящее из тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 74, или с последовательностью, по меньшей мере на 85% идентичной ей; и/или легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 55 или SEQ ID NO: 75 или с последовательностью, по меньшей мере на 85% идентичной ей (гуманизованные вариабельные домены тяжелых и легких цепей MAb2).

В одном из вариантов осуществления антитело по изобретению представляет собой гуманизованное антитело, содержащее тяжелую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 51 или с последовательностью, по меньшей мере на 85% идентичной ей, и легкую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 17 или с последовательностью, по меньшей мере на 85% идентичной ей, или тяжелую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 5 или с последовательностью, по меньшей мере на 85% идентичной ей, и легкую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 23 или с последовательностью, по меньшей мере на 85% идентичной ей, или тяжелую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 5 или с последовательностью, по меньшей мере на 85% идентичной ей, и легкую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 29 или с последовательностью, по меньшей мере на 85% идентичной ей, или тяжелую цепь с по-

следовательностью SEQ ID NO: 51 или с последовательностью, по меньшей мере на 85% идентичной ей, и легкую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 55 или с последовательностью, по меньшей мере на 85% идентичной ей, или тяжелую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 74 или последовательность, по меньшей мере на 85% идентичной ей, и легкую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 75 или последовательность, по меньшей мере на 85% идентичной ей.

В указанном гуманизованном антителе или его фрагменте переменные домены тяжелых и легких цепей могут содержать акцепторные каркасные области, принадлежащие человеку. Гуманизованное антитело дополнительно содержит константные домены тяжелых и легких цепей человека, когда они присутствуют.

В одном из вариантов осуществления антитело по изобретению представляет собой антитело huMAb2-3 или его вариант, т.е. выделенное антитело, которое связывается с доменом А3-В3 белков CEACAM5 человека и *Macaca fascicularis* и которое содержит:

а) тяжелую цепь, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 87 или из последовательности, по меньшей мере на 85% идентичной ей; или

б) легкую цепь, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 88 или из последовательности, по меньшей мере на 85% идентичной ей, или тяжелую цепь и легкую цепь.

В одном из вариантов осуществления антитело по изобретению представляет собой антитело huMAb2-4 (MAb2_VL1d VH1-IgG1) или его вариант, т.е. выделенное антитело, которое связывается с доменом А3-В3 белков CEACAM5 человека и *Macaca fascicularis* и которое содержит:

с) тяжелую цепь, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 89 или из последовательности, по меньшей мере на 85% идентичной ей; и/или

д) легкую цепь, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 90 или из последовательности, по меньшей мере на 85% идентичной ей.

Антитело по изобретению также может представлять собой однодоменное антитело или его фрагмент. В одном из вариантов осуществления изобретения фрагмент однодоменного антитела может состоять из переменной области тяжелой цепи (VHH), содержащей CDR1-H, CDR2-H и CDR3-H антител, как описано выше. Антитело также может представлять собой антитело из тяжелой цепи, т.е. антитело, лишенное легкой цепи, которое может содержать или не содержать домен CH1.

Однодоменное антитело или его фрагмент также могут содержать каркасные области однодоменного антитела верблюдовых и необязательно константный домен однодоменного антитела верблюдовых.

Антитело по изобретению также может представлять собой фрагмент антитела, например, фрагмент гуманизованного антитела, выбранный из группы, состоящей из Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, (dsFv)₂, scFv, sc(Fv)₂ и диатела.

Антитело также может представлять собой биспецифическое или полиспецифическое антитело, полученное из фрагментов антител, где по меньшей мере один фрагмент антитела представляет собой фрагмент антитела по изобретению. Полиспецифические антитела представляют собой поливалентные белковые комплексы, как описано, например, в EP 2050764 A1 или US 2005/0003403 A1.

Биспецифические или полиспецифические антитела по изобретению могут обладать специфичностью: (а) в отношении эпитопа А3-В3 на CEACAM5 человека/*Macaca fascicularis*, являющемуся мишенью одного из так называемых антител MAb1, MAb2, MAb3, MAb4 и MAb5 и (б) по меньшей мере в отношении одного другого антигена. Согласно одному из вариантов осуществления, по меньшей мере один другой антиген не является представителем семейства CEACAM человека или *Macaca fascicularis*, и в одном из вариантов осуществления по меньшей мере ни одним или не всеми из CEACAM1 человека и *Macaca fascicularis*, CEACAM6 человека и обезьяны, CEACAM7 человека и *Macaca fascicularis* и CEACAM8 человека и *Macaca fascicularis*. Согласно другому варианту осуществления, по меньшей мере один другой антиген может представлять собой эпитоп на CEACAM5 человека и *Macaca fascicularis*, отличный от указанного эпитопа А3-В3, являющегося мишенью одного из так называемых антител MAb1, MAb2, MAb3, MAb4 и MAb5.

Указанные антитела можно получать любым способом, хорошо известным в данной области. В одном из вариантов осуществления указанные антитела получают способами, описанными ниже в настоящем описании.

Антитела и их фрагменты по изобретению можно использовать в выделенной (например, очищенной) форме, или они могут находиться в векторе, таком как мембранный или липидный носитель (например, липосома).

Нуклеиновые кислоты, векторы и рекомбинантные клетки-хозяева.

Дополнительным объектом изобретения является последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая или состоящая из последовательности, кодирующей антитело по изобретению, как определено выше.

Как правило, указанная нуклеиновая кислота представляет собой молекулу ДНК или РНК, которую можно ввести в любой подходящий вектор, такой как плазида, космида, эписома, искусственная хромосома, фаговый или вирусный вектор.

Термины "вектор", "клонированный вектор" и "экспрессирующий вектор" означают носитель, посредством которого последовательность ДНК или РНК (например, чужеродный ген) можно вводить в клетку-хозяина, чтобы трансформировать хозяина и стимулировать экспрессию (например, транскрипцию и трансляцию) введенной последовательности.

Таким образом, дополнительным объектом изобретения является вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по изобретению.

Такие векторы могут содержать регуляторные элементы, такие как промотор, энхансер, терминатор и т.п., вызывающие или контролирующие экспрессию указанного полипептида после введения индивидууму. Примеры промоторов и энхансеров, используемых в экспрессирующем векторе для животной клетки, включают ранний промотор и энхансер SV40 (Mizukami T. et al. 1987), промотор и энхансер LTR вируса лейкоза Молони мышей (Kuwana Y. et al. 1987), промотор (Mason J.O. et al. 1985) и энхансер (Gillies S.D. et al. 1983) H-цепи иммуноглобулина, и т.п.

Можно использовать любой экспрессирующий вектор для клеток животных, при условии, что можно встроить и экспрессировать ген, кодирующий С-область антитела человека. Примеры подходящих векторов включают 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) и т.п.

Другие примеры плазмид включают реплицирующиеся плазмиды, содержащие участок начала репликации, или интегрирующиеся плазмиды, например, такие как pUC, pcDNA, pBR и т.п.

Другие примеры вирусных векторов включают аденовирусные, ретровирусные векторы, векторы на основе вируса герпеса и AAV. Такие рекомбинантные вирусы можно получать способами, известными в данной области, такими как трансфекция упаковывающих клеток или транзитная трансфекция плазмидами- или вирусами-помощниками. Типичные примеры упаковывающих вирусы клеток включают клетки PA317, клетки PsiCRIP, клетки GPenv+, клетки 293 и т.д. Подробные протоколы получения таких дефектных по репликации рекомбинантных вирусов можно найти, например, в WO 95/14785, WO 96/22378, US 5882877, US 6013516, US 4861719, US 5278056 и WO 94/19478.

Дополнительным объектом настоящего изобретения является клетка, трансфицированная, инфицированная или трансформированная нуклеиновой кислотой и/или вектором по изобретению.

Термин "трансформация" означает введение "чужеродного" (т.е. несобственного) гена, последовательности ДНК или РНК в клетку-хозяина так, что клетка-хозяин начинает экспрессировать введенный ген или последовательность с получением желаемого вещества, как правило, белка или фермента, кодируемого вводимыми геном или последовательностью. Клетка-хозяин, получившая и экспрессирующая вводимую ДНК или РНК, является "трансформированной".

Нуклеиновые кислоты по изобретению можно использовать для получения рекомбинантного антитела по изобретению в подходящей экспрессирующей системе. Термин "экспрессирующая система" означает клетку-хозяина и совместимый вектор в условиях, подходящих, например, для экспрессии белка, кодируемого чужеродной ДНК, переносимой вектором и введенной в клетку-хозяина.

Типовые экспрессирующие системы включают клетки-хозяева *E.coli* и плазмидные векторы, клетки-хозяева насекомых и бакуловирусные векторы и клетки-хозяева млекопитающих и векторы. Другие примеры клеток-хозяев включают, но, не ограничиваясь ими, прокариотические клетки (такие как бактерии) и эукариотические клетки (такие как дрожжевые клетки, клетки млекопитающих, клетки насекомых, клетки растений и т.д.). Конкретные примеры включают *E.coli*, дрожжи *Kluveromyces* или *Saccharomyces*, линии клеток млекопитающих (например, клетки Vero, клетки CHO, клетки 3T3, клетки COS и т.д.), а также первичные или стабилизированные культуры клеток млекопитающих (например, получаемые из лимфоцитов, фибробластов, эмбриональных клеток, эпителиальных клеток, нервных клеток, адипоцитов и т.д.). Примеры также включают клетки SP2/0-Ag14 мыши (ATCC CRL1581), клетки P3X63-Ag8.653 мыши (ATCC CRL1580), клетки CHO с дефектным геном дигидрофолатредуктазы (далее в настоящем описании, обозначаемым как "ген DHFR") (Urlaub G. et al; 1980), клетки YB2/3HL.P2.Gil.16Ag.20 крысы (ATCC CRL1662, далее в настоящем описании, обозначаемые как "клетки YB2/0") и т.п. В одном из вариантов осуществления используют клетки YB2/0, ввиду усиления активности ADCC химерных или гуманизированных антител при экспрессии в этих клетках.

Для экспрессии гуманизированного антитела экспрессирующий вектор может быть вектором такого типа, где ген, кодирующий тяжелую цепь антитела, и ген, кодирующий легкую цепь антитела, находятся на отдельных векторах, или типа, где оба гена находятся на одном и том же векторе (тандемного типа). В отношении простоты конструирования экспрессирующего гуманизированного антитела вектора, простоты введения в клетки животных и баланса между уровнем экспрессии цепей H и L антител в клетках животных, экспрессирующий гуманизированное антитело вектор представляет собой вектор тандемного типа Shitara K. et al. *J. Immunol. Methods.* 1994 Jan. 3; 167 (1-2):271-8). Примеры экспрессирующего гуманизированного антитела вектора тандемного типа включают pKANTEX93 (WO 97/10354), pEE18 и т.п.

Настоящее изобретение также относится к способу получения рекомбинантной клетки-хозяина,

экспрессирующей антитело по изобретению, где указанный способ включает стадии: (i) введения рекомбинантной нуклеиновой кислоты или вектора, как описано выше, в компетентные клетки-хозяева *in vitro* или *ex vivo*, (ii) культивирования полученных рекомбинантных клеток-хозяев *in vitro* или *ex vivo* и (iii) необязательного отбора клеток, экспрессирующих и/или секретирующих указанное антитело.

Такие рекомбинантные клетки-хозяева можно использовать для получения антител по изобретению.

Способы получения антител по изобретению

Антитела по изобретению можно получать любым способом, известным в данной области, но без ограничений, таким как любой химический, биологический, генетический или ферментативный способ, отдельно или в комбинации.

Зная аминокислотную последовательность желаемой последовательности, специалист в данной области может легко получать указанные антитела или цепи иммуноглобулинов стандартными способами получения полипептидов. Например, их можно синтезировать хорошо известным способом твердофазного синтеза с использованием коммерчески доступного устройства для пептидного синтеза (такого, как производит Applied Biosystems, Foster City, California) и инструкций производителя. Альтернативно, антитела и цепи иммуноглобулинов по изобретению можно синтезировать посредством технологий рекомбинантных ДНК, как хорошо известно в данной области. Например, эти фрагменты можно получать в качестве продуктов экспрессии ДНК после введения последовательностей ДНК, кодирующих желаемый (поли)пептид в экспрессирующие векторы и введения таких векторов подходящим эукариотическим или прокариотическим хозяевам, которые экспрессируют желаемый полипептид, из которых их позже можно выделять хорошо известными способами.

Кроме того изобретение относится к способу получения антитела по изобретению, где способ включает стадии: (i) культивирования трансформированных клеток-хозяев по изобретению; (ii) экспрессии указанных антитела или полипептида и (iii) восстановления указанных антитела или полипептида.

Антитела по изобретению подходящим способом выделяют из среды для культивирования общепринятыми способами очистки иммуноглобулинов, такими как, например, белок А-сефароза, хроматография на гидроксиапатите, электрофорез в геле, диализ или аффинная хроматография.

В одном из вариантов осуществления гуманизованное химерное антитело по настоящему изобретению можно продуцировать получением последовательности нуклеиновых кислот, кодирующих гуманизованные домены VL и VH, как описано выше, конструируя экспрессирующий химерное антитело человека вектор, вставляя их в экспрессирующий вектор для клеток животных, несущий гены, кодирующие CH антитела человека и CL антитела человека, и экспрессируя кодирующую последовательность, вводя экспрессирующий вектор в клетку животного.

В отношении домена CH химерного антитела человека, он может представлять собой любую область, принадлежащую тяжелым цепям иммуноглобулинов человека, но подходящими являются области класса IgG, а также можно использовать любой из подклассов, принадлежащих классу IgG, таких как IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Также в отношении CL химерного антитела человека, он может представлять собой любую область, принадлежащую легким цепям иммуноглобулинов человека, и можно использовать области класса каппа или класса лямбда.

Способы получения гуманизованных или химерных антител включают общепринятые способы рекомбинантных ДНК и трансфекции генов, которые хорошо известны в данной области (см. Morrison SL. et al. (1984) и патентные документы US 5202238 и US 5204244).

Способы получения гуманизованных антител на основе общепринятых способов рекомбинантных ДНК и трансфекции генов хорошо известны в данной области (см., например, Riechmann L. et al. 1988; Neuberger M.S. et al. 1985). Антитела можно гуманизовать рядом способов, известных в данной области, включая, например, способ, описанный в заявке WO 2009/032661, прививку CDR (EP 239400; публикация PCT WO 91/09967; патенты США 5225539; 5530101 и 5585089), винирование или изменение поверхности (EP 592106; EP 519596; Padlan EA (1991); Studnicka GM et al. (1994); Roguska M.A. et al. (1994)) и перестановку цепей (патент США 5565332). Общая технология рекомбинантных ДНК для получения таких антител также известна (см. Европейскую патентную заявку EP 125023 и международную патентную заявку WO 96/02576).

Fab по настоящему изобретению можно получать, обрабатывая антитело, специфически реагирующее с SEACAM5, протеазой, такой как папаин. Также Fab можно получать, вставляя последовательности ДНК, кодирующие цепи антитела Fab, в вектор для экспрессии у прокариот или для экспрессии у эукариот и вводя вектор в прокариотические или эукариотические клетки (при необходимости) с экспрессией Fab.

F(ab')₂ по настоящему изобретению можно получать, обрабатывая антитело, специфически реагирующее с SEACAM5, протеазой пепсином. Также F(ab')₂ можно получать, связывая Fab', описанные ниже, посредством тиоэфирной связи или дисульфидной связи.

Fab' по настоящему изобретению можно получать, обрабатывая F(ab')₂, специфически реаги-

рующее с SEACAM5, восстановителем, таким как дитиотреитол. Также Fab' можно получать, вставляя последовательности ДНК, кодирующие цепи антитела Fab' в вектор для экспрессии у прокариот или в вектор для экспрессии у эукариот и вводя вектор в прокариотические или эукариотические клетки (при необходимости) с проведением его экспрессии.

scFv по настоящему изобретению можно получать, беря последовательности CDR или доменов VH и VL, как описано выше, конструируя ДНК, кодирующую фрагмент scFv, вставляя ДНК в прокариотический или эукариотический экспрессирующий вектор, и затем вводя экспрессирующий вектор в прокариотические или эукариотические клетки (при необходимости) с экспрессией scFv. Для получения гуманизированного фрагмента scFv, можно использовать хорошо известную технологию, называемую прививка CDR, которая включает выбор определяющих комплементарность областей (CDR) по изобретению, и прививку их на каркас фрагмента scFv человека известной трехмерной структуры (см., например, WO 98/45322; WO 87/02671; US 5859205; US 5585089; US 4816567; EP 0173494).

Модификация(и) антител по изобретению.

Предусмотрена модификация(и) последовательности аминокислот антител, описанных в настоящем описании. Например, может быть желательным улучшить аффинность связывания и/или другие биологические свойства антител. Известно, что когда гуманизированное антитело получают только простой прививкой CDR из VH и VL антитела, полученного у не являющегося человеком животного, в FR VH и VL антитела человека, можно восстанавливать антигенсвязывающую активность сравнительно с активностью исходного антитела, полученного у не являющегося человеком животного. Полагают, что с антигенсвязывающей активностью прямо или опосредованно может быть ассоциировано несколько аминокислотных остатков VH и VL не принадлежащего человеку антитела, не только в CDR, но также и в FR. Таким образом, замена этих аминокислотных остатков другими аминокислотными остатками, происходящими из FR VH и VL антитела человека, будет снижать активность связывания. Для решения этой проблемы в антителах человека с привитыми не принадлежащими человеку CDR, следует предпринимать попытки идентифицировать в аминокислотных последовательностях FR VH и VL антител человека аминокислотный остаток, который непосредственно ассоциирован со связыванием антитела, или который взаимодействует с аминокислотным остатком CDR, или который поддерживает трехмерную структуру антитела, и который непосредственно ассоциирован со связыванием с антигеном. Сниженную антигенсвязывающую активность можно повышать, заменяя идентифицированные аминокислоты аминокислотными остатками исходного антитела, полученного у не являющегося человеком животного.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения шесть CDR антитела мыши по изобретению и три аминокислоты из его каркаса прививали на каркас, принадлежащий человеку, что приводило к получению гуманизированного антитела (MAb2_VLg5VHg2) с тяжелой цепью с последовательностью SEQ ID NO: 74 и легкой цепью с последовательностью SEQ ID NO: 75, которое сохраняет характеристики связывания с SEACAM5 человека и яванского макака.

В структурах антител по настоящему изобретению и в кодирующих их последовательностях ДНК можно проводить модификации и изменения и, тем не менее, получать функциональное антитело или полипептид с желаемыми характеристиками.

При внесении изменений в аминокислотные последовательности полипептида, следует учитывать индекс гидрофобности аминокислот. В данной области в основном понятна важность индекса гидрофобности аминокислот в обеспечении функции биологического взаимодействия белка. Общеизвестно, что относительно гидрофобный характер аминокислоты вносит вклад во вторичную структуру получаемого белка, что в свою очередь определяет взаимодействие белка с другими молекулами, например, ферментами, субстратами, рецепторами, ДНК, антителами, антигенами и т.п. У каждой аминокислоты определен индекс гидрофобности на основе ее гидрофобности и характеристик заряда, они представляют собой: изолейцин (+4,5); валин (+4,2); лейцин (+3,8); фенилаланин (+2,8); цистеин/цистин (+2,5); метионин (+1,9); аланин (+1,8); глицин (-0,4); треонин (-0,7); серин (-0,8); триптофан (-0,9); тирозин (-1,3); пролин (-1,6); гистидин (-3,2); глутаминат (-3,5); глутамин (-3,5); аспаргат (-3,5); аспарагин (-3,5); лизин (-3,9) и аргинин (-4,5).

Дополнительным объектом по настоящему изобретению являются варианты полипептидов по настоящему изобретению с сохранением функции.

Например, определенные аминокислоты в структуре белка можно заменять другими аминокислотами без существенной потери активности. Так как способность к взаимодействию и характер белка определяют его биологическую функциональную активность, можно проводить определенные замены аминокислот в последовательности белка и, конечно, в кодирующей его последовательности ДНК, однако при этом получая белок со сходными свойствами. Таким образом, предусмотрено, что в последовательностях антител по изобретению или в соответствующих последовательностях ДНК, кодирующих указанные полипептиды, можно проводить различные изменения без существенной потери их биологической активности.

В данной области известно, что определенные аминокислоты можно заменять другими аминокислотами со сходным индексом или показателем гидрофобности и, тем не менее, получать белок со

сходной биологической активностью, т.е. по-прежнему получать биологически функционально эквивалентный белок. Для идентификации в антителе или полипептиде по изобретению всех аминокислот, которые можно заменять без значительной потери связывания с антигеном, также можно использовать хорошо известные способы, такие как способ со сканированием аланином. Такие остатки можно квалифицировать как нейтральные, так как они не вовлечены в связывание антигена или в поддержание структуры антитела. Одно или несколько этих нейтральных положений можно замещать аланином или другой аминокислотой без изменений основных характеристик антитела или полипептида по изобретению.

Это проиллюстрировано в настоящем изобретении посредством способа со сканированием аланином, проведенного на CDR MAb2_{K52R}, продемонстрировавшего, что несколько положений этих CDR, по-видимому, являются нейтральными, так как аланин фактически можно заменять без достоверного влияния на связывание с CEACAM5 человека и яванского макака. Таким образом, ожидают, что варианты антител, полученные после таких нейтральных замен, останутся функционально идентичными исходному антителу. В приводимом примере 6.4 проводили замены в гуманизованном варианте MAb2, но предсказуемо, что подобные вариации также будут сохранять биологическую функцию при введении в любой вариант MAb2, MAb4 или MAb5, так как все эти родственные антитела несут один и тот же набор из 6 CDR или очень близкородственных CDR. Нейтральные положения можно определить как остатки 27, 28, 29, 31, 51, 52, 89, 90, 93, 94, 96, 97 в последовательностях VL этого семейства антител (SEQ ID NO: 34, или SEQ ID NO: 38, или SEQ ID NO: 40, или SEQ ID NO: 17, или SEQ ID NO: 23, или SEQ ID NO: 29, или SEQ ID NO: 55, или SEQ ID NO: 75) и остатки 26-31, 51-58, 97, 103, 104, 107, 109 в последовательностях VH этого семейства антител (SEQ ID NO: 33, или SEQ ID NO: 37, или SEQ ID NO: 39, или SEQ ID NO: 5, или SEQ ID NO: 51, или SEQ ID NO: 74).

Нейтральные положения можно представить как положения, где в CDR MAb2, MAb4 или MAb5 можно проводить любую замену аминокислоты. Фактически, в принципе сканирования аланином аланин выбран, поскольку этот остаток не несет особых структурных или химических свойств. Общеизвестно, что если аланином можно заменять конкретную аминокислоту без изменения свойств белка, многие другие замены, если не все замены, аминокислот, с большой вероятностью, также будут нейтральными. В противном случае, когда аланин является аминокислотой дикого типа, если показано, что конкретная замена является нейтральной, с большой вероятностью другие замены также будут нейтральными.

В приведенном примере 6.4 в CDR MAb2, MAb4 или MAb5 также идентифицированы четыре положения, для которых выявлено, что они не являются нейтральными относительно сканирования аланином, но где замены аминокислот консервативного типа обладают нейтральным действием (остатки 30 и 92 в последовательностях VL и остатки 98 и 100 в последовательностях VH этого семейства антител)

Также ожидают, что две или более нейтральных мутаций в различных положениях в любой или в обеих последовательностях антитела при комбинации, как правило, приведут к антителу, которое в значительной степени сохраняет функциональную активность исходного антитела. Это проиллюстрировано, например, на комбинированных заменах LC_T51A и LC_T94A, VL_S31A и VH_G54Y или VL_T53I и VH_S53A в MAb2_VLg5VHg2.

Как изложено выше, замены аминокислот, таким образом, как правило, основаны на относительном сходстве заместителей боковых цепей аминокислот, например, на их гидрофобности, гидрофильности, заряде, размере и т.п. Иллюстративные замены, которые учитывают любую из указанных выше характеристик, хорошо известны специалистам в данной области и включают: аргинин и лизин; глутаминат и аспартат; серин и треонин; глутамин и аспарагин и валин, лейцин и изолейцин.

Также может быть желательно модифицировать антитело по изобретению в отношении эффекторной функции, например, чтобы усилить обусловленную антигеном опосредованную клетками цитотоксичность (ADCC) и/или обусловленную компонентом цитотоксичность (CDC) антитела. Этого можно достичь посредством проведения одной или нескольких замен аминокислот в Fc-области антитела. Альтернативно или дополнительно, в Fc-область можно вводить остаток(ки) цистеина, таким образом, обеспечивая формирование в этой области дисульфидной связи между цепями. Полученное, таким образом, гомодимерное антитело может обладать улучшенной способностью к интернализации и/или усиленным, обусловленным компонентом, уничтожением клеток и/или антителозависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC) (Caron P.C. et al. 1992; и Shopes B. 1992).

Другой тип модификации аминокислот антитела по изобретению может быть пригоден для изменения исходного профиля гликозилирования антитела, т.е. посредством удаления одной или нескольких углеводных групп, находящихся в антителе, и/или добавления одного или нескольких участков гликозилирования, которые не представлены в антителе. Присутствие любой из трипептидных последовательностей аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X представляет собой любую аминокислоту за исключением пролина, создает потенциальный участок гликозилирования. Добавление или удаление участка гликозилирования в антителе подходящим образом проводят, изменяя по-

следовательность аминокислот так, чтобы она содержала одну или несколько описанных выше трипептидных последовательностей (для N-связанных участков гликозилирования).

Другой тип модификации включает удаление последовательностей, *in silico* или экспериментально определенных, как потенциально приводящие к продуктам разрушения или гетерогенности препаратов антител. В качестве примеров, в зависимости от таких факторов, как pH и поверхностная экспозиция, может происходить дезамидирование остатков аспарагина и глутамина. Особенно чувствительны к дезамидированию остатки аспарагина, преимущественно, когда они находятся в последовательности Asn-Gly, и в меньшей степени в других дипептидных последовательностях, таких как Asn-Ala. Таким образом, когда в антителе или полипептиде по изобретению присутствует такой участок дезамидирования, в частности Asn-Gly, может быть желательно удалить этот участок, как правило, посредством консервативной замены с удалением одного из участвующих остатков. Такие замены в последовательности с удалением одного из участвующих остатков также предназначены для включения в настоящее изобретение.

Другой тип ковалентной модификации включает химическое или ферментативное связывание с антителом гликозидов. Эти способы предпочтительны тем, что они не требуют получения антитела в клетке-хозяине, которая обладает способностью к гликозилированию для N- или O-связанного гликозилирования. В зависимости используемого способа связывания, сахар(а) можно присоединять к: (а) аргинину и гистидину, (b) свободным карбоксильным группам, (с) свободным сульфгидрильным группам, таким как группы цистеина, (d) свободным гидроксильным группам, таким как группы серина, треонина или гидроксипролина, (е) ароматическим остаткам, таких как остатки фенилаланина, тирозина или триптофана, или (f) к амидной группе глутамина. Например, такие способы описаны в WO 87/05330.

Удаление любой углеводной группы, находящейся на антителе, можно проводить химически или ферментативно. Химическое дегликозилирование требует воздействия на антитело соединения трифторметансульфоновой кислоты или эквивалентного соединения. Эта обработка приводит к отщеплению большинства или всех Сахаров за исключением связывающего сахара (N-ацетилглюкозамин или N-ацетилгалактозамин), оставляя антитело интактным. Химическое дегликозилирование описано в Sojahr H. et al. (1987) и в Edge, A.S. et al. (1981). Ферментативное отщепление углеводных групп от антитела можно проводить с использованием ряда эндо- и экзогликозидаз, как описано в Thotakura, N.R. et al. (1987).

Другой тип ковалентной модификации антитела включает связывание антитела с одним из ряда небелковых полимеров, например, с полиэтиленгликолем, полипропиленгликолем или полиоксиалкиленами, способом, указанным в патентах США 4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192 или 4179337.

Иммуноконъюгаты.

Настоящее изобретение также относится к цитотоксическим конъюгатам, или иммуноконъюгатам, или конъюгатам антитело-лекарственное средство, или конъюгатам. Как используют в настоящем описании, все эти термины имеют одно и то же значение и являются взаимозаменяемыми.

Антитела мыши, MAb1, MAb2, MAb3, MAb4 и MAb5, конъюгировали с майтанзиноидом (DM4) посредством линкера SPDB (N-сукцинимидилпиридилдितिобутират). Обнаружено, что полученные конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) обладают цитотоксической активностью на клетки рака желудка MKN45 человека со значениями $IC_{50} \leq 1$ нМ.

Подобным образом получали конъюгаты антитело-SPDB-DM4 на основе химерной формы каждого из MAb1, MAb2, MAb4 и MAb5. Полученные chMAb1-SPDB-DM4, chMAb2-SPDB-DM4, chMAb3-SPDB-DM4 и chMAb4-SPDB-DM4 оценивали в двух дозах в отношении поддающихся измерению первичных опухолей толстого кишечника CR-IGR-034P, п./к. имплантированных самкам мышей SCID. Анализ изменения объема опухоли для каждого обработанного и контрольного животных и % регресса опухоли продемонстрировали, что chMAb2-SPDB-DM4, chMAb4-SPDB-DM4 и chMAb5-SPDB-DM4 являлись высокоактивными, по меньшей мере при наибольшей оцениваемой дозе, и что chMAb2-SPDB-DM4 был активен в обеих оцениваемых дозах. В частности, получали до 82% регресса опухоли.

Конъюгаты антитело-SPDB-DM4 также получали с использованием гуманизированных вариантов MAb2 (huMAb2-1-SPDB-DM4, huMAb2-2-SPDB-DM4 и huMAb2-3-SPDB-DM4). ADC, содержащие химерные (chMAb2-SPDB-DM4) или гуманизированные варианты MAb2, сравнивали с конъюгатом неродственное антитело-SPDB-DM4 в отношении цитотоксической активности для клеток MKN45. Все ADC с химерными и гуманизированными вариантами MAb2 демонстрировали значения $IC_{50} \leq 1$ нМ, т.е. значения IC_{50} в 53-35 раза меньше, чем измеренная цитотоксическая активность конъюгата DM4 с неродственным антителом, таким образом, свидетельствуя об опосредованной CEACAM5 цитотоксической активности конъюгатов с антителами к CEACAM5.

Оценивали противоопухолевую активность huMAb2-3-SPDB-DM4 и huMAb2-4-SPDB-DM4 и сравнивали с chMAb2-SPDB-DM4 в отношении измеримых первичных опухолей толстого кишечника

CR-IGR-034P, п./к. имплантированного самкам голых мышей CD-1. Все конъюгаты являлись высокоактивными при наибольшей оцениваемой дозе (10 мг/кг).

Дополнительно оценивали противоопухолевую активность huMAb2-3-SPDB-DM4 и huMAb2-3-сульфо-SPDB-DM4 в отношении измеримых первичных опухолей толстого кишечника CR-IGR-034P, п./к. имплантированных самкам мышей SCID. huMAb2-3-SPDB-DM4 был активен при 5 и 2,5 мг/кг, huMAb2-3-сульфо-SPDB-DM4 был высокоактивен при 5 мг/кг и активен при 2,5 мг/кг.

Дополнительно оценивали противоопухолевую активность huMAb2-3-SPDB-DM4 в отношении измеримых первичных опухолей легких LUN-NIC-0014, п./к. имплантированных самкам мышей SCID, и выявлено, что они являлись высокоактивными при 10 и 5 мг/кг.

Каждый конъюгат с DM4 содержал среднее количество молекул DM4 (или "отношение лекарственное средство-к-антителу" или "DAR" находилось) в диапазоне от 2 до 5.

Таким образом, изобретение относится к "иммуноконъюгатам", содержащим антитело по изобретению, связанное или конъюгированное по меньшей мере с одним ингибирующим рост средством, таким как цитотоксическое средство или радиоактивный изотоп.

"Ингибирующее рост средство" или "антипролиферативное средство", которое можно использовать независимо, относится к соединению или композиции, которая ингибирует рост клеток, особенно опухолевых клеток, *in vitro* или *in vivo*.

Как используют в настоящем описании, термин "цитотоксическое средство" относится к веществу, ингибирующему или предотвращающему функционирование клеток и/или вызывает разрушение клеток. Термин "цитотоксическое средство" предназначен для включения химиотерапевтических средств, ферментов, антибиотиков и токсинов, таких как низкомолекулярные токсины или ферментативно активные токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, включая их фрагменты и/или варианты, и различных противоопухолевых средств или средств против злокачественных опухолей, описанных ниже. В некоторых вариантах осуществления цитотоксическое средство представляет собой таксоид, алкалоид барвинка, майтанзиноид или аналог майтанзиноида, такой как DM1 или DM4, низкомолекулярное лекарственное средство, тонамицин или производное пирролобензодиазепина, производное криптофицина, производное лептофицина, ауристин или аналог доластатина, пролекарственное средство, ингибиторы топоизомеразы II, алкилирующее ДНК средство, антитубулиновое средство, СС-1065 или аналог СС-1065.

Как используют в настоящем описании, "майтанзиноиды" означают майтанзиноиды и аналоги майтанзиноидов. Майтанзиноиды представляют собой лекарственные средства, которые ингибируют формирование микротрубочек и которые являются высокотоксичными для клеток млекопитающих.

Примеры подходящих майтанзиноидов включают майтанзинол и аналоги майтанзинола.

Примеры подходящих аналогов майтанзинола включают аналоги майтанзинола с модифицированным ароматическим кольцом и аналоги майтанзинола с модификациями в других положениях. Такие подходящие майтанзиноиды описаны в патентах США 4424219; 4256746; 4294757; 4307016; 4313946; 4315929; 4331598; 4361650; 4362663; 4364866; 4450254; 4322348; 4371533; 6333410; 5475092; 5585499 и 5846545.

Конкретные примеры подходящих аналогов майтанзинола с модифицированным ароматическим кольцом включают:

(1) С-19-дехлор (патент США 4256746) (полученный посредством восстановления ЛАН ансамитина Р2);

(2) С-20-гидрокси-(или С-20-деметил)+/-С-19-дехлор (патенты США 4361650 и 4307016) (полученный посредством деметилирования с использованием *Streptomyces* или *Actinomyces* или дехлорирования с использованием ЛАН); и

(3) С-20-деметокси, С-20-ацилокси (-OCOR), +/-дехлор (патент США 4294757) (полученный посредством ацилирования с использованием ацилхлоридов).

Конкретные примеры подходящих аналогов майтанзинола с модификациями в других положениях включают:

(1) С-9-SH (патент США 4424219) (полученный посредством реакции майтанзинола с H₂S или P₂S₅);

(2) С-14-алкоксиметил (деметокси/CH₂OR) (патент США 4331598);

(3) С-14-гидроксиметил или ацилоксиметил (CH₂OH или CH₂OAc) (патент США 4450254) (полученный у *Nocardia*);

(4) С-15-гидрокси/ацилокси (патент США 4364866) (полученный посредством преобразования майтанзинола *Streptomyces*);

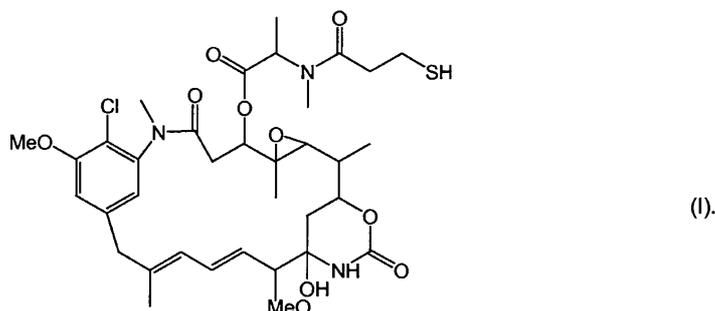
(5) С-15-метокси (патенты США №№ 4313946 и 4315929) (выделенный из *Trewia nudiflora*);

(6) С-18-н-деметил (патенты США 4362663 и 4322348) (полученный посредством деметилирования майтанзинола *Streptomyces*); и

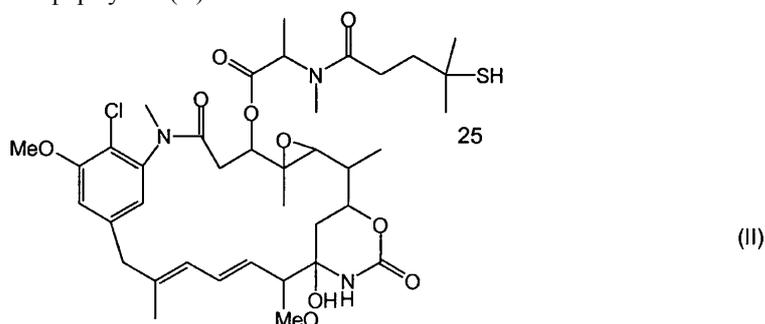
(7) 4,5-дезоксид (патент США 4371533) (полученный посредством восстановления майтанзинола трихлоридом титана/ЛАН).

В одном из вариантов осуществления изобретения в цитотоксических конъюгатах по настояще-

му изобретению в качестве цитотоксического средства используют тиолсодержащий майтанзиноид (DM1), формально называемый N²-деацетил-N²¹-(3-меркапто-1-оксопропил)майтанзин. DM1 представлен следующей структурной формулой (I):



В другом варианте осуществления в цитотоксических конъюгатах по настоящему изобретению в качестве цитотоксического средства используют тиолсодержащий майтанзиноид DM4, формально называемый N²¹-деацетил-N²¹-(4-метил-4-меркапто-1-оксопентил)майтанзин. DM4 представлен следующей структурной формулой (II):



В дополнительных вариантах осуществления изобретения можно использовать другие майтанзины, включая тиол- и дисульфидсодержащие майтанзиноиды, содержащие моно- или диалкильную замену на атоме углерода, несущим атом серы. Они включают майтанзиноид содержащий в С-3, С-14-гидроксиметил, С-15-гидрокси или С-20-дезметил, боковую цепь ацилированной аминокислоты с ацильной группой, несущей пространственно-затрудненную сульфгидрильную группу, где атом углерода ацильной группы, несущий тиольную функциональную группу, содержит один или два заместителя, где указанные заместители представляют собой CH₃, C₂H₅, линейный или разветвленный алкил или алкенил, содержащий от 1 до 10 реагентов, и в растворе может присутствовать любой агрегат.

Примеры этих цитотоксических средств и способов конъюгации дополнительно приведены в заявке WO 2008/010101, которая включена посредством ссылки.

Термин "радиоактивный изотоп" предназначен для включения радиоактивных изотопов, подходящих для лечения злокачественных опухолей, таких как At²¹¹, Bi²¹², Er¹⁶⁹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, In¹¹¹, P³², Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Si⁸⁹ и радиоактивные изотопы Lu. Как правило, такие радиоактивные изотопы в основном испускают бета-излучение. В одном из вариантов осуществления радиоактивный изотоп представляет собой испускающий альфа-излучение изотоп, более конкретно торий 227, который испускает альфа-излучение. Иммуноконъюгаты по настоящему изобретению можно получать, как описано в заявке WO 2004/091668.

В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению ковалентно, напрямую или посредством расщепляемого или нерасщепляемого линкера, связаны по меньшей мере с одним ингибирующим рост средством.

Как используют в настоящем описании, "линкер" означает химическую молекулу, содержащую ковалентную связь или цепь атомов, которые ковалентно связывают полипептид с молекулой лекарственного средства.

Конъюгаты можно получать способами *in vitro*. Для связывания лекарственного средства или пролекарственного средства с антителом используют линкерную группу. Подходящие линкерные группы хорошо известны в данной области и включают дисульфидные группы, тиоэфирные группы, кислотолabile группы, фотолabile группы, пептидазолabile группы и эстеразолabile группы. Конъюгацию антител по изобретению с цитотоксическими средствами или ингибирующими рост средствами можно проводить с использованием ряда бифункциональных связывающих белки средств, включая, но, не ограничиваясь ими, N-сукцинимидилпиридилдитиобутират (SPDB), 4-[(5-нитро-2-пиридинил)дитио]-2,5-диоксо-1-пирролидиниловый эфир бутановой кислоты (нитро-SPDB), 4-(пиридин-2-илдисульфанил)-2-сульфомаляную кислоту (сульфо-SPDB), N-сукцинимидил(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP), сукцинимидил(N-малеимидометил)циклогексан-

1-карбоксилат (SMCC), имиотиолан (IT), бифункциональные производные сложных имидоэфиров (такие как диметиладипимидат HCL), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаровый альдегид), бис-азидосоединения (такие как бис-(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис-(п-диазонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и соединения бис-активного фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, можно получать рициновый иммунотоксин, как описано в Vitetta et al (1987). Иллюстративным хелатирующим средством для конъюгации радионуклеотида с антителом является меченная по углероду 1-изотиоцианато-бензилметилдиэтилентриаминпентауксусная кислота (MX-DTPA) (WO 94/11026).

Линкер может представлять собой "расщепляемый линкер" облегчающий высвобождение цитотоксического средства или ингибирующего рост средства в клетке. Например, можно использовать кислотолabile линкер, чувствительный к пептидазам линкер, эстеразолabile линкер, фотолabile линкер или дисульфидсодержащий линкер (например, см. патент США 5208020). Также линкер может быть "нерасщепляемым линкером" (например, линкер SMCC), что в некоторых случаях может приводить к лучшей переносимости.

Альтернативно, посредством рекомбинантных способов или пептидного синтеза можно получить слитый белок, содержащий антитело по изобретению и цитотоксический или ингибирующий рост полипептид. Последовательность ДНК может содержать соответствующие области, кодирующие две части конъюгата, или одну рядом с другой, или разделенные областью, кодирующей линкерный пептид, который не нарушает желаемые свойства конъюгата.

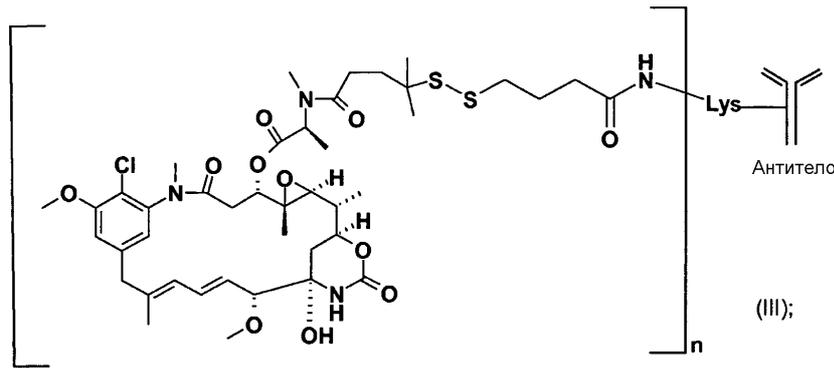
Антитела по настоящему изобретению также можно использовать в зависимой опосредованной ферментами терапии пролекарственными средствами посредством конъюгации полипептида с активирующим пролекарственное средство ферментом, которые преобразует пролекарственное средство (например, пептидильное химиотерапевтическое средство, см. WO 81/01145) в активное противораковое лекарственное средство (см., например, WO 88/07378 и патент США 4975278). Ферментативный компонент иммуноконъюгата, пригодный для ADEPT, включает любой фермент, способный действовать на пролекарственное средство таким образом, чтобы преобразовывать его в более активную, цитотоксическую форму. Ферменты, которые пригодны в способе по настоящему изобретению включают, но, не ограничиваясь ими, щелочную фосфатазу, пригодную для преобразования в свободные лекарственные средства фосфатсодержащих пролекарственных средств; арилсульфатазу, пригодную для преобразования в свободные лекарственные средства сульфатсодержащих пролекарственных средств; цитозиндезаминазу, пригодную для преобразования в противораковое лекарственное средство 5-фторурацил нетоксичный фторцитозин; протеазы, такие как протеаза Serratia, термолизин, субтилизин, карбоксипептидазы и катепсины (такие как катепсины В и L), которые пригодны для преобразования в свободные лекарственные средства пептидсодержащих пролекарственных средств; D-аланилкарбоксипептидазы, пригодные для преобразования пролекарственных средств, содержащих заместители D-аминокислот; расщепляющие углеводы ферменты, такие как O-галактозидаза и нейраминидаза, пригодные для преобразования в свободные лекарственные средства гликозилированных пролекарственных средств; Р-лактамазу, пригодную для преобразования в свободные лекарственные средства лекарственных средств, дериватизированных Р-лактамами; и пенициллинамидазы, такие как пенициллин V амидаза или пенициллин G амидаза, пригодные для преобразования в свободные лекарственные средства лекарственных средств, дериватизированных по их атомам азота аминов феноксиацетильными или фенилацетильными группами, соответственно. Ферменты можно ковалентно связывать с полипептидами по изобретению способами, хорошо известными в данной области, такими как использование гетеробифункциональных сшивающих реагентов, описанных выше.

Согласно одному из вариантов осуществления, ингибирующее рост средство в конъюгате по изобретению представляет собой майтанзиноид, в одном из вариантов осуществления - DM1 или DM4.

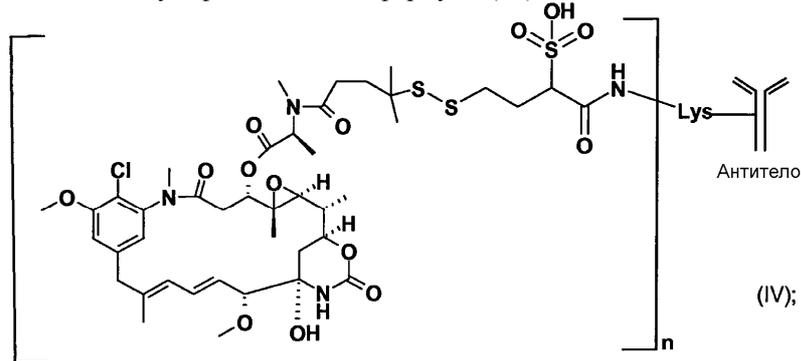
В указанном конъюгате антитело конъюгировано с указанным по меньшей мере одним ингибирующим рост средством посредством линкерной группы. В одном из вариантов осуществления указанная линкерная группа представляет собой расщепляемый или нерасщепляемый линкер, такой как SPDB, сульфо-SPDB или SMCC.

Конъюгат можно выбирать из группы, состоящей из:

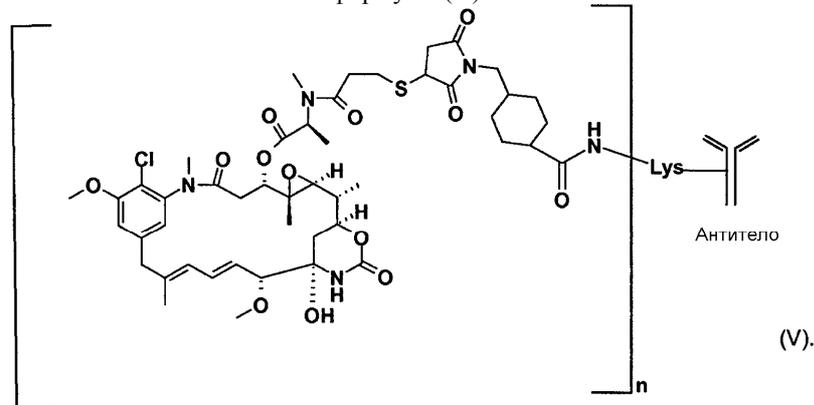
- i) конъюгата антитело-SPDB-DM4 формулы (III)

**Ab-SPDB-DM4**

ii) конъюгата антитело-сульфо-SPDB-DM4 формулы (IV)

**Ab-SulfoSPDB-DM4**

и iii) конъюгата антитело-SMCC-DM1 формулы (V)

**Ab-SMCC-DM1**

В указанном варианте осуществления антитело, включаемое в конъюгат, выбрано из группы, состоящей из:

- i) гуманизованного антитела, содержащего тяжелую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 51 и легкую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 17,
- ii) гуманизованного антитела, содержащего тяжелую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 5 и легкую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 23,
- iii) гуманизованного антитела, содержащего тяжелую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 5 и легкую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 29 и
- iv) гуманизованного антитела, содержащего тяжелую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 51 и легкую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 55.

В одном из вариантов осуществления конъюгат представляет собой конъюгат формулы (III), (IV) или (V), как определено выше, в котором антитело представляет собой гуманизованное антитело, содержащее тяжелую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 5 и легкую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 29.

Как правило, конъюгат можно получать способом, включающим стадии:

- (i) приведения необязательно буферного водного раствора связывающего клетки средства (например, антитела по изобретению) в контакт с растворами линкера и цитотоксического соединения;

(ii) последующего необязательного отделения конъюгата, который образуется в (i), от непрореагировавшего связывающего клетки средства.

Водный раствор связывающего клетки средства можно буферировать такими буферами, как, например, фосфат, ацетат, цитрат калия или N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота (буфер HEPES). Буфер зависит от характера связывающего клетки средства. Цитотоксическое соединение находится в растворе в органическом полярном растворителе, например, в диметилсульфоксиде (ДМСО) или диметилацетамиде (DMA).

Температура реакции, как правило, составляет от 20 до 40°C. Время реакции может варьировать от 1 до 24 ч. Реакцию между связывающим клетки средством и цитотоксическим средством можно контролировать посредством эксклюзионной хроматографии (SEC) с использованием рефрактометрического и/или УФ-детектора. Если выход конъюгата является слишком низким, можно увеличить время реакции.

Для проведения разделения на стадии (ii) специалист в данной области может использовать ряд различных методов хроматографии: например, конъюгат можно очищать посредством SEC, адсорбционной хроматографии (такой как ионообменная хроматография, ИЕС), гидрофобной хроматографии (НЕС), аффинной хроматографии, хроматографии со смешанной подложкой, такой как хроматография на гидроксипатите, или высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Также можно использовать очистку посредством диализа или диафильтрации.

Как используют в настоящем описании, термин "агрегаты" означает ассоциаты, которые могут формироваться между двумя или более связывающими клетки средствами, где указанные средства являются модифицированными, или не посредством конъюгации. Агрегаты могут образовываться под воздействием большого количества параметров, таких как высокая концентрация связывающего клетки средства в растворе, pH раствора, высокое напряжение сдвига, количество связанных димеров и их характер гидрофобности, температура (см. Wang & Gosh, 2008, J. Membrane Sci., 318: 311-316 и цитируемые там ссылки); следует отметить, что относительное влияние некоторых из этих параметров точно не установлено. В случае белков и антител, специалист в данной области может обратиться к Cromwell et al. (2006, AAPS Journal, 8(3): E572-E579). Содержание агрегатов можно определять хорошо известным специалистам способом, таким как SEC (см. Walter et al., 1993, Anal. Biochem., 212(2): 469-480).

После стадии (i) или (ii), содержащий конъюгат раствор может быть подвергнут дополнительной стадии (iii) хроматографии, ультрафильтрации и/или диафильтрации.

После проведения этих стадий конъюгат восстанавливают в водном растворе.

Согласно одному из вариантов осуществления, конъюгат по изобретению характеризуется "отношением лекарственного средства к антителу" (или "DAR") в диапазоне от 1 до 10, например, от 2 до 5, в частности от 3 до 4. Как правило, это представляет собой случай конъюгатов, содержащих молекулы майтанзиноидов.

Эта величина DAR может варьировать в зависимости от характера используемого антитела и лекарственного средства (т.е. ингибирующего рост средства) наряду с экспериментальными условиями, используемыми для конъюгации (подобных отношению ингибирующего рост средства/антитела, времени реакции, характера растворителя и соразтворителя, если он присутствует). Таким образом, контакт антитела и ингибирующего рост средства приводит к получению смеси, содержащей несколько конъюгатов, отличающихся друг от друга различными отношениями лекарственного средства к антителу; необязательно чистого антитела; необязательно агрегатов. Таким образом, определяемое DAR является средним значением.

Способ, который можно использовать для определения DAR, заключается в спектрофотометрическом измерении отношения оптической плотности раствора в значительной степени очищенного конъюгата при λ_D и 280 нм. 280 нм представляет собой длину волны, как правило, используемую для измерения концентрации белка, такой как концентрация антитела. Длина волны λ_D выбрана так, чтобы обеспечить отличие лекарственного средства от антитела, т.е. как абсолютно понятно специалисту, λ_D представляет собой длину волны, при которой лекарственное средство обладает высокой оптической плотностью, и λ_D достаточно далека от 280 нм во избежание существенного перекрытия пиков оптической плотности лекарственного средства и антитела. В случае молекул майтанзиноидов, λ_D можно выбирать величиной 252 нм. Способ расчета DAR можно узнать в Antony S. Dimitrov (ed), LLC, 2009, Therapeutic Antibodies and Protocols, vol. 525, 445, Springer Science:

Оптические плотности конъюгата при λ_D (A_{λ_D}) и при 280 нм (A_{280}) измеряют в анализе мономерных пиков при эксклюзионной хроматографии (SEC) (что позволяет рассчитать параметр "DAR(SEC)") или с использованием классического спектрофотометрического устройства (что позволяет рассчитать параметр "DAR(UV)"). Оптические плотности можно выразить следующим образом:

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

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

где C_D и C_A соответственно представляют собой концентрации лекарственного средства и анти-

тела в растворе,

$\epsilon_{D\lambda_D}$ и ϵ_{D280} соответственно представляют собой молярные коэффициенты экстинкции лекарственного средства при λ_D и 280 нм,

$\epsilon_{A\lambda_D}$ и ϵ_{A280} соответственно представляют собой молярные коэффициенты экстинкции антитела при λ_D и 280 нм.

Решение этих двух уравнений с двумя неизвестными приводит к следующим уравнениям:

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

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

Затем на основании отношения концентрации лекарственного средства к концентрации антитела рассчитывают среднее DAR: $DAR = C_D / C_A$.

Фармацевтические композиции.

Антитела или иммуноконъюгаты по изобретению для получения терапевтических композиций можно комбинировать с фармацевтически приемлемыми эксципиентами и необязательно матриксами с длительным высвобождением, такими как биоразлагаемые полимеры.

Таким образом, другой объект изобретения представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую антитело или иммуноконъюгат по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

Изобретение также относится к полипептиду или иммуноконъюгату по изобретению для применения в качестве лекарственного средства.

"Фармацевтически" или "фармацевтически приемлемый" относится к молекулярным структурам и композициям, которые не приводят к вредным, аллергическим или другим неблагоприятным реакциям, когда их, при необходимости, вводят млекопитающему, особенно человеку. Фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент относится к нетоксическому твердому, полутвердому или жидкому наполнителю, разбавителю, инкапсулирующему веществу или составу вспомогательного средства любого типа.

Как используют в настоящем описании, "фармацевтически приемлемые носители" включает любой и все растворители, диспергирующие среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, и т.п., которые являются физиологически совместимыми. Примеры подходящих носителей, разбавителей и/или эксципиентов включают одно или несколько из воды, аминокислот, физиологического раствора, забуференного фосфатом солевого буфера, фосфатного, ацетатного, цитратного, сукцинатного буферов; аминокислот и их производных, таких как гистидин, аргинин, глицин, пролин, глицилглицин; неорганических солей NaCl, хлорида кальция; сахаров или полиспиртов, таких как декстроза, глицерин, этанол, сахароза, трегалоза, маннит; поверхностно-активных веществ, таких как полисорбат 80, полисорбат 20, полоксамер 188 и т.п., а также их комбинации. Во многих случаях, в композицию предпочтительно включать средства придания изотоничности, такие как сахара, полиспирты или хлорид натрия, а также состав может содержать антиоксидант, такой как триптамин, и стабилизатор, такой как Tween 20.

Понятно, что форма фармацевтических композиций, путь введения, дозировка и схема лечения зависят от состояния, подлежащего лечению, тяжести заболевания, возраста, массы и пола пациента, и т.д.

Фармацевтические композиции по изобретению можно формулировать для топического, перорального, парентерального, интраназального, внутривенного, внутримышечного, подкожного или внутриглазного введения и т.п.

В одном из вариантов осуществления фармацевтические композиции содержат носители, которые являются фармацевтически приемлемыми для инъектируемого состава. Они могут представлять собой изотонические, стерильные, солевые растворы (моно- или дифосфат натрия, хлорид натрия, калия, кальция или магния и т.п. или смеси таких солей соли) или сухие, особенно лиофилизированные композиции, которые при добавлении, в зависимости от случая, стерилизованной воды или физиологического раствора, обеспечивают состав инъектируемых растворов.

Фармацевтическую композицию можно вводить посредством устройств для комбинирования лекарственных средств.

Дозы, используемые для введения, можно устанавливать как функцию различных параметров, например, как функцию применяемого способа введения, соответствующей патологии или, альтернативно, желаемой длительности лечения.

Для получения фармацевтических композиций эффективное количество антитела или иммуноконъюгата по изобретению можно растворять или диспергировать в фармацевтически приемлемом носителе или водной среде.

Фармацевтические формы, подходящие для применения в качестве инъекций, включают стерильные водные растворы или дисперсии; составы, содержащие кунжутное масло, арахисовое масло или водный пропиленгликоль; и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных инъектируемых растворов или дисперсий. Во всех случаях, форма должна быть стерильной и инъекти-

руемой посредством подходящего устройства или системы для доставки без разрушения. Она должна быть стабильна в условиях получения и хранения, и ее необходимо предохранять от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы.

Растворы активных соединений можно получать в виде свободных оснований или фармакологически приемлемых солей в воде, подходящим образом смешивая с поверхностно-активным веществом. Также можно получать дисперсии в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях, и в маслах. В обычных условиях хранения и применения эти препараты содержат консервант для предотвращения роста микроорганизмов.

Полипептид, антитело или иммуноконъюгат по изобретению можно формулировать в композиции в нейтральной форме или в форме соли. Фармацевтически приемлемые соли включают кислотно-аддитивные соли (формируемые со свободными аминогруппами белка), которые сформированы с неорганическими кислотами, такими как, например, хлористоводородная или фосфорная кислоты, или такими органическими кислотами как уксусная, щавелевая, винная, миндальная и т.п. Также можно получать соли, формируемые свободными карбоксильными группами с неорганическими основаниями, например, такими как гидроксиды натрия, калия, аммония, кальция или железа, и с такими органическими основаниями как изопропиламин, триметиламин, глицин, гистидин, прокаин и т.п.

Носитель также может представлять собой растворитель или диспергирующую среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль, и т.п.), их подходящие смеси и растительные масла. Подходящую текучесть можно поддерживать, например, используя такие покрытия, как лецитин, поддерживая требуемый размер частиц, в случае дисперсии, и используя поверхностно-активные вещества. Предотвращение действия микроорганизмов можно осуществлять различными антибактериальными и противогрибковыми средствами, например, парабенами, хлорбутанолом, фенолом, сорбиновой кислотой, тимеросалом и т.п. Во многих случаях предпочтительно включать средства придания изотоничности, например, сахара или хлорид натрия.

Пролонгирование всасывания инъекируемых композиций можно осуществлять, используя в композициях средства, задерживающие всасывание, например, моностеарат алюминия и желатин.

Стерильные инъекируемые растворы получают посредством добавления требуемого количества активного соединения в подходящий растворитель, при необходимости, с любым из других ингредиентов, перечисленных выше, с последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, дисперсии получают, добавляя различные стерилизованные активные ингредиенты в стерильный носитель, содержащий основную диспергирующую среду и другие необходимые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков, для получения стерильных инъекируемых растворов предпочтительные способы получения представляют собой методы вакуумной сушки и лиофилизации, которыми получают порошок активного ингредиента и любого желаемого дополнительного ингредиента из их предварительно простерилизованного фильтрованием раствора.

Также предусмотрено получение более концентрированных или высококонцентрированных растворов для прямой инъекции, где предусмотрено использование в качестве растворителя ДМСО для обеспечения экстремально быстрого проникновения, доставки высоких концентраций активных средств в малую область опухоли.

После составления растворы вводят способом, соответствующим дозируемому составу и в таком количестве, которое является терапевтически эффективным. Составы легко водить в ряде лекарственных форм, таких как тип инъекируемых растворов, описанный выше, а также можно использовать высвобождающие лекарственное средство капсулы и т.п.

Например, для парентерального введения в водном растворе раствор, если необходимо, следует соответствующим образом буферизировать и сначала сделать жидкий разбавитель изотоническим достаточным количеством солевого раствора или глюкозы. Эти водные растворы особенно подходят для внутривенного, внутримышечного, подкожного и интраперитонеального введения. В связи с этим, с учетом настоящего описания, стерильные водные среды, которые можно использовать, известны специалистам в данной области. Например, одну дозировку можно разводить в 1 мл изотонического раствора NaCl и доводить до 1000 мл жидкостью для подкожного введения или инъекировать в участок, предназначенный для инфузии (см. например, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, pp. 1035-1038 и 1570-1580). В зависимости от состояния подвергаемого лечению индивидуума обязательно проводят определенные изменения дозировки. В любом случае, соответствующую дозу для индивидуума определяет специалист, отвечающий за введение.

Антитело или иммуноконъюгат по изобретению можно формулировать в терапевтической смеси так, чтобы она содержала приблизительно от 0,01 до 100 мг на дозу или приблизительно столько.

В дополнение к антителу или иммуноконъюгату, формулируемому для парентерального введения, такого как внутривенная или внутримышечная инъекция, другие фармацевтически приемлемые формы включают, например, таблетки или другие твердые формы для перорального введения; капсулы с замедленным высвобождением и любую другую форму, используемую в настоящее время.

В определенных вариантах осуществления для введения полипептидов в клетки-хозяева преду-

смотрено использование липосом и/или наночастиц. Получение и использование липосом и/или наночастиц известно специалистам в данной области.

Как правило, наночастицы могут удерживать соединения стабильным и воспроизводимым способом. Во избежание побочных эффектов вследствие переизбытка внутриклеточных полимеров, такие ультрадисперсные частицы (с размером приблизительно 0,1 мкм), как правило, разрабатывают с использованием полимеров, способных к разрушению *in vivo*. Для применения по настоящему изобретению предусмотрены биоразлагаемые полиалкилцианоакрилатные наночастицы или биоразлагаемые наночастицы из полилактида или из сополимера полилактида и гликолида, удовлетворяющие этим требованиям, и такие частицы могут быть легко получены.

Липосомы получают из фосфолипидов, которые диспергированы в водной среде и спонтанно формируют многослойные концентрические двухслойные везикулы (также называемые многослойными везикулами (MLV)). Как правило, диаметр MLV составляет от 25 нм до 4 мкм. Обработка MLV ультразвуком приводит к формированию малых однослойных везикул (SUV) с диаметром в диапазоне от 200 до 500 Å, содержащие в сердцевине водный раствор. Физические характеристики липосом зависят от pH, ионной силы и присутствия двухвалентных катионов.

Терапевтические способы и применения.

Авторы изобретения продемонстрировали, что пять антител, которые они получили, способны обеспечивать интернализацию комплекса CEACAM5-антитела после связывания. Кроме того, они продемонстрировали, что эти антитела, комбинированные с цитотоксическим майтанзиноидом (DM4), индуцируют цитотоксическую активность в отношении опухолевых клеток MKN45 человека *in vitro*. Также они продемонстрировали, что эти иммуноконъюгаты на мышинной модели полученных у пациентов ксенотрансплантатов первичной опухоли толстого кишечника человека, индуцируют существенную противоопухолевую активность *in vivo* при использовании в дозе 5 мг/кг и 2,5 мг/кг с одной инъекцией на сутки 14 после имплантации опухоли.

Таким образом, полипептиды, антитела, иммуноконъюгаты или фармацевтические композиции по изобретению могут быть полезны для лечения злокачественных опухолей.

Злокачественная опухоль для лечения антителами, иммуноконъюгатами или фармацевтическими композициями по изобретению представляет собой злокачественную опухоль, экспрессирующую CEACAM5, в частности сверхэкспрессирующую CEACAM5 по сравнению с нормальными (т.е. неопухолевыми) клетками того же тканевого происхождения. Экспрессию CEACAM5 злокачественными клетками можно легко оценить, например, с использованием антитела по изобретению, как описано в приведенном ниже разделе "Диагностические применения" и, в частности, иммуногистохимическим способом, например, как описано в примере 8.

В одном из вариантов осуществления злокачественная опухоль может представлять собой колоректальный рак, рак желудка, легких, шейки матки, поджелудочной железы, пищевода, яичника, щитовидной железы, мочевого пузыря, эндометрия, молочной железы, печени (например, холангиокарциному), предстательной железы или кожи. Скрининг панели опухолей человека посредством иммуногистохимии с использованием антитела мыши к CEACAM5 человека по изобретению фактически продемонстрировало окрашивание антителами в этих типах злокачественных опухолей, как более подробно описано в примере 8.

Антитела или иммуноконъюгаты по изобретению можно использовать отдельно или в комбинации с любым подходящим ингибирующим рост средством.

Антитела по изобретению можно конъюгировать или связывать с ингибирующим рост средством, цитотоксическим средством или с активирующим пролекарственное средство ферментом, как описано выше. Фактически, антитела по изобретению могут быть пригодны для направления указанных ингибирующего рост средства, цитотоксического средства или пролекарственного средства в злокачественные клетки, экспрессирующие или сверхэкспрессирующие на своих поверхностях CEACAM5.

Также хорошо известно, что терапевтические моноклональные антитела могут приводить к истощению клеток, несущих антиген, специфически распознаваемый антителом. Это истощение может опосредовать по меньшей мере три механизма: опосредуемая антителами клеточная цитотоксичность (ADCC), зависимый от комплемента лизис и прямое противоопухолевое ингибирование роста опухоли вследствие сигналов, подаваемых антигеном, к которому направлено антитело.

"Обусловленная комплементом цитотоксичность", или "CDC", относится к лизису клетки-мишени в присутствии комплемента. При связывании первого компонента системы комплемента с антителами, которые связаны с узнаваемым ими антигеном, происходит инициация активации классического пути комплемента. Для оценки активации комплемента можно проводить анализ CDC, например, как описано в Gazzano-Santoro et al. (1997).

"Антителозависимая клеточная цитотоксичность", или "ADCC", относится к форме цитотоксичности, при которой секретируемые антитела связываются с рецепторами Fc (FcR), представленными на определенных цитотоксических клетках (например, на клетках природных киллеров (NK), нейтрофилах и макрофагах), обеспечивая специфическое связывание этих цитотоксических эффекторных

клеток с несущими антиген клетками-мишенями, и затем уничтожение клеток-мишеней. Для оценки активности ADCC представляющей интерес молекулы можно проводить анализ ADCC *in vitro*, такой как анализ, описанный в патентах США 5500362 или 5821337.

Таким образом, объектом изобретения является способ лечения злокачественной опухоли, включающий введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества полипептида, антитела, иммуноконъюгата или фармацевтической композиции по изобретению.

В контексте изобретения, как используют в настоящем описании, термин "лечение" означает обращение, уменьшение, ингибирование прогресса или предотвращение нарушения или патологического состояния, в отношении которого применяют такой термин, или одного или нескольких симптомов такого нарушения или состояния. Как используют в настоящем описании, под термином "лечение злокачественной опухоли" подразумевают ингибирование роста злокачественных клеток опухоли и/или прогрессирования метастазов указанной опухоли. Также такое лечение может приводить к обращению роста опухоли, т.е. уменьшению размера измеряемой опухоли. В частности, такое лечение приводит к полному регрессу опухоли или метастазов.

В контексте изобретения термин "пациент" или "нуждающийся в этом пациент" предназначен для обозначения человека или не являющегося человеком млекопитающего, пораженного или вероятно пораженного злокачественной опухолью. В частности, указанный пациент может представлять собой пациента, которого определили, как восприимчивого к терапевтическому средству, нацеленному на SEACAM5, в частности к антителу или иммуноконъюгату по изобретению, например, способом, как описано ниже в настоящем описании.

Под "терапевтически эффективным количеством" полипептида по изобретению подразумевают достаточное количество полипептида для лечения указанного злокачественного заболевания, с приемлемым соотношением польза/риск, пригодным для любого медицинского лечения. Однако следует понимать, что общее суточное использование полипептидов и композиций по настоящему изобретению находится на усмотрении лечащего врача в объеме озвученного врачебного решения. Конкретный уровень терапевтически эффективной дозы для любого конкретного пациента зависит от ряда факторов, включая нарушение, подлежащее лечению, и тяжесть этого нарушения; активность конкретного применяемого полипептида; конкретную применяемую композицию, возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и диету пациента; время введения, путь введения и скорость выведения конкретного применяемого полипептида; длительность лечения; используемые в комбинации или одновременно с конкретным применяемым полипептидом лекарственные средства и подобные факторы, хорошо известные в области медицины. Например, специалистам в данной области хорошо известно о начале дозирования соединений на уровнях, меньших, чем уровни, необходимые для достижения желаемого терапевтического эффекта, и постепенном увеличении дозы до достижения желаемого эффекта.

Другим объектом изобретения являются полипептид, антитело, иммуноконъюгат или фармацевтическая композиция по изобретению для применения при лечении злокачественной опухоли.

Полипептид, антитело, иммуноконъюгат или фармацевтическую композицию можно использовать для ингибирования прогрессирования метастазов злокачественной опухоли.

Полипептиды по изобретению можно использовать в комбинации с любой другой терапевтической стратегией для лечения злокачественных опухолей (например, вспомогательная терапия) и/или для замедления роста метастатической опухоли.

Эффективность лечения антителом или иммуноконъюгатом по изобретению можно легко оценивать *in vivo*, например, на мышинной модели злокачественной опухоли, и измеряя, например, изменения объемов опухолей у подвергаемых обработке и контрольных групп, % регресса опухоли, частный регресс и/или полный регресс, как определено в примере 5.3.

Диагностические применения.

Опубликовано, что SEACAM5 высоко экспрессирован на поверхности клеток колоректальных опухолей, клеток опухолей желудка, легких, матки и слабо экспрессирован у небольшого количества нормальных эпителиальных клеток, таких как эпителиальные клетки толстого кишечника и пищевода. Кроме того, скрининг панели опухолей человека посредством иммуногистохимии с использованием антитела мыши к SEACAM5 человека по изобретению продемонстрировало окрашивание антителами колоректального рака, рака желудка, легких, шейки матки, поджелудочной железы, пищевода, яичника, щитовидной железы, мочевого пузыря, эндометрия, молочной железы, печени (в частности холангиокарцинома), предстательной железы и кожи.

Таким образом, SEACAM5 представляет собой маркер злокачественных опухолей и, таким образом, обладает потенциалом к использованию для указания эффективности противораковой терапии или детекции рецидива заболевания.

В одном из вариантов осуществления антитело по изобретению используют в качестве компонента анализа в рамках терапии, направленной на экспрессирующие SEACAM5 опухоли, для определения восприимчивости пациента к терапевтическому средству, контроля эффективности противораковой терапии или детекции рецидива заболевания после лечения. В частности, одно и то же антитело

по изобретению используют как в виде компонента терапевтического средства, так и в виде компонента диагностического анализа.

Таким образом, дополнительным объектом изобретения является антитело по изобретению для применения при детекции экспрессии SEACAM5 у индивидуума, или для применения при детекции экспрессии SEACAM5 *ex vivo* в биологическом образце, полученном у индивидуума. В частности, указанная детекция может быть предназначена для:

- a) диагностики наличия у индивидуума злокачественной опухоли, или
- b) определения восприимчивости пациента со злокачественной опухолью к терапевтическому средству, нацеленному на SEACAM5, в частности иммуноконъюгату по изобретению, или
- c) контроля эффективности терапии злокачественной опухоли, несущей SEACAM5, или детекции рецидива злокачественной опухоли после терапии злокачественной опухоли, несущей SEACAM5, в частности для терапии иммуноконъюгатом по изобретению; посредством детекции экспрессии поверхностного белка SEACAM5 на опухолевых клетках.

В одном из вариантов осуществления антитело предназначено для применения *in vitro* или *ex vivo*. Например, SEACAM5 можно детектировать с использованием антитела по изобретению *in vitro* или *ex vivo* в биологическом образце, полученном у индивидуума. Применение по изобретению также может представлять собой применение *in vivo*. Например, антитело по изобретению вводят индивидууму и детектируют и/или количественно определяют комплексы антитело-клетки, при этом детекция указанных комплексов является показателем злокачественной опухоли.

Кроме того изобретение относится к способу детекции присутствия злокачественной опухоли у индивидуума *in vitro* или *ex vivo*, включающему стадии:

- (a) приведения биологического образца, полученного у индивидуума, в контакт с антителом по изобретению, в частности в условиях, подходящих для формирования комплексов антитела с указанным биологическим образцом;
- (b) измерения уровня антител, связанных с указанным биологическим образцом;
- (c) детекции присутствия злокачественной опухоли посредством сравнения измеренного уровня связанного антитела с контролем, где повышенный уровень связанного антитела по сравнению с контролем свидетельствует о злокачественной опухоли.

Изобретение также относится к способу определения восприимчивости пациента со злокачественной опухолью к терапевтическому средству, нацеленному на SEACAM5, в частности к иммуноконъюгату по изобретению, *in vitro* или *ex vivo*, где способ включает стадии:

- (a) приведения биологического образца, полученного у пациента со злокачественной опухолью, в контакт с антителом по изобретению, в частности в условиях, подходящих для формирования комплексов антитела с указанным биологическим образцом;
- (b) измерения уровня антитела, связанного с указанным биологическим образцом;
- (c) сравнения измеренного уровня антитела, связанного с указанным биологическим образцом, с уровнем антитела, связанным с контролем;

где повышенный уровень антитела, связанного с указанным биологическим образцом, по сравнению с контролем является показателем восприимчивости пациента к терапевтическому средству, нацеленному на SEACAM5.

В указанных выше способах указанный контроль может представлять собой нормальный, незлокачественный биологический образец того же типа или контрольное значение определяют как характерный уровень связанного антитела в нормальном биологическом образце того же типа.

В одном из вариантов осуществления антитела по изобретению пригодны для диагностики злокачественной опухоли, экспрессирующей SEACAM5, такой как колоректальный рак, рак желудка, легких, шейки матки, поджелудочной железы, пищевода, яичника, щитовидной железы, мочевого пузыря, эндометрия, молочной железы, печени (в частности, холангиокарцинома), предстательной железы или кожи.

Кроме того изобретение относится к способу контроля эффективности терапии злокачественной опухоли, несущей SEACAM5, *in vitro* или *ex vivo*, включающему стадии:

- (a) приведения биологического образца индивидуума, проходящего терапию злокачественной опухоли, несущей SEACAM5, в контакт с антителом по изобретению, в частности в условиях, подходящих для формирования комплексов антитела с указанным биологическим образцом;
- (b) измерения уровня антитела, связанного с указанным биологическим образцом;
- (c) сравнения измеренного уровня связанного антитела с уровнем антитела, связанного с контролем;

где сниженный уровень антитела, связанного с указанным биологическим образцом, по сравнению с контролем является показателем эффективности указанной терапии злокачественной опухоли, несущей SEACAM5.

В указанном способе повышенный уровень антитела, связанного с указанным биологическим образцом, по сравнению с контролем является показателем неэффективности указанной терапии злокачественной опухоли, несущей SEACAM5.

В одном из вариантов осуществления указанный контроль представляет собой биологический образец того же типа что и биологический образец, подвергаемый анализу, но который получали у индивидуума ранее, в ходе терапии злокачественной опухоли, несущей SEACAM5.

Кроме того изобретение относится к способу детекции рецидива злокачественной опухоли после терапии злокачественной опухоли, несущей SEACAM5, *in vitro* или *ex vivo*, включающему стадии:

(a) приведения биологического образца, полученного у индивидуума, прошедшего терапию злокачественной опухоли, несущей SEACAM5, в контакт с антителом по изобретению, в частности в условиях, подходящих для формирования комплексов антитела с указанным биологическим образцом;

(b) измерения уровня антитела, связанного с указанным биологическим образцом;

(c) сравнения измеренного уровня связанного антитела с уровнем антитела, связанного с контролем;

где повышенный уровень антитела, связанного с указанным биологическим образцом, по сравнению с контролем является показателем рецидива злокачественной опухоли после терапии злокачественной опухоли, несущей SEACAM5.

В частности, указанный контроль представляет собой биологический образец того же типа, что и биологический образец, подвергаемый анализу, но который получали у индивидуума ранее, при прохождении или после завершения терапии злокачественной опухоли, несущей SEACAM5.

В частности, указанная терапия злокачественной опухоли, несущей SEACAM5, представляет собой терапию с использованием антитела или иммуноконъюгата по изобретению. Указанная терапия злокачественной опухоли, несущей SEACAM5, направлена на злокачественную опухоль, экспрессирующую SEACAM5, в частности колоректальный рак, рак желудка, легких, шейки матки, поджелудочной железы, пищевода, яичника, щитовидной железы, мочевого пузыря, эндометрия, молочной железы, печени (в частности, холангиокарциному), предстательной железы или кожи.

В одном из вариантов осуществления антитела по изобретению можно метить детектируемой молекулой или веществом, такой как флуоресцентная молекула, радиоактивная молекула или любая другая из меток, известных тем, что они обеспечивают (непосредственно или опосредованно) сигнал.

Как используют в настоящем описании, термин "меченый", в отношении антитела по изобретению, предназначен для включения антител, меченных непосредственно с помощью связывания (т.е. физического связывания) детектируемого вещества, такого как радиоактивное средство или флуорофор (например, флуоресцеинизотиоцианат (FITC) или фикоэритрин (PE) или индоцианин (Cy5)) с полипептидом, а также опосредованного мечения полипептида путем взаимодействия с детектируемым веществом.

Антитело по изобретению можно метить радиоактивной молекулой любым известным в данной области способом. Например, радиоактивные молекулы содержат, но, не ограничиваясь ими, радиоактивные атомы для скинтиграфических исследований, такие как I^{123} , I^{124} , In^{111} , Re^{186} , Re^{188} , Tc^{99} . Также полипептиды по изобретению можно метить спиновой меткой для томографии посредством ядерного магнитного резонанса (ЯМР) (также известной как магнитно-резонансная томография, МРТ), такой как йод-123, индий-111, фтор-19, углерод-13, азот-15, кислород-17, гадолиний, марганец или железо.

"Биологический образец" включает ряд видов образцов, полученных у индивидуума, и их можно использовать в диагностическом или контролирующем анализе. Биологические образцы включают, но, не ограничиваясь ими, кровь и другие жидкие образцы биологического происхождения, твердые образцы тканей, такие как образец биопсии или тканевые культуры, или клетки, получаемые из него и их потомства. Таким образом, биологические образцы включают клинические образцы, клетки в культуре, супернатанты клеток, лизаты клеток, сыворотку, плазму, биологическую жидкость и образцы тканей, в частности образцы опухолей.

В одном из вариантов осуществления биологический образец может представлять собой образец ткани, фиксированный в формалине и погруженный в парафин (FFPE). Фактически, антитела по изобретению преимущественно можно использовать для FFPE тканей, который является форматом, используемым в большинстве больниц для сбора и архивирования образцов тканей.

Изобретение также относится к способу детекции присутствия злокачественной опухоли у индивидуума *in vivo*, включающему стадии:

a) введения пациенту антитела по изобретению, меченого детектируемой меткой;

b) детекции локализации указанного меченого детектируемой меткой антитела у пациента посредством томографии.

Антитела по изобретению могут быть пригодны для определения стадии злокачественной опухоли (например, радиотомографии). Их можно использовать отдельно или в комбинации с другими маркерами злокачественных опухолей.

Как используют в настоящем описании, термины "детекция" или "детектируемый" включают качественную и/или количественную детекцию (измерение уровней) со сравнением или без сравнения с контролем.

В контексте изобретения, как используют в настоящем описании, термин "диагностика" означает определение характера медицинского состояния, направленное на идентификацию патологии, поражающей индивидуума, на основании объема собранных данных.

В указанном способе злокачественная опухоль представляет собой злокачественную опухоль, экспрессирующую CEACAM5, в частности колоректальный рак, рак желудка, легких, шейки матки, поджелудочной железы, пищевода, яичника, щитовидной железы, мочевого пузыря, эндометрия, молочной железы, печени (в частности, холангиокарциному), предстательной железы или кожи.

Наборы.

Наконец, изобретение также относится к наборам, содержащим по меньшей мере одно антитело или один иммуноконъюгат по изобретению. Наборы, содержащие антитела по изобретению, находят применение в детекции поверхностного белка CEACAM5 или в терапевтических или диагностических анализах. Наборы по изобретению могут содержать полипептид или антитело, связанные с твердой подложкой, например, планшетом для культивирования тканей или гранулами (например, сферическими гранулами). Можно предоставлять наборы, содержащие антитела для детекции и количественного определения поверхностного белка CEACAM5 in vitro, например, в ELISA или вестерн-блоттинге. Такое антитело, пригодное для детекции, можно предоставлять с меткой, такой как флуоресцентная или радиоактивная метка.

Краткое описание последовательностей

SEQ ID NO: 1-4 и 6 демонстрируют последовательности CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H, CDR1-L и CDR3-L из так называемого антитела "MAb1".

SEQ ID NO: 5 демонстрирует вариант последовательности VH, VH1a, гуманизированного антитела MAb2.

SEQ ID NO: 7-10 и 12 демонстрируют последовательности CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H, CDR1-L и CDR3-L из так называемого антитела "MAb2".

SEQ ID NO: 11 демонстрирует последовательность CEACAM1 человека, как доступно в GenBank NP_001703.2.

SEQ ID NO: 13-16 и 18 демонстрируют последовательности CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H, CDR1-L и CDR3-L из так называемого антитела "MAb3".

SEQ ID NO: 17 демонстрирует вариант последовательности VL, VL1, гуманизированного антитела MAb2.

SEQ ID NO: 19-22 и 24 демонстрируют последовательности CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H, CDR1-L и CDR3-L из так называемого антитела "MAb4".

SEQ ID NO: 23 демонстрирует вариант последовательности VL, VL1a, гуманизированного антитела MAb2.

SEQ ID NO: 25-28 и 30 демонстрируют последовательности CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H, CDR1-L и CDR3-L из так называемого антитела "MAb5".

SEQ ID NO: 29 демонстрирует вариант последовательности VL, VL1c, гуманизированного антитела MAb2.

SEQ ID NO: 31 демонстрирует последовательность VH антитела "MAb1".

SEQ ID NO: 32 демонстрирует последовательность VL антитела "MAb1".

SEQ ID NO: 33 демонстрирует последовательность VH антитела "MAb2".

SEQ ID NO: 34 демонстрирует последовательность VL антитела "MAb2".

SEQ ID NO: 35 демонстрирует последовательность VH антитела "MAb3".

SEQ ID NO: 36 демонстрирует последовательность VL антитела "MAb3".

SEQ ID NO: 37 демонстрирует последовательность VH антитела "MAb4".

SEQ ID NO: 38 демонстрирует последовательность VL антитела "MAb4".

SEQ ID NO: 39 демонстрирует последовательность VH антитела "MAb5".

SEQ ID NO: 40 демонстрирует последовательность VL антитела "MAb5".

SEQ ID NO: 41 демонстрирует последовательность тяжелой цепи антитела chMAb1.

SEQ ID NO: 42 демонстрирует последовательность легкой цепи антитела chMAb1.

SEQ ID NO: 43 демонстрирует последовательность тяжелой цепи антитела chMAb2.

SEQ ID NO: 44 демонстрирует последовательность легкой цепи антитела chMAb2.

SEQ ID NO: 45 демонстрирует последовательность тяжелой цепи антитела chMAb3.

SEQ ID NO: 46 демонстрирует последовательность легкой цепи антитела chMAb3.

SEQ ID NO: 47 демонстрирует последовательность тяжелой цепи антитела chMAb4.

SEQ ID NO: 48 демонстрирует последовательность легкой цепи антитела chMAb4.

SEQ ID NO: 49 демонстрирует последовательность тяжелой цепи антитела chMAb5.

SEQ ID NO: 50 демонстрирует последовательность легкой цепи антитела chMAb5.

SEQ ID NO: 51 демонстрирует вариант последовательности VH, VH1, гуманизированного антитела MAb2.

SEQ ID NO: 52 демонстрирует последовательность полноразмерного CEACAM5 человека, как доступно в базе данных GenBank под номером доступа AAA51967.1.

SEQ ID NO: 53 демонстрирует последовательность внеклеточного домена CEACAM5 *Mascas fascicularis*.

SEQ ID NO: 54 демонстрирует последовательность легкой цепи химерного антитела (полученного из антитела "MAb2"), содержащего мутацию с K52 в R52.

SEQ ID NO: 55 демонстрирует вариант последовательности VL, VL1d, гуманизированного антитела MAb2.

SEQ ID NO: 56 демонстрирует последовательность внеклеточного домена hCEACAM1 (положения 35-428 полноразмерного hCEACAM1 (NP_001703.2) с последующим дополнительным участком из 24 аминокислот, содержащим His-метку).

SEQ ID NO: 57 демонстрирует последовательность внеклеточного домена cCEACAM1 с последующим дополнительным участком из 24 аминокислот, содержащим His-метку.

SEQ ID NO: 58 демонстрирует последовательность внеклеточного домена hCEACAM5 (положения 35-685 полноразмерного hCEACAM5 (AAA51967.1) с последующим дополнительным участком из 24 аминокислот, содержащим His-метку).

SEQ ID NO: 59 демонстрирует последовательность внеклеточного домена cCEACAM5 с последующим дополнительным участком из 24 аминокислот, содержащим His-метку.

SEQ ID NO: 60 демонстрирует последовательность внеклеточного домена hCEACAM6 (положения 35-327 полноразмерного hCEACAM6 (NP_002474.3) с последующим дополнительным участком из 24 аминокислот, содержащим His-метку).

SEQ ID NO: 61 демонстрирует последовательность внеклеточного домена cCEACAM6 с последующим дополнительным участком из 24 аминокислот, содержащим His-метку.

SEQ ID NO: 62 демонстрирует последовательность внеклеточного домена hCEACAM8 (положения 35-332 полноразмерного hCEACAM8 (NP_001807.2) с последующим дополнительным участком из 24 аминокислот, содержащим His-метку).

SEQ ID NO: 63 демонстрирует последовательность внеклеточного домена cCEACAM8 с последующим дополнительным участком из 24 аминокислот, содержащим His-метку.

SEQ ID NO: 64 демонстрирует последовательность внеклеточного домена hCEACAM7 (положения 36-248 полноразмерного hCEACAM7 (NP_008821.1) с последующим дополнительным участком из 24 аминокислот, содержащим His-метку).

SEQ ID NO: 65 демонстрирует последовательность N-A1-B1 hCEACAM5 (положения 35-320 полноразмерного hCEACAM5 (AAA51967.1.)) с последующей His-меткой из 6 аминокислот.

SEQ ID NO: 66 демонстрирует последовательность A2-B2 hCEACAM5 (положения 321-4 98 полноразмерного hCEACAM5 (AAA51967.1.)) с последующей His-меткой из 6 аминокислот.

SEQ ID NO: 67 демонстрирует последовательность A3-B3 hCEACAM5 (положения 4 99-68 5 полноразмерного hCEACAM5 (AAA51967.1.)) с последующей His-меткой из 6 аминокислот.

SEQ ID NO: 68 демонстрирует последовательность N-A1-B1 cCEACAM5 с последующим дополнительным участком из 24 аминокислот, содержащим His-метку.

SEQ ID NO: 69 демонстрирует последовательность A2-B2 cCEACAM5 с последующим дополнительным участком из 24 аминокислот, содержащим His-метку.

SEQ ID NO: 70 демонстрирует последовательность A3-B3 cCEACAM5 с последующим дополнительным участком из 24 аминокислот, содержащим His-метку.

SEQ ID NO: 71 демонстрирует последовательность полноразмерного белка CEACAM6 человека, как доступно в GenBank NP_002474.3.

SEQ ID NO: 72 демонстрирует последовательность полноразмерного белка CEACAM7 человека, как доступно в GenBank NP_008821.1.

SEQ ID NO: 73 демонстрирует последовательность полноразмерного белка CEACAM8 человека as available in GenBank NP_001807.2.

SEQ ID NO: 74 демонстрирует последовательность VH варианта гуманизированного MAb2_VLg5VHg2.

SEQ ID NO: 75 демонстрирует последовательность VL варианта гуманизированного MAb2_VLg5VHg2.

SEQ ID NO: 76 демонстрирует последовательность аминокислот в положениях 109-115 A3-B3 CEACAM5 человека.

SEQ ID NO: 77 демонстрирует последовательность аминокислот в положениях 131-143 A3-B3 CEACAM5 человека.

SEQ ID NO: 78 демонстрирует консенсусную последовательность CDR1-H семейства антител MAb2/MAb4/MAb5 на основе сравнений последовательностей.

SEQ ID NO: 79 демонстрирует консенсусную последовательность CDR2-H семейства антител MAb2/MAb4/MAb5 на основе сравнений последовательностей.

SEQ ID NO: 80 демонстрирует консенсусную последовательность CDR3-H семейства антител MAb2/MAb4/MAb5 на основе сравнений последовательностей.

SEQ ID NO: 81 демонстрирует консенсусную последовательность CDR1-H семейства антител

MAb1/MAb3.

SEQ ID NO: 82 демонстрирует консенсусную последовательность CDR2-H семейства антител MAb1/MAb3.

SEQ ID NO: 83 демонстрирует консенсусную последовательность CDR1-H семейства антител MAb2/MAb4/MAb5 на основе остатков, идентифицированных как нейтральные при связывании внеклеточных доменов CEACAM5 человека и *Mascaca fascicularis*.

SEQ ID NO: 84 демонстрирует консенсусную последовательность CDR3-H семейства антител MAb2/MAb4/MAb5 на основе остатков, идентифицированных как нейтральные при связывании внеклеточных доменов CEACAM5 человека и *Mascaca fascicularis*.

SEQ ID NO: 85 демонстрирует консенсусную последовательность CDR1-L семейства антител MAb2/MAb4/MAb5 на основе остатков, идентифицированных как нейтральные при связывании внеклеточных доменов CEACAM5 человека и *Mascaca fascicularis*.

SEQ ID NO: 86 демонстрирует консенсусную последовательность CDR3-L семейства антител MAb2/MAb4/MAb5 на основе остатков, идентифицированных как нейтральные при связывании внеклеточных доменов CEACAM5 человека и *Mascaca fascicularis*.

SEQ ID NO: 87 демонстрирует последовательность тяжелой цепи huMAb2-3 (MAb2_VL1cVH1a-IgG1).

SEQ ID NO: 88 демонстрирует последовательность легкой цепи huMAb2-3 (MAb2_VL1cVH1a-IgG1).

SEQ ID NO: 89 демонстрирует последовательность тяжелой цепи huMAb2-4 (MAb2_VL1d VH1-IgG1).

SEQ ID NO: 90 демонстрирует последовательность легкой цепи huMAb2-4 (MAb2_VL1d VH1-IgG1).

Описание чертежей

Фиг. 1 - оценка селективности антител к CEACAM5.

Фиг. 2 - картирование доменов антител к CEACAM5 на CEACAM5 человека.

Фиг. 3 - картирование доменов антител к CEACAM5 на CEACAM5 яванского макака.

Фиг. 4 - оценка противоопухолевой активности конъюгатов chMAb4-SPDB-DM4, chMAb1-SPDB-DM4, chMAb5-SPDB-DM4 и chMAb2-SPDB-DM4 против первичной аденокарциномы толстой кишки человека CR-IGR-034P у самок мышей SCID.

Фиг. 5 - оценка противоопухолевой активности конъюгатов huMAb2-3-SPDB-DM4, huMAb2-4-SPDB-DM4 и chMAb2-SPDB-DM4 против первичной аденокарциномы толстой кишки человека CR-IGR-034P у самок мышей SCID.

Фиг. 6 - оценка противоопухолевой активности конъюгата huMAb2-3-SPDB-DM4 против первичной аденокарциномы желудка человека STO-IND-006 у самок мышей SCID.

Фиг. 7 - Выравнивания последовательностей областей VH и VL антител MAb1, MAb2, MAb3, MAb4 и MAb5.

Фиг. 8 - анализ HRMS конъюгата chMAb1-SPDB-DM4.

Фиг. 9 - анализ HRMS конъюгата chMAb2-SPDB-DM4.

Фиг. 10 - анализ HRMS конъюгата chMAb4-SPDB-DM4.

Фиг. 11 - анализ HRMS конъюгата chMAb5-SPDB-DM4.

Фиг. 12 - анализ HRMS конъюгата huMAb2-2-SPDB-DM4.

Фиг. 13 - анализ HRMS конъюгата huMAb2-1-SPDB-DM4.

Фиг. 14 - анализ HRMS конъюгата huMAb2-3-SPDB-DM4.

Фиг. 15 - анализ HRMS конъюгата huMAb2-4-SPDB-DM4.

Фиг. 16 - активность связывания гуманизированных вариантов MAb2 с внеклеточным доменом CEACAM5 человека и обезьяны.

Фиг. 17 - стабильность связывания гуманизированных вариантов MAb2 с внеклеточным доменом CEACAM5 человека и обезьяны.

Фиг. 18 - оценка противоопухолевой активности конъюгата huMAb2-3-SPDB-DM4 против первичной аденокарциномы легких человека LUN-NIC-0014 у самок мышей SCID.

Фиг. 19 - оценка противоопухолевой активности конъюгатов huMAb2-3-SPDB-DM4 и huMAb2-3-сульфо-SPDB-DM4 против первичной аденокарциномы толстой кишки человека CR-IGR-034P у самок голых мышей CD1.

Фиг. 20 - анализ HRMS huMAb2-3-сульфо-SPDB-DM4.

Фиг. 21 - анализ HRMS huMAb2-3-SMCC-DM1.

Фиг. 22 - выравнивание переменных доменов тяжелой цепи MAb2, MAb4, MAb5, гуманизированного VH1a, гуманизированного VH1 и гуманизированного VHg2.

Фиг. 23 - выравнивание переменных доменов легкой цепи MAb2, MAb4, MAb5, гуманизированного VL1, гуманизированного VL1a, гуманизированного VL1c, гуманизированного VL1d и гуманизированного VLg5.

Примеры

Настоящее изобретение далее проиллюстрировано приводимыми ниже примерами, которые не следует истолковывать как дополнительное ограничение.

Содержание списка последовательностей, чертежей и всех ссылок, патентов и опубликованных патентных заявок, цитируемых на всем протяжении настоящего описания, в явной форме полностью включено в данное описание посредством ссылки.

Пример 1. Получение рекомбинантных внеклеточных доменов белков CEACAM.

В этом примере посредством транзиторной экспрессии в клетках эмбриональной почки человек НЕК293 с использованием плазмид, обеспечивающих экспрессию соответствующих кДНК, как приведено в табл. 1, получали внеклеточные домены белка (ECD), полученные из CEACAM человека (h) или яванского макака (c).

Каждую экспрессирующую плазмиду помещали в комплекс с 293fectin™ (Life Technologies) и добавляли в культивируемые в суспензии клетки 293-F (полученные из клеток НЕК293). Через восемь суток после трансфекции супернатанты культур собирали, и соответствующий растворимый белок очищали посредством ИМАС (GE Healthcare) с получением партии белка (см. табл. 1).

Таблица 1

Описание рекомбинантных внеклеточных доменов белков CEACAM

Название белка	Описание белка	Исходная последовательность кДНК	Идентификатор последовательности
hCEACAM1	ECD CEACAM1 человека (35-428)	NP_001703.2	SEQ ID NO:56
cCEACAM1	ECD CEACAM1 <i>M.fascicularis</i> (35-428)	клонированный для внутренних целей	SEQ ID NO:57
hCEACAM5	ECD CEACAM5 человека (35-685)	AAA51967.1	SEQ ID NO:58
cCEACAM5	ECD CEACAM5 <i>M.fascicularis</i> (35-688)	клонированный для внутренних целей	SEQ ID NO:59
hCEACAM6	ECD CEACAM6 человека (35-327)	NP_002474.3	SEQ ID NO:60
cCEACAM6	ECD CEACAM6 <i>M.fascicularis</i> (35-327)	клонированный для внутренних целей	SEQ ID NO:61
hCEACAM8	ECD CEACAM8 человека (35-332)	NP_001807.2	SEQ ID NO:62
cCEACAM8	ECD CEACAM8 <i>M.fascicularis</i> (35-332)	клонированный для внутренних целей	SEQ ID NO:63
hCEACAM7	ECD CEACAM7 человека (36-248)	NP_008821.1	SEQ ID NO:64
hCEACAM5 NA1B1	Домен N-A1-B1 CEACAM5 человека (35-320)	AAA51967.1	SEQ ID NO:65
hCEACAM5 A2B2	Домен A2-B2 CEACAM5 человека (321-498)	AAA51967.1	SEQ ID NO:66
hCEACAM5 A3B3	Домен A3-B3 CEACAM5 человека (499-685)	AAA51967.1	SEQ ID NO:67
cCEACAM5 NA1B1	Домен N-A1-B1 CEACAM5 <i>M.fascicularis</i> (35-320)	клонированный для внутренних целей	SEQ ID NO:68
cCEACAM5 A2B2	Домен A2-B2 CEACAM5 <i>M.fascicularis</i> (321-498)	клонированный для внутренних целей	SEQ ID NO:69
cCEACAM5 A3B3	Домен A3-B3 CEACAM5 <i>M.fascicularis</i> (499-688)	клонированный для внутренних целей	SEQ ID NO:70

Пример 2. Получение моноклональных антител мыши к CEACAM5.

В этом примере получали моноклональные антитела после иммунизации мышей по протоколу, приводящему к получению mAb к CEACAM5.

Пример 2.1. Иммунизация и получение гибридом.

Иммунизацию, слияние и скрининг проводили с использованием миеломных клеток P3X63-Ag8.653 с внеклеточным доменом CEACAM5 человека, внеклеточным доменом CEACAM5 яванского макака или с опухолевыми клетками UMC11 человека, как описано в Wennerberg A.E. et al., 1993. Am. J. Pathol., 143(4), 1050-1054 и Kilpatrick et al. 1997. Hybridoma 16: 381389.

С использованием способа RIMMS, как описано в Kilpatrick et al. (1997. Hybridoma 16: 381389), у каждой самки мышей BALB/c в возрасте 6-8 недель (S082342; Charles. River. Labs., Bar Harbor, М.Е.) проводили четыре цикла иммунизации в течение 14 суток с интервалами 3-4 суток. Антигены, эмульгированные в адьюванте Titermax (TierMax Gold Adjuvant; Sigma #T2684) подкожно вводили в шесть участков, проксимально дренирующих лимфоузлов, вдоль спины мыши и в шесть расположенных рядом участков вдоль брюшка. Через четверо суток после последней инъекции мышей умерщв-

ляли. Асептически выделяли двусторонние подколенные, поверхностные паховые, подмышечные и бронхиальные лимфоузлы и промывали свежей средой RPMI.

С использованием классического способа, как описано в Wennerberg A.E. et al. (1993. Am. J. Pathol., 143(4), 1050-1054), каждой самке мышей BALB/c в возрасте 6-8 недель (S082342; Charles. River. Labs., Bar Harbor, M.E.) проводили три цикла иммунизации в течение 41 суток. Антигены вводили интраперитонеально в брюшной участок мышцы. Через трое суток после последней инъекции мышей умерщвляли и асептически выделяли селезенку и промывали свежей средой RPMI.

Из лимфоузлов или из селезенки выделяли лимфоциты и суспензию одиночных клеток дважды отмывали средой RPMI с последующим сливанием с миеломными клетками P3X63-AG8.653 с использованием полиэтиленгликоля. После сливания, смесь клеток инкубировали в инкубаторе при 37°C в течение 16-24 ч. Полученный препарат клеток переносили в селективную полутвердую среду и асептически вносили в 100 мм чашки Петри и инкубировали при 37°C. Через десять суток после начала отбора, чашки проверяли на рост гибридом и видимые колонии накапывали и помещали в 96-луночные планшеты, содержащие по 200 мкл среды для выращивания. 96-луночные планшеты выдерживали в инкубаторе при 37°C в течение 2-4 суток.

Пример 2.2. Скрининг и характеристика *in vitro* антител мьшей к SEACAM5.

Первичный скрининг на продукцию IgG к SEACAM5 проводили посредством твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) с использованием в качестве захватывающего антигена белка SEACAM5 человека (полученного, как описано в примере 1) и посредством FACS с использованием нескольких линий опухолевых клеток человека (H460, MKN45, SW1463, SKMEL28 и UMC11). Для анализа ELISA планшеты покрывали белком SEACAM5 человека при 0,25 мкг/лунка в PBS и в планшет добавляли 100 мкл антител к SEACAM5/лунка. Планшет инкубировали при 37°C в течение 1 ч и пять раз промывали PBS, содержащим 0,05% Tween-20 (PBS-T). Затем в каждую лунку добавляли 100 мкл антител кролика к IgG мыши, конъюгированных с пероксидазой хрена (Sigma; #A9044) в разведении 1:50000. После инкубации при 37°C в течение 1 ч в темноте, планшеты пять раз отмывали PBS-T. Связывание антител визуализировали, добавляя буфер ТМВ-Н₂O₂ и считывая при длине волны 450 нм. Для анализа FACS опухолевые клетки человека при 40000 клеток/лунка вносили в 96-луночный планшет High Bind (MSD L15XB-3) и в течение 45 мин при 4°C добавляли 100 мкл/лунка антител к SEACAM5 и три раз промывали PBS с 1% BSA. В течение 45 мин при 4°C добавляли 100 мкл/лунка антител козы к IgG мыши, конъюгированных с Alexa647 (Invitrogen; # A2135) и три раз промывали PBS с 1% BSA. Связывание антител оценивали после центрифугирования и ресуспендирования клеток, добавляя 200 мкл/лунка PBS с 1% BSA и считывая с использованием системы проточной цитометрии Guava® easyCyte™ 8HT.

Для оценки специфичности к SEACAM5 антител к SEACAM5 96-луночные планшеты покрывали рекомбинантными белками SEACAM1, SEACAM6, SEACAM7 и SEACAM8 человека (полученными, как описано в примере 1) с использованием тех же условий покрытия, как описано выше. В планшеты добавляли антитела к SEACAM5 и детектировали с использованием антител кролика к IgG мыши, конъюгированных с пероксидазой хрена (Sigma; #A9044). Связывание антител визуализировали, добавляя буфер ТМВ-Н₂O₂ и считывая при длине волны 450 нм. Результаты, представленные на фиг. 1, демонстрируют, что антитела к SEACAM5 селективны для SEACAM5 человека по отношению к SEACAM1, SEACAM6, SEACAM7 и SEACAM8 человека.

Пример 2.3. Характеристика связывания mAb.

Кажущуюся аффинность антител к SEACAM5 в отношении hSEACAM5, экспрессированного на поверхности опухолевых клеток MKN45 человека (DSMZ, ACC 409), определяли посредством системы проточной цитометрии Guava® easyCyte™ 8HT. Опухолевыми клетками MKN45 при 40000 клетки/лунка вносили в 96-луночный планшет High Bind (MSD L15XB-3), и в течение 45 мин при 4°C добавляли

100 мкл антител к SEACAM5/лунка в 2-кратных серийных разведениях, начиная с 20 мкг/мл до 12 разведений в разбавителе для анализа и три раза промывали PBS с 1% BSA. В течение 45 мин при 4°C добавляли 100 мкл/лунка антител козы к IgG мыши, конъюгированных с Alexa647 (Invitrogen; # A2135), и три раз промывали PBS с 1% BSA. Связывание антител оценивали после центрифугирования и ресуспендирования клеток, добавляя 200 мкл/лунка PBS с 1% BSA и считывая с использованием системы проточной цитометрии Guava® easyCyte™ 8HT. Значения кажущейся KD и EC₅₀ определяли с использованием программного обеспечения BIOST@T-BINDING и BIOST@T-SPEED, соответственно.

Таблица 2

Значения EC₅₀, полученные для клеток MKN45

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

Картирование доменов антител к SEACAM5 в отношении белков.

СЕАСАМ5 человека и СЕАСАМ5 яванского макака определяли посредством ELISA. 96-луночные планшеты покрывали рекомбинантными доменами A1 (143-237), A1-B1 (143-320), A2-B2 (321-498) и A3-B3 (499-685) белка СЕАСАМ5 человека (полученными, как описано в примере 1) и рекомбинантными доменами N-A1-B1 (1-320), A1-B1 (143-320), A2-B2 (321-498) и A3-B3 (499-688) белка СЕАСАМ5 яванского макака (полученными, как описано в примере 1) с использованием тех же условий покрытия, как описано выше. В планшеты добавляли очищенные антитела и детектировали с использованием антител кролика к IgG мыши, конъюгированных с пероксидазой хрена (Sigma; #A9044). Связывание антител визуализировали, добавляя буфер ТМВ-Н₂O₂ и считывая при длине волны 450 нм. Результаты представлены на фиг. 2 и 3 и демонстрируют, что антитела к СЕАСАМ5 связываются с доменом А3-В3 белков СЕАСАМ5 человека и яванского макака.

Изотипы отдельных mAb определяли с использованием набора изотипирования IgG мыши в соответствии с инструкциями производителя (SEROTEC ссылка ММТ1). Пять специфичных к СЕАСАМ5 mAb представляли собой IgG1, изотипа k.

Пример 3. Характеристика антител мышей к СЕАСАМ5.

Пример 3.1. Характеристика антител мышечей к СЕАСАМ5 in vitro.

Гибридомы мыши, экспрессирующие специфичные к СЕАСАМ5 Ab, получали в колбе T500, и кондиционированные среды собирали через 7 суток роста. Специфичные к СЕАСАМ5 Ab очищали, пропуская кондиционированные среды через колонку с белком G, промывали и элюировали 100 мМ буфером глицин/НСl с рН 2,7 буфер. Элюат подвергали диализу против PBS с последующей стерилизацией фильтрованием и хранили при 4°C.

Все специфичные к СЕАСАМ5 mAb посредством ELISA оценивали на их способность связываться с белками СЕАСАМ5 человека и приматов. Планшеты покрывали белками СЕАСАМ5 человека или приматов, в планшет добавляли mAb к hСЕАСАМ5 и детектировали с использованием антител кролика к IgG мыши, конъюгированных с пероксидазой хрена (Sigma; #A9044). Связывание антител визуализировали, добавляя буфер ТМВ-Н₂O₂ и считывая при длине волны 450 нм.

Таблица 3

Значения EC₅₀, соответствующие связывающей способности специфичных к СЕАСАМ5 mAb в отношении белки СЕАСАМ5 приматов

Антитела	MAb1	MAb2	MAb3	MAb4	MAb5
EC ₅₀ (нМ) hСЕАСАМ5	0,53	0,14	0,36	0,08	0,40
EC ₅₀ (нМ) cСЕАСАМ5	1,18	0,07	3,72	0,05	0,45
Отношение примат/человек	2,2	0,5	10	0,6	1,1

Пример 3.2. Кажущаяся аффинность и связывающая способность антител к СЕАСАМ5 в отношении клеток первичной опухоли толстой кишки человека на поздних стадиях CR-IGR-034P при проточной цитометрии.

Первичную опухоль толстой кишки человека на поздних стадиях CR-IGR-034P (Julien et al., Clin. Cancer. Res. October 1, 2012 18:19 5314-5328) получали из полученного у пациента ксенотранспланта у мышей. Опухоль CR-IGR-034P ферментативно диссоциировали с использованием коллагеназы типа IV (Invitrogen; #17104-019) и дезоксирибонуклеазы I (Invitrogen; #18047-019) в течение 1 ч при 4°C. Жизнеспособность клеток определяли посредством применения Viacount с использованием системы проточной цитометрии Guava® easyCyte™ 8HT. Для расчета кажущейся аффинности опухолевые клетки CR-IGR-034P при 40000 клеток/лунка наносили на 96-луночный планшет High Bind (MSD L15XB-3) и добавляли 100 мкл антител к СЕАСАМ5/лунка в 2-кратных серийных разведениях, начиная с 20 мкг/мл до 12 разведений в разбавителе для анализа в течение 45 мин при 4°C и три раза промывали PBS с 1% BSA. В течение 45 мин при 4°C добавляли 100 мкл/лунка антител козы к IgG мыши, конъюгированных с Alexa647 (Invitrogen; # A2135), или антител козы к IgG человека, конъюгированных с Alexa488 (Invitrogen; # A11013), и три раза промывали PBS с 1% BSA. Связывание антител оценивали после центрифугирования и ресуспендирования клеток, добавляя 200 мкл/лунка PBS с 1% BSA и считывая с использованием системы проточной цитометрии Guava® easyCyte™ 8HT. Значения кажущейся KD и EC₅₀ определяли с использованием программного обеспечения BIOD@T-BINDING и BIOD@T-SPEED, соответственно.

Связывающую способность антител к СЕАСАМ5 определяли с использованием набора калибровочного стандарта для IgG мыши (Biocytex #7208) или набора калибровочного стандарта для IgG человека (Biocytex #CP010) по инструкциям производителя.

Таблица 4

Значения KD и EC₅₀, полученные на клетках первичной опухоли толстой кишки человека на поздних стадиях CR-IGR-034P

Антитела	MAb1	MAb2	MAb3	MAb4	MAb5
Значение KD	1,92 нМ	0,38 нМ	1,01 нМ	0,16 нМ	0,5 нМ
Значение EC ₅₀	1 нМ	0,53 нМ	2,8 нМ	0,2 нМ	1,4 нМ

Пример 3.3. Активность интернализации специфических к CEACAM5 антител мыши.

Для оценки интернализации антител к CEACAM5 MAb1, MAb2, MAb3, MAb4 и MAb5, жизнеспособные клетки MKN45 инкубировали в течение 24 ч при 37°C/5% CO₂ (или 4°C на льду для отрицательного контроля) с 10 мкг/мл предварительно меченных AlexaFluor488 антител к CEACAM5. Затем одну часть лунок промывали средой для культивирования и внеклеточные меченные AF антитела, связанные с клетками гасили посредством инкубации клеток с антителом к AlexaFluor 488 (50 мкг/мл) на льду в течение 30 мин (уровень внутриклеточной флуоресценции). Другую часть лунок инкубировали только со средой для культивирования в тех же условиях (общий уровень флуоресценции).

Затем клетки отделяли и промывали, и собирали в среду для культивирования с последующим анализом проточной цитометрии с использованием анализатора MACSQUANT Vyb. Измеряли ассоциированную с клетками флуоресценцию 1×10^4 клеток, и затем количественно определяли среднюю интенсивность флуоресценции отобранных жизнеспособных клетки. Коэффициент интернализация (%) определяли делением ассоциированной с гашеными клетками флуоресценцию на общую ассоциированную с клетками флуоресценцию, умножая на 100. Данные выражают в виде среднего \pm стандартное отклонение (SD)

Таблица 5

Интернализация антител к CEACAM5 мыши в линии клеток MKN45 через 24 ч

Антитело	Интернализация через 24 часа, 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

Пять специфических к CEACAM5 антител после связывания с CEACAM5, экспрессированном на клеточной поверхностной мембране, претерпевали интернализацию, поддерживая их использование в области иммуноконъюгатов антител для специфического направления цитотоксических средств в злокачественные клетки. Антитела к CEACAM5 MAb1, MAb2, MAb3, MAb4 и MAb5 через 24 ч инкубации продемонстрировали интернализацию в линию злокачественных клеток MKN45 человека на уровне 49,9%, 45%, 51,1%, 42,5%, 51,7%, соответственно.

Пример 3.4. Цитотоксическая активность соответствующих ADC мыши в отношении линии клеток MKN45.

Антитела мыши конъюгировали для определения их цитотоксической активности *in vitro*. В пробирку объемом 15 мл при комнатной температуре (23°C) последовательно добавляли mAb, буфер A/HEPES (4%), DMA (диметилацетамид, 20% об./об.), затем 6 экв. линкера SPDB при перемешивании на магнитной мешалке. После ночи при комнатной температуре добавляли раствор DM4 (майтаниноид, 9,6 экв.) в 15 мМ DMA и 5 ч проводили реакцию. Неочищенную смесь конъюгата очищали на колонках Superdex 200pg 16/60 или G25 26/10 (PBS-Na pH7,4/5% NMP), концентрировали на Amicon 15 @ 5000g и фильтровали на Millex 0,22 мкм.

Затем тестировали действие конъюгатов антител к CEACAM5 с мйтаниноидом на жизнеспособность опухолевых клеток с использованием набора Cell Titer-Glo (Promega). Для проведения этого теста, клетки рака желудка человека MKN45 высевали в 96-луночные планшеты и давали возможность прикрепляться в течение 4 ч в 37°C/атмосфере 5% CO₂. К высаженным клеткам добавляли различные концентрации конъюгатов антител к CEACAM5. Затем клетки инкубировали в течение 96 ч в той же атмосфере. Затем в лунки добавляли реагент Cell Titer-Glo в течение 10 мин при комнатной температуре и измеряли люминесцентный сигнал с использованием планшетного счетчика Envision (Perkin-Elmer).

Таблица 6
Цитотоксическая активность специфичных к SEACAM5
ADC мыши в отношении SEACAM5+ линии клеток MKN45

Конъюгат антитела с лекарственным средством	Цитотоксическая активность 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

Антитела к SEACAM5, конъюгированные с майтанзиноидом (DM4) MAb1-SPDB-DM4, MAb2-SPDB-DM4, MAb3-SPDB-DM4, MAb4-SPDB-DM4 и MAb5-SPDB-DM4, продемонстрировали цитотоксическую активность *in vitro* с IC₅₀ 0,89, 0,14, 0,53, 0,96 и 0,24 нМ, соответственно.

Пример 4. Определение последовательностей тяжелых и легких цепей шАб к SEACAM5.

Последовательности переменных доменов mAb получали из гибридомы и клонировали в экспрессирующий вектор для гарантии того, что клонированные mAb обладают теми же характеристиками, что и исходные mAb мыши.

Полученные аминокислотные последовательности позволяли получать информацию, соответствующую данным, полученным на очищенных mAb, полученных из гибридомы, посредством N-концевого секвенирования и масс-спектрометрии (ЖХ/МС) тяжелых и легких цепей (LC, HC) (см. табл. 7).

Таблица 7
Масс-спектрометрический анализ mAb к SEACAM5 из гибридомы

ID клона	Цепь	Масса (Да)	
		посредством ЖХ/МС из партии	значение <i>in silico</i> полученная последовательность
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 представляет собой антитело, полученное посредством одной из клонированных гибридом, и из которого получали так называемое "MAb2" посредством внесения канонических остатков в каркасные области VL и VH, как описано в примере 5.

Пример 5. Конъюгат антитела с лекарственным средством (ADC) (химерный).

Пример 5.1. Недериватизированное химерное mAb.

Последовательности нуклеиновой кислоты переменных доменов VH, VL клонировали в экс-

прессирующие векторы в слиянии с кодирующими последовательностями IgG1 человека или константного домена Скаппа человека, соответственно, с получением затем партии химерных mAb посредством транзиторной экспрессии в HEK293, как описано в примере 1. Аффинности в отношении CEACAM5 человека и яванского макака у mAb мыши и химерных mAb оставались сходными. В табл. 8 аффинности проиллюстрированы EC₅₀, полученными посредством ELISA с CEACAM5 человека или яванского макака.

Таблица 8

EC₅₀, полученные с CEACAM5 для mAb из гибридомы мыши и соответствующих химерных mAb

EC ₅₀ , полученные для mAb из гибридомы мыши			EC ₅₀ , полученные для химерных mAb		
ID клона	hCEACAM5	cCEACAM5	ID клона	hCEACAM5	cCEACAM5
MAb1	0,53	1,18	chMAb1	0,51	1,57
MAb2i	0,14	0,07	chMAb2 (партия 1)	0,16	0,13
			chMAb2 (партия 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

Последовательности областей CDR выводили на основе последовательности белка с использованием номенклатуры IMGT. Они соответствуют SEQ ID NO: 1-4, 6, 7-10, 12, 13-16, 18, 19-22, 24, 25-28, 30.

Следует отметить, что по сравнению с антителом, полученным посредством клонированной гибридомы (MAb2i), в клон MAb2 в положениях 41G, 42K и 45Q в VL и в положениях 5Q и 7S в VH внесены канонические остатки.

Кроме того, в CDR2 клона MAb2 CEА-4 расположен лизин в положении 52 в VL, который в клоне MAb2_{K52R} замещен аргинином. Получали партию в тех же условиях, как партию, соответствующую клону MAb2, и она приводила к сходной аффинности в отношении внеклеточного домена CEACAM5 человека и яванского макака как представлено в табл. 7. Следует подчеркнуть, что эту точечную мутацию в CDR можно проводить без какого-либо влияния на связывание.

Последовательности LC и HC химерного mAb для клона MAb2 и клона MAb2_{K52R} соответствуют SEQ ID NO: 43, 44, 54.

Конструировали chMAb2, как описано в примере 4. Оно представляет собой химерное mAb, полученное из клона MAb2 с IgG1 человека, изотипа Ск. Последовательности соответствуют SEQ ID NO: 43 и 44. С помощью транзиторной экспрессии в HEK293 получали партию в масштабе 300 мг с последующей очисткой белка посредством аффинной хроматографии, для данных о связывании см. табл. 7. Оно представляет собой недериватизированное mAb, используемое для получения ADC.

Пример 5.2. Получение и характеристика ADC.

В этом примере из недериватизированных химерных mAb получали иммуноконъюгаты. Затем оценивали эффективность *in vivo*.

Расчет DAR.

Конъюгат, как правило, содержит от 1 до 10 молекул майтанзиноида, ковалентно связанного с антителом (так называемое "отношение лекарственного средства к антителу" или "DAR"). Это количество может варьировать в зависимости от характера антитела и используемого майтанзиноида наряду с экспериментальными условиями, используемыми для конъюгации (таким как отношение майтанзиноид/антитело, время реакции, характер растворителя и соразтворителя, если он присутствует). Таким образом, контакт между антителом и майтанзиноидом приводит к смеси, содержащей несколько конъюгатов, отличающихся один от другого различными отношениями лекарственного средства к антителу; необязательно недериватизированное антитело; необязательно агрегаты. Таким образом, определяемое DAR является средним значением.

Способ, используемый в настоящем описании, для определения DAR, состоит из спектрофотометрического измерения отношения оптической плотности раствора в значительной степени очищенного конъюгата при 252 нм и 280 нм. В частности, указанное DAR можно спектрофотометрически

определить с использованием измеренных коэффициентов экстинкции, соответственно при 280 и 252 нм для антитела и для майтанзиноида ($\epsilon_{D280}=5,180 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ и $\epsilon_{D252}=26,159 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Способ расчета заимствован в Antony S. Dimitrov (ed), LLC, 2009, Therapeutic Antibodies and Protocols, vol 525, 445, Springer Science и более подробно описан ниже:

Оптические плотности конъюгата при 252 нм (A252) и при 280 нм (A280) измеряют в анализе мономерных пиков при эксклюзионной хроматографии (SEC) (позволяя рассчитать параметр "DAR(SEC)") или с использованием классического спектрофотометрического устройства (что позволяет рассчитать параметр "DAR(UV)"). Оптические плотности можно выражать следующим образом:

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

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

где C_D и C_A соответственно представляют собой концентрации майтанзиноида и антитела в растворе,

ϵ_{D252} и ϵ_{D280} соответственно представляют собой молярные коэффициенты экстинкции майтанзиноида при 252 и 280 нм,

ϵ_{A252} и ϵ_{A280} соответственно представляют собой молярные коэффициенты экстинкции антитела при 252 и 280 нм.

Решение этих двух уравнений с двумя неизвестными приводит к следующим уравнениям:

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

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

Затем на основании отношения концентрации лекарственного средства к концентрации антитела рассчитывают среднее DAR: $DAR = C_D / C_A$.

Дегликозилирование и высокоразрешающая масс-спектрометрия конъюгатов (HRMS).

Дегликозилирование представляет собой способ ферментативного расщепления посредством гликозидазы.

Дегликозилирование проводят в 500 мкл конъюгированного+100 мкл 50 mM буфера Tris HCl+10 мкл фермента гликаназы-F (100 единиц лиофилизированного фермента/100 мкл воды). Среду перемешивают на центрифуге "вортекс" и поддерживают ночь при 37°C. Затем дегликозилированный образец готов к анализу в HRMS. Масс-спектры получали в системе Waters Q-ToF-2 в положительном режиме электрораспыления (ES+). Условия хроматографии являются следующими: колонка: 4 мкм BioSuite 250 URH SEC 4,6×300 мм (Waters); растворители: А: аммоний формиат 25 mM+1% муравьиная кислота; В: CH₃CN; температура колонки: 30°C; скорость потока 0,4 мл/мин; изократическая элюция 70% А+30% В (15 мин).

Аналитическая эксклюзионная хроматография (SEC).

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

Подвижная фаза: KCl (0,2M), KH₂PO₄ (0,052 M), KH₂PO₄ (0,107 M), iPrOH (20% в объеме).

Условия анализа: изократическая элюция при 0,5 мл/мин в течение 30 мин.

Анализ проводят в системе ВЭЖХ Lachrom Elite (Merck) с использованием спектрофотометрического детектора DAD L2455.

Состав буферов.

Буфер А (pH 6,5): NaCl (50 mM), фосфатно-калиевый буфер (50 mM), EDTA (2 mM).

Буфер HGS (pH 5,5): гистидин (10 mM), глицин (130 mM), сахароза 5% (мас./об.), HCl (8 mM).

Используемые сокращения

CV: объем колонки; DAR: отношение лекарственного средства и антитела; DMA: диметилацетамид; HEPES: 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота; HRMS: масс-спектрометрия высокого разрешения; NHS: N-гидрокси-3-(диметиламино)пропиловый эфир; нитро-SPDB: бутановая кислота, сложный 4-[(5-нитро-2-пиридинил)дитио]-2,5-диоксо-1-пирролидиниловый эфир (можно получать, как описано в патенте WO 2004016801); NMP: N-метилпирролидинон; КТ: комнатная температура; SEC: эксклюзионная хроматография.

ADC (химерное):

chMAb1-SPDB-DM4.

Аналитические данные:

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 и $\epsilon_{252 \text{ нм}}$ (DM4)=26159.

При перемешивании, при КТ в сосуд добавляли 3,59 мл chMAb1 (C=5,72 мг/мл в буфере PBS с pH 7,4) с последующим добавлением 0,312 мл DMA и 0,046 мл раствора линкера нитро-SPDB (5,0 экв. - 15 mM раствор в DMA). Раствор перемешивали на центрифуге "вортекс" в течение 30 с и затем медленно перемешивали при КТ в течение 3 ч. При перемешивании на магнитной мешалке последо-

вательно добавляли 3,8 мл буфера PBS с pH7,5, 0,389 мл DMA и 0,074 мл раствора DM4 (15 мМ раствор в DMA). Через 2,5 ч при КТ неочищенную реакционную смесь очищали на обессоливающей колонке HiLoad 26/60 (Superdex 200 пг; GE Healthcare), предварительно выдерживали с 1 CV 1M NaOH, 2 CV воды и 2 CV буфера PBS с pH7,4, содержащего в объеме 5% NMP. Конъюгат элюировали буфером PBS с pH7,4, содержащим 5% NMP, и фракции мономерных конъюгатов объединяли, концентрировали в Amicon Ultra-15 (Ultracel 10 k, Millipore) и фильтровали на 0,22-мкм фильтре.

Таким образом, получали 7,6 мл конъюгата chMAb1-SPDB-DM4 ($c=2,19$ мг/мл) в виде бесцветного прозрачного раствора. Затем конъюгат анализировали на конечную нагрузку лекарственного средства и чистоту мономеров:

DAR (UV)=3,38; DAR (SEC)=3,34;

RT=17,54 мин; чистота мономеров=99,8%.

Результат анализа HRMS представлен на фиг. 8.

chMAb2-SPDB-DM4.

Аналитические данные:

M_w (Ab)=147900 г/моль; M_w (DM4)=780,38 г/моль;

$\epsilon_{280 \text{ нм}}$ (Ab)=201400; $\epsilon_{252 \text{ нм}}$ (Ab)=70889;

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

При перемешивании, при КТ в сосуд добавляли 3,8 мл chMAb2 ($C=5,08$ мг/мл в PBS pH 7,4 буфер) с последующим добавлением 0,337 мл DMA и 0,0433 мл раствора линкера нитро-SPDB (5,0 экв. 15 мМ раствор в DMA). Раствор перемешивали на центрифуге "вортекс" в течение 30 с и затем медленно перемешивали при КТ в течение 3 ч. При перемешивании на магнитной мешалке последовательно добавляли 3,12 мл буфера PBS с pH7,5, 0,319 мл DMA и 0,069 мл раствора DM4 (15 мМ раствор в DMA). Через 2 ч при КТ неочищенную реакционную смесь фильтровали на 0,45-мкм фильтре и очищали на обессоливающей колонке HiLoad 26/60 (Superdex 200 пг; GE Healthcare), предварительно выдерживали с 1 CV 1M NaOH, 2 CV воды и 2 CV буфера PBS с pH7,4, содержащего в объеме 5% NMP. Конъюгат элюировали буфером PBS с pH7,4, содержащим 5% NMP, и фракции мономерных конъюгатов объединяли, концентрировали на Amicon Ultra-15 (Ultracel 10 k, Millipore) и фильтровали на 0,22-мкм фильтре.

Таким образом, получали 7,5 мл конъюгата chMAb2-SPDB-DM4 ($c=1,8$ мг/мл) в виде бесцветного прозрачного раствора. Затем конъюгат анализировали на конечную нагрузку лекарственного средства и чистоту мономеров:

DAR (UV)=4,10; DAR (SEC)=4,05;

RT=17,52 мин; чистота мономеров=99,9%.

Результат анализа HRMS представлен на фиг. 9.

chMAb4-SPDB-DM4.

Аналитические данные:

M_w (Ab)=148124 г/моль; M_w (DM4)=780,38 г/моль;

$\epsilon_{280 \text{ нм}}$ 280 нм (Ab)=204380; $\epsilon_{280 \text{ нм}}$ 252 нм (Ab)=73142;

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

При перемешивании, при RT, в сосуд добавляли 3,63 мл chMAb4 ($C=5,69$ мг/мл в PBS pH 7,4 буфер) с последующим добавлением 0,316 мл DMA и 0,0465 мл раствора линкера нитро-SPDB (5,0 экв. - 15 мМ раствор в DMA). Раствор перемешивали на центрифуге "вортекс" в течение 30 с и затем медленно перемешивали при КТ в течение 3 ч. При перемешивании на магнитной мешалке последовательно добавляли 3,8 мл буфера PBS с pH7,5, 0,389 мл DMA и 0,074 мл раствора DM4 (15 мМ раствор в DMA). Через 2 ч при КТ неочищенную реакционную смесь очищали на обессоливающей колонке HiLoad 26/60 (Superdex 200 пг; GE Healthcare), предварительно выдерживали с 1 CV 1M NaOH, 2 CV воды и 2 CV буфера PBS с pH7,4, содержащего в объеме 5% NMP. Конъюгат элюировали буфером PBS с pH7,4, содержащим 5% NMP, и фракции мономерных конъюгатов объединяли, концентрировали на Amicon Ultra-15 (Ultracel 10 k, Millipore) и фильтровали на 0,22-мкм фильтре.

Таким образом, получали 6,5 мл конъюгата chMAb4-SPDB-DM4 ($c=2,20$ мг/мл) в виде бесцветного прозрачного раствора. Затем конъюгат анализировали на конечную нагрузку лекарственного средства и чистоту мономеров:

DAR (UV)=3,8 7; DAR (SEC)=3,85;

RT=17,52 мин; чистота мономеров=99,8%.

Результат анализа HRMS представлен на фиг. 10.

chMAb5-SPDB-DM4.

Аналитические данные:

M_w (Ab)=148040 г/моль; M_w (DM4)=780,38 г/моль;

$\epsilon_{280 \text{ нм}}$ 280 нм (Ab)=207360; $\epsilon_{280 \text{ нм}}$ 252 нм (Ab)=72288;

$\epsilon_{280 \text{ нм}}$ 280 нм (DM4)=5180 и $\epsilon_{280 \text{ нм}}$ 252 н (DM4)=2 6159.

При перемешивании, при КТ в сосуд добавляли 3,15 мл chMAb5 ($C=6,38$ мг/мл в PBS pH 7,4 бу-

фер) с последующим добавлением 0,269 мл DMA и 0,0453 мл раствора линкера нитро-SPDB (5,0 экв. 15 мМ раствор в DMA). Раствор перемешивали на центрифуге "вортекс" в течение 30 с и затем медленно перемешивали при КТ в течение 3 ч. При перемешивании на магнитной мешалке последовательно добавляли 4,1 мл буфера PBS с pH7,5, 0,317 мл DMA и 0,072 мл раствора DM4 (15 мМ раствор в DMA). Через 2 ч при КТ неочищенную реакционную смесь фильтровали на 0,45-мкм фильтре и очищали на обессоливающей колонке HiLoad 26/60 (Superdex 200 пг; GE Healthcare), предварительно выдерживали с 1 CV 1M NaOH, 2 CV воды и 2 CV буфера PBS с pH7,4, содержащего в объеме 5% NMP. Конъюгат элюировали буфером PBS с pH7,4, содержащим 5% NMP, и фракции мономерных конъюгатов объединяли, концентрировали на Amicon Ultra-15 (Ultracel 10 k, Millipore) и фильтровали на 0,22-мкм фильтре.

Таким образом, получали 7,5 мл конъюгата

AntiCEACAM5_hyb_1917CEA4_VH5Q7S_VL41G42K45Q_IgG1-SPDB-DM4 (с=3,4 мг/мл) в виде бесцветного прозрачного раствора. Затем конъюгат анализировали на конечную нагрузку лекарственного средства и чистоту мономеров: DAR (UV)=3,4; DAR (SEC)=3,4;

RT=17,49 мин; чистота мономеров=99,8%.

Результат анализа HRMS представлен на фиг. 11.

Пример 5.3. Эффективность *in vivo*.

Четыре химерных конъюгата (chMAb4-SPDB-DM4, chMAb1-SPDB-DM4, chMAb5-SPDB-DM4 и chMAb2-SPDB-DM4) оценивали при 2 дозах в отношении измеримых первичных опухолей толстого кишечника CR-IGR-034P, п./к. имплантированных самкам мышей SCID. Контрольные группы оставляли без обработки. Дозы конъюгатов приведены в мг/кг. Их вводили в дозах 5 и 2,5 мг/кг посредством внутривенной (в/в) болюсной инъекции на сутки 14 после имплантации опухоли.

Для оценки противоопухолевой активности конъюгатов, животных ежедневно взвешивали, и опухоли 2 раза в неделю измеряли циркулем. Дозу, приводящую к 20% потере массы в нижней точке (среднее по группе) или к 10% или более вызванных лекарственным средством случаев гибели, считали избыточно токсичной дозой. Массы тела животных включали массы опухолей. Объем опухоли рассчитывали с использованием формулы массы (мм³)=[длина (мм)×ширина (мм)²]/2. Первичными ожидаемыми признаками эффективности являются ΔT/ΔC, процент среднего регресса, частичный и полный регресс (PR и CR).

Изменение объема опухоли для каждого обработанного (Т) и контрольного (С) животного рассчитывают для каждой опухоли, вычитая объем опухоли на сутки первой обработки (сутки определения стадии) из объема опухоли на конкретные сутки наблюдения. Для обработанной группы рассчитывают среднее ΔТ, и для контрольной группы рассчитывают среднее ΔС. Затем рассчитывают отношение ΔТ/ΔС и выражают в виде процентов: ΔТ/ΔС=(дельта Т/дельта С)×100.

Дозу считают терапевтически активной, когда ΔТ/ΔС является меньшим, чем 40%, и очень активной, когда ΔТ/ΔС является меньшим, чем 10%. Если ΔТ/ΔС меньше 0, дозу считают высокоактивной, и вычисляют процент регресса (Plowman J, Dykes DJ, 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):

% регресса опухоли определяют как % снижения объема опухоли в обработанной группе на конкретные сутки наблюдения по сравнению с ее объемом на первые сутки первой обработки.

В конкретный момент времени и для каждого животного рассчитывают % регресса. Затем рассчитывают средний % регресса для группы:

$$\% \text{ регресс (при } t) = \frac{\text{объем}_{t_0} - \text{объем}_t}{\text{объем}_{t_0}} \times 100$$

Частичный регресс (PR): регресс определен как частичный, если объем опухоли снижается до 50% от объема опухоли в начале обработки.

Полный регресс (CR): полный регресс достигается, когда объем опухоли=0 мм³ (CR считают, когда нельзя зарегистрировать объем опухоли).

Результаты.

Результаты представлены на фиг. 4 и в табл. 9 (ниже). При использовании схемы с одним введением в дозах 2,5 и 5 мг/кг все конъюгаты, тестируемые в этом исследовании, не вызывают токсичности.

chMAb1-SPDB-DM4 был очень активен при 5 и 2,5 мг/кг с ΔТ/ΔС 0 и 7% (p<0,0001 и p=0,0170 по отношению к контролю), соответственно. chMAb4-SPDB-DM4 и chMAb5-SPDB-DM4 были высокоактивными при 5 мг/кг с ΔТ/ΔС -5 и -7% (p<0,0001 при сравнении с контролем), соответственно, и регрессом опухоли 25 и 65%, соответственно. Они были очень активными при 2,5 мг/кг с ΔТ/ΔС 7 и 2% (p=0,0152 и p=0,0020 при сравнении с контролем), соответственно. chMAb2-SPDB-DM4 был высокоактивным при 5 и 2,5 мг/кг с ΔТ/ΔС -10 и -8% (p<0,0001 при сравнении с контролем), соответственно, регрессом опухоли 82 и 39%, соответственно, и 3 и 1 CR/6, соответственно.

На основании этих результатов все химерные конъюгаты chMAb4-SPDB-DM4, chMAb1-SPDB-

DM4, chMAb5-SPDB-DM4 и chMAb2-SPDB-DM4 пригодны для разработки терапевтических ADC.

Таблица 9

Оценка противоопухолевой активности конъюгатов chMAb1-SPDB-DM4, chMAb2-SPDB-DM4, chMAb4-SPDB-DM4 и chMAb5-SPDB-DM4 против первичной аденокарциномы толстой кишки человека CR-IGR-034P у самок мышей SCID

Средство ¹	Путь/Доза в мл/кг	Доза в мг/кг per инъекция	Схема в сутках	Вызванная лекарственным средством гибель (сутки)	Среднее изменение массы тела в % у мыши в нижней точке (сутки)	Среднее ΔT/ΔC в % (сутки)	Средний % регресса (сутки)	Регрессы		Биостатистическое значение p ²	Комментарии
								Часичный	Полный		
chMAb1-SPDB-DM4	в/в (10 мл/кг)	5	14	0/6	-0,3 (D23)	0 (D33)	-	2/6	0/6	<0,0001	Очень активный
		2,5	14	0/6	-1,2 (D22)	7 (D21)	-	0/6	0/6	=0,0170	Очень активный
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	Высокоактивный
		2,5	14	0/6	-1,3 (D57)	-8 (D28)	39 (D28)	2/6	1/6	<0,0001	Высокоактивный
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	Высокоактивный
		2,5	14	0/6	-1,8 (D21)	7 (D25)	-	0/6	0/6	=0,0152	Очень активный
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	Высокоактивный
		2,5	14	0/6	-0,8 (D23)	2 (D21)	-	0/6	0/6	=0,0020	Очень активный
Контроль	-	-	14	-	-3,6 (D29)	-	-	-	-	-	-

¹ Состав лекарственного средства: HGS (10 мМ гистидин, 130 мМ глицин, 5% об./об. сахара, 0,01% Tween 80) pH 7,4;

² значение p: тест Даннета в сравнении с контролем после 2-стороннего дисперсионного анализа с повторными измерениями преобразованных в ранги изменений объема опухоли от исходного уровня.

Пример 6. Гуманизация mAb MAb2 к CEACAM5.

В этом примере *in silico* конструировали гуманизированные варианты исходного MAb2 IgG мыши. Полученные mAb получали и определяли сходные характеристики, как для химерного IgG chMAb2.

Пример 6.1. Протокол гуманизации 4D.

а) Гуманизация на основе траекторий молекулярной динамики.

Последовательности VL & VH клона MAb2 мыши сравнивали с базой данных белков (PDB) (Berman и al., Nucleic Acids Research, 2000, 28:235-242). Использовали следующие шаблоны: каркас легкой и тяжелой цепи - 3ЕНВ (90,9% идентичности каркаса легкой цепи и 90,8% идентичности каркаса тяжелой цепи), L1-118M, L2-1F6L, L3-1P7K, H1-2QHR, H2-1IGT и H3-1P4В с построением модели гомологии LC и HC к CEACAM5 с использованием молекулярной операционной среды (MOE) (v. 2011,10 - Chemical Computing Group, Quebec, Canada). Затем в модели гомологии минимизировали энергию с использованием стандартных способов, реализованных в MOE.

Затем проводили симуляцию молекулярной динамики (MD) минимизированной 3D модели гомологии MAb2 мыши, с ограничениями на белковый каркас при температуре 500 K на 1,1 нс в генерализованном подразумеваемом растворителе Борна. В этом первом проходе MD каждые 100 пс в течение последней 1 нс извлекали 10 различных конформаций. Затем каждую из этих различных конформаций подвергали симуляции MD без ограничений на каркас белка и при температуре 300 K в течение 2,3 нс. Затем для каждого из 10 проходов MD, последние 2000 снимков, один каждую пс, из траектории MD использовали для расчета, для каждой аминокислоты MAb2 мыши, ее среднеквадратические отклонения (с.к.о.) сравнивали с эталонным положением медоида. Сравнивая среднее с.к.о. для 10 отдельных проходов MD для данной аминокислоты с общим средним с.к.о. всех аминокислот MAb2 мыши, принимали решение, является ли аминокислота является достаточно подвижной, как наблюдают при MD, чтобы рассматривать ее как вероятно взаимодействующую с Т-клеточными рецепторами и ответственную за активацию иммунного ответа. В антителе MAb2 мыши как подвижные

идентифицированы 32 аминокислоты, исключая CDR и ее непосредственное окружение в пределах 5 Å.

Затем подвижность 60 наиболее подвижных аминокислот MAb2 мыши в течение 20 нс (10×2 нс) при симуляции молекулярной динамики сравнивали с подвижностью соответствующих подвижных аминокислот 49 моделей 3D-гомологии у человека, для каждой из которых проводили такую же симуляцию MD. Эти 49 моделей зародышевой линии человека построены посредством систематического комбинирования репрезентативной панели 7 легких цепей человека (а именно vk1, vk2, vk3, vk4, vlambd1, vlambd2, vlambd3) с репрезентативной панелью 7 тяжелых цепей человека (а именно vh1a, vh1b, vh2, vh3, vh4, vh5, vh6) (Nucleic Acid Research, 2005, Vol. 33, Database issue D593-D597).

Комбинация vk1-vh6 продемонстрировала наибольшее (72,6%) сходство 4D своих подвижных аминокислот в сравнении с подвижными аминокислотами антитела MAb2 мыши; таким образом, эту модель использовали для гуманизации антитела MAb2 с фокусированием на подвижных аминокислотах. Для парной ассоциации аминокислот в MAb2 мыши и аминокислотах vk1-vh6 2 последовательности выравнивали на основе оптимального 3D наложения альфа-атомов углерода в 2 соответствующих гомологичных моделях.

b) Стабилизирующие мутации.

Для улучшения стабильности областей VL и VH антитела к SEACAM5, аминокислоты легких и тяжелых цепей с низкой частотой встречаемости по сравнению с их соответствующими каноническими последовательностями, исключая CDR, исходно планировали подвергнуть мутации в наиболее часто выявляемые аминокислоты ($\Delta\Delta G_{th} > 0,5$ ккал/моль; (Monsellier и al. J. Mol. Biol. 2006, 362,580-593). Первый список консенсусных мутаций для LC и для HC ограничен аминокислотами, выявляемыми в ближайшей модели для человека (т.е. vk1-vh6). Ни одна из этих мутаций не расположена в зоне "Vernier" (Foote и al., J. Mol. Biol. 1992, 224, 487-499). Учитывали другие критерии для рассмотрения этих консенсусных мутаций для потенциальной стабилизации антитела MAb2 к SEACAM5. Эти критерии представляют собой благоприятное изменение гидрофобности на поверхности или молекулярной механики на основе теоретически рассчитанной стабилизации мутанта. Рассматривали стабилизирующие мутации, которые в литературе опубликованы как эффективные (Bedouelle, H.J. Mol. Biol. 2006, 362,580-593; Steipe B.J. Mol. Biol. 1994, 240, 188-192).

c) Удаление нежелательных мотивов последовательностей.

Рассматривали следующие мотивы последовательностей: Asp-Pro (кислотолабильная связь), Asn-X-Ser/Thr (гликозилирование, X=любая аминокислота кроме Pro), Asp-Gly/Ser/Thr (формирование сукцинимид/изо-Asp в подвижных областях), Asn-Gly/His/Ser/Ala/Cys (экспонированные участки дезамидирования), Met (окисление в экспонированной области). Полученные гуманизированные последовательности посредством BLAST проверяли на сходство последовательностей с базой данных иммунных эпитопов (IEDB) ((PLoS Biol (2005) 3(3)e91) <http://www.immuneepitope.org>) для гарантии того, что ни одна из последовательностей не содержит ни одного известного B- или T-клеточного эпитопа из перечисленных в ней.

d) Гуманизированные области VH и VL.

Предложены три версии для легкой цепи (VL1, VL1a, и VL1c) и три версии для тяжелой цепи (VH1, VH1a и VH1b). В табл. 10 и табл. 11 приведена конкретная комбинация аминокислотных остатков, измененных в каждом гуманизированном варианте VL и VH MAb2, соответственно. В табл. 12 приведены полные аминокислотные последовательности гуманизированных доменов VH и VL.

Вариант VL1 демонстрирует 5 мутаций, которые получены на основе прямого сравнения наиболее подвижных не входящих в CDR аминокислот легкой цепи MAb2 к SEACAM5 и последовательности легкой цепи vk1 человека.

Вариант VL1a получен из VL1 и включает 4 новых мутаций, которые являются консенсусными (последовательность vk1) и потенциально стабилизирующими. Кроме того, 1 из этих мутаций затрагивает потенциально проблематичный участок дезамидирования ($D_{17}T_{18}$).

Вариант VL1c получен из VL1a посредством внесения 1 мутации R вместо K в положении 52. Фактически, этот K52 расположен в CDR L2 и может представлять собой "мишень" для процесса конъюгации.

Вариант VH1 демонстрирует 7 мутации, которые получены на основе прямого сравнения наиболее подвижных не входящих в CDR аминокислот тяжелой цепи MAb2 к SEACAM5 и последовательности тяжелой цепи vh6 человека.

Вариант VH1a получен из VH1 и содержит 4 новых мутации, которые являются консенсусными (последовательность vh6) и потенциально стабилизирующими.

Гуманизированные домены VL и VH антитела к SEACAM5 MAb2 комбинировали следующим образом: VL1 и VH1; VL1a и VH1a; VL1c и VH1a; VL1a и VH1b.

Таблица 10

Мутации вариантов VL антитела к СЕАСАМ5 МАb2

VL МАb2 мыши	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

Таблица 11

Мутации вариантов VH антитела к СЕАСАМ5 МАb2

VH МАb2 мыши	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

Таблица 12

**Аминокислотные последовательности VH и VL
иллюстративных гуманизированных антител к CEACAM5**

Вариант VH или VL	Последовательность	SEQ ID NO.
VH1 клона MAb2	EVQLQESGPGPLVKPGGSLSLSCAASGFVFS SYDMSWVRQTPERRLEWVAYISSGGGITYF PSTVKGRFTVSRDNAKNTLYLQMNLSLTSED TAIYYCAAHYFGSSGPFAYWGQGLVTVSA	SEQ ID NO:51
VH1a клона MAb2	EVQLQESGPGPLVKPGGSLSLSCAASGFVFS SYDMSWVRQTPERGLEWVAYISSGGGITYA PSTVKGRFTVSRDNAKNTLYLQMNLSLTSED TAVYYCAAHYFGSSGPFAYWGQGLVTVSS	SEQ ID NO:5
VL1 клона MAb2	DIQMTQSPASLSASVGDVTITCRASENIF SYLAWYQQKPGKSPKLLVYNTRTLAEGVPS RFGSGSGTQFSLTISLQPEDFGSYQCQH HYGTPFTFGSGTKLEIK	SEQ ID NO:17
VL1a клона MAb2	DIQMTQSPASLSASVGDVTITCRASENIF SYLAWYQQKPGKSPKLLVYNTRTLAEGVPS RFGSGSGTDFSLTISLQPEDFATYYCQH HYGTPFTFGSGTKLEIK	SEQ ID NO:23
VL1c клона MAb2	DIQMTQSPASLSASVGDVTITCRASENIF SYLAWYQQKPGKSPKLLVYNTRTLAEGVPS RFGSGSGTDFSLTISLQPEDFATYYCQH HYGTPFTFGSGTKLEIK	SEQ ID NO:29
VL1d клона MAb2	DIQMTQSPASLSASVGDVTITCRASENIF SYLAWYQQKPGKSPKLLVYNTRTLAEGVPS RFGSGSGTQFSLTISLQPEDFGSYQCQH HYGTPFTFGSGTKLEIK	SEQ ID NO:55

Пример 6.2. Последовательность гуманизированного mAb к CEACAM5.

На основе аминокислотных последовательностей вариантов VL и VH *in silico* получали последовательности нуклеиновых кислот и синтезировали посредством Geneart. Последовательности клонировали в экспрессирующие векторы в слиянии с кодирующими последовательностями константных доменов IgG1 человека или Скаппа человека, соответственно.

Пример 6.3. Получение и характеристика *in vitro*.

Получали партии гуманизированных mAb посредством транзитной экспрессии в HEK293 и очищали посредством аффинной хроматографии с белком А. Структуру и идентичность подтверждали посредством анализов на основе SDS-PAGE, эксклюзионной хроматографии и масс-спектрометрии.

Аффинность в отношении CEACAM5 человека и яванского макака подтверждали посредством ELISA, EC_{50} предоставлены в табл. 13.

Таблица 13

Аффинность гуманизированного mAb к CEACAM5
к CEACAM5 человека и яванского макака

Код	mAb	CEACAM5 человека		CEACAM5 яванского 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_VL1d VH1-IgG1	0,22	4,3%	0,17	5,0%
chMAb2	MAb2-IgG1	0,16	9,9%	0,17	3,0%

Специфичность к CEACAM5 человека в сравнении с CEACAM1, CEACAM6, CEACAM7 и CEACAM8 человека подтверждали посредством ELISA. Ее регистрировали как процент связывания по сравнению с полным связыванием с CEACAM5 человека, см. табл. 14.

Таблица 14

Процент связывания гуманизированного mAb к CEACAM6 с CEACAM человека

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_VL1d VH1-IgG1	100%	0,3%	0,3%	0,3%	1,4%
chMAb2	MAb2-IgG1	100%	0,3%	0,3%	0,3%	0,6%

Эпитопсвязывающий домен подтверждали посредством ELISA и продемонстрировали, что гуманизированные варианты специфически распознавали домен A3-B3. Его регистрировали как процент связывания по сравнению с полным связыванием с CEACAM5 человека в табл. 15.

Таблица 15

Процент связывания гуманизированного mAb к
CEACAM5 с доменами CEACAM5 человека

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_VL1d VH1-IgG1	0,3%	0,3%	100%
chMAb2	MAb2-IgG1	0,5%	0,3%	100%

Кинетику связывания гуманизированных вариантов MAb2 к CEACAM5 по сравнению с химерным MAb2, рекомбинантным CEACAM5 человека (hCEACAM5) и CEACAM5 яванского макака (сCEACAM5) определяли посредством анализа поверхностного плазмонного резонанса с использованием BIAcore 2000 (BIAcore Inc., Uppsala, NJ).

Кратко, биосенсорный чип CM5 BIAcore закрепляли в устройстве и активировали 70 мкл NHS/EDC 1:1 при комнатной температуре. Для всех потоков клеток на активированных чипах иммобилизовали IgG1 мыши к Fc человека (BIAcore #BR-1008-39) (50 мкг/мл в 1М ацетатном буфере, pH5). Иммобилизацию проводили при скорости потока 10 мкл/мин до насыщения. Затем чип блокировали посредством инъекции 70 мкл этаноламина-HCl, pH8,5 с последующей одной отмывкой 3М MgCl₂. Для измерения связывания mAb к CEACAM5 с белком CEACAM5 человека или белком CEACAM5 яванского макака антитела использовали при 1-5 мкг/мл в подвижном буфере BIAcore (HBS-EP). Антигены (CEACAM5 человека или CEACAM5 яванского макака) инъецировали в концентрации

от 1 до 500 нМ. После завершения фазы инъекция контролировали диссоциацию в подвижном буфере ВІАсоге при той же скорости потока в течение 600 с. Между инъекциями поверхность регенерировали с использованием 2×5 мкл MgCl₂ 3М (2×30 с). Отдельные сенсограммы анализировали с использованием программного обеспечения ВІАevaluation.

Таблица 16

Связывание гуманизированного mAb к
СЕАСАМ5 с СЕАСАМ5 человека и обезьяны

	СЕАСАМ5 человека	СЕАСАМ5 яванского макака
mAb	KD (нМ)	KD (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

Специфичность гуманизированных вариантов MAb2 к СЕАСАМ5 по сравнению с химерным MAb2 к СЕАСАМ5 яванского макака в сравнении с СЕАСАМ1, СЕАСАМ6 и СЕАСАМ8 яванского макака подтверждали посредством ELISA. Ее регистрировали как процент связывания по сравнению с полным связыванием с СЕАСАМ5 или связыванием при EC₅₀, см. табл. 17 ниже

Таблица 17

Процент связывания гуманизированного mAb к
СЕАСАМ6 с СЕАСАМ яванского макака

код	mAb	СЕА яванского макака			
		САМ5	САМ1	САМ6	САМ8
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_VL1d_VH1-IgG1	100%	0,3%	0,3%	3,2%
chMAb2	MAb2-IgG1	100%	0,2%	0,3%	1,2%

Пример 6.4. Характеристика гуманизированных вариантов MAb2, получаемых посредством прививки на каркасы зародышевой линии человека.

В этом примере получали гуманизированные варианты MAb2 посредством похода прививки CRD. Кроме того CDR гуманизированного антитела использовали в способе со сканированием аланином для демонстрации того, что некоторые положения можно заменять без воздействия на связывание с СЕАСАМ5 человека и *Macaca fascicularis*.

Сначала получали последовательность гуманизированной версии MAb2 *in silico* посредством отбора каркасов зародышевой линии человека на основании структурной гомологии с антителом MAb2 мыши. Для легкой цепи отобранные каркасы, принадлежащие человеку, определяют гены IGKV1D-39*01 и IGKJ2*02, и для тяжелой цепи - гены IGHV3-23*04 и IGHJ4*01. В эти принадлежащие человеку каркасы прививали шесть CDR MAb2_{K52R}. Вносили три обратных мутации, соответствующих положениям 34 и 53 в VL (SEQ ID NO: 34) (области FR2-L и FR3-L, соответственно) и положению 50 в VH (SEQ ID NO: 33) (область FR2-H), с получением приведенной ниже последовательности, определенной как MAb2_VLg5VHg2.

Таблица 18

Последовательности VH и VL MAb2_VLg5VHg2

Вариант VH или VL	Последовательность	SEQ ID NO.
MAb2_VHg2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFVFSYDMSWVRQAPGKLEWVSYISSGGGITYYADS VKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAAHYFGSSGPFAYWGQGLTIVTSS	SEQ ID NO: 74
MAb2_VLg5	DIQMTQSPFSSLSASVGDRTITCRASENIFSYLAWYQQKPKGKAPKLLIYNTRTLQSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQNHYGTPFTFGQGTKLEIK	SEQ ID NO: 75

Получали несколько вариантов MAb2_VLg5VHg2 посредством единичной замены каждой ами-

нокислоты шести CDR, предпочтительно аланином. Когда аланин уже находился в CDR MAb2_VLg5VHg2, что имеет место в H-CDR3, заменяли другую аминокислоту (Val в остатке 97, Arg в остатке 98 и Asp в остатке 108 SEQ ID NO: 74).

На основе аминокислотных последовательностей вариантов VL и VH *in silico* выводили последовательности нуклеиновой кислоты и получали посредством генного синтеза. Последовательности клонировали в экспрессирующий вектор млекопитающих в слиянии с кодирующими последовательностями константных доменов IgG1 человека или Скаппа человека, соответственно. Гуманизированное MAb2_VLg5VHg2, отдельные варианты, отличающиеся от него одним положением, и ограниченное количество комбинационных мутантов получали посредством транзитной экспрессии в клетках НЕК293. Супернатанты клеток, содержащие секретируемые IgG (20-70 мкг/мл) разбавляли до 1 мкг/мл для использования в анализах связывания с ECD CEACAM5 человека, ECD Macaca fascicularis и доменом А3-В3 CEACAM5 человека.

Для оценки влияния этих модификаций определяли связывание IgG, измеряя сигналы SPR с использованием устройства Biacore T200 (GE Healthcare). Антитела к Fc человека связывали с чипом Series S CM5 посредством набора для связывания аминов с достижением уровня 10000 единиц ответа (РЕ). Захватывали приблизительно от 300 до 600 РЕ каждого варианта посредством инъекции супернатантов при 1 мкг/мл со временем контакта 60 с и скоростью потока 10 мкл/мин. Все эксперименты проводили при 25°C с HBS-EP+ (10 мМ Hepes, 150 мМ NaCl, 3 мМ EDTA, 0,05% поверхностно-активное вещество P20) в качестве подвижного буфера. В режиме скрининга, CEACAM5 человека/CEACAM5 яванского макака/домен А3В3 человека инъецировали при 50 нМ над захваченными вариантами IgG при скорости потока 30 мкл/мин в течение 1 мин. Поддерживали фазу диссоциации в течение 60 с с последующей регенерацией поверхности 1 импульсной инъекцией 3М MgCl₂ при скорости потока 10 мкл/мин и временем контакта 30 с.

Для каждого эксперимента данные ответа обрабатывали с использованием контрольной поверхности, таким образом, обеспечивая коррекцию на изменения объемного коэффициента преломления и любое неспецифическое связывание. Данные второй раз соотносили с использованием ответа пустых инъекций. В соответствии со способом скрининга, описанным в примечании к заявке GE Healthcare (Application note 28-9777-72 AA), рассматривали два параметра для ранжирования вариантов в отношении характеристик связывания. Первой рассчитывали активность связывания посредством расчета доли от теоретического максимального измеряемого сигнала (процент от R_{макс}, см. фиг. 16). Вторым рассчитывали процент остаточного сигнала с использованием контрольных точек диссоциации (первая через 10 с после окончания инъекции и вторая через 50 с после окончания инъекции), и он отражает стабильность связывания (см. фиг. 17).

Эквивалентные параметры связывания по сравнению с исходным антителом продемонстрировали варианты с одиночной заменой на аланин в указанных ниже положениях, что указывает на то, что аминокислоты CDR в этих положениях нейтральны для связывания: остатки LC 27, 28, 29, 31, 51, 52, 89, 90, 93, 94, 96, 97 и остатки HC 26-31, 51-58, 97, 103, 104, 107, 109. Поведение этих вариантов в отношении CEACAM5 человека и обезьяны является сходным, сохраняя, таким образом, их перекрестную реактивность. Обнаружено, что связывание с доменом А3-В3 CEACAM5 также не было затронуто. Также получены определенные комбинации двух нейтральных замен и обнаружено, что они приводят к неизменным параметрам связывания, как проиллюстрировано ассоциацией LC_T51A с LC_T94A, LC_S31A с HC_G54Y или LC_T53I с HC_S53A.

И наоборот, обнаружено, что во всех других положениях CDR, замена аланином исходной аминокислоты индуцировала полную потерю связывания или существенно изменяла параметры связывания. Примерами являются положение 101 тяжелой цепи или положения 32 и 91 легкой цепи, представленные на фиг. 16 и 17). Второй набор вариантов заключался в тестировании более консервативных мутаций в некоторых таких положениях. Прделав это, авторы обнаружили, что нейтральными для связывания антитела являются следующие консервативные замена: Туг для Phe в остатке 30 MAb2_VLg5, Phe для Туг в остатке 92 MAb2_VLg5, Ser для Ala в остатке 98 MAb2_VHg2 и Phe для Туг в остатке 100 MAb2_VHg2 (представлены на чертежах).

Пример 7. Конъюгаты гуманизированных вариантов MAb2 с лекарственными средствами.

Пример 7.1. Получение и характеристика.

huMAb2-2-SPDB-DM4.

Аналитические данные:

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

$\epsilon_{280\text{ нм}}$ (Ab)=201400; $\epsilon_{280\text{ нм}}$ (Ab)=71693;

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

При перемешивании, при КТ в сосуд добавляли 19,4 мг huMAb2-2 (C=5,1 мг/мл в PBS pH 7,4 буфер) с последующим добавлением 0,375 мл DMA и 0,0439 мл раствора линкера нитро-SPDB (5,0 экв. - 15 мМ раствор в DMA). Раствор перемешивали на центрифуге "вортекс" в течение 30 с и затем медленно перемешивали при КТ в течение 2 ч. Добавляли дополнительный объем 0,0044 мл раствора

линкера нитро-SPDB (5,0 экв. - 15 мМ раствор в DMA). Через 2 ч при КТ при перемешивании на магнитной мешалке последовательно добавляли 2 мл буфера PBS с pH 7,5 и 0,0702 мл раствора DM4 (15 мМ раствор в DMA). Через 2 ч при КТ неочищенную реакционную смесь фильтровали на 0,45-мкм фильтре и очищали на обессоливающей колонке HiPrep 26/10 (Sephadex G25, GE Healthcare), предварительно выдерживали с 1 CV 1M NaOH, 2 CV воды и 2 CV буфера из гистидина (10 мМ), глицина (130 мМ), сахарозы (5%), pH 5,5. Конъюгат элюировали буфером с гистидином (10 мМ), глицином (130 мМ), сахарозой (5%), pH 5,5, и фракции мономерных конъюгатов объединяли и фильтровали на 0,22-мкм фильтре.

Таким образом, получали 10,3 мл конъюгата huMAb2-2-SPDB-DM4 ($c=1,35$ мг/мл) в виде бесцветного прозрачного раствора. Затем конъюгат анализировали на конечную нагрузку лекарственного средства и чистоту мономеров: DAR (UV)=3,7; DAR (SEC)=3,6; RT=17,29 мин; чистота мономеров=97,9%.

Результат анализа HRMS представлен на фиг. 12.

huMAb2-1-SPDB-DM4.

Аналитические данные:

M_w (Ab)=147563 г/моль; M_w (DM4)=780,38 г/моль;

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

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

При перемешивании, при КТ в сосуд добавляли 3,8 мл раствора huMAb2-1 ($C=5,08$ мг/мл в PBS pH 7,4 буфер) с последующим добавлением 0,341 мл DMA и 0,0392 мл раствора линкера нитро-SPDB (4,5 экв. - 15 мМ раствор в DMA). Раствор перемешивали на центрифуге "вортекс" в течение 30 с и затем медленно перемешивали при КТ в течение 3 ч. Добавляли дополнительный объем 0,0087 мл раствора линкера нитро-SPDB (1,0 экв. - 15 мМ раствор в DMA). Через 2 ч при КТ при перемешивании на магнитной мешалке последовательно добавляли 2,62 мл буфера PBS с pH 7,5, 0,254 мл DMA и 0,076 мл раствора DM4 (15 мМ раствор в DMA). Через 1 ч при КТ неочищенную реакционную смесь фильтровали на 0,45-мкм фильтре и очищали на обессоливающей колонке HiPrep 26/10 (Sephadex G25, GE Healthcare), предварительно выдерживали с 1 CV 1M NaOH, 2 CV воды и 2 CV буфера из гистидина (10 мМ), глицина (130 мМ), сахарозы (5%), pH 5,5. Конъюгат элюировали буфером из гистидина (10 мМ), глицина (130 мМ), сахарозы (5%), pH 5,5, и фракции мономерных конъюгатов объединяли и фильтровали на 0,22-мкм фильтре.

Таким образом, получали 9,5 мл конъюгата huMAb2-1-SPDB-DM4 ($c=1,35$ мг/мл) в виде бесцветного прозрачного раствора. Затем конъюгат анализировали на конечную нагрузку лекарственного средства и чистоту мономеров: DAR (UV)=4,1; DAR (SEC)=4,0;

RT=17,39 мин; чистота мономеров=96,7%.

Результат анализа HRMS представлен на фиг. 13.

huMAb2-3-SPDB-DM4.

Аналитические данные:

M_w (Ab)=147417 г/моль; M_w (DM4)=780,38 г/моль;

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

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

При перемешивании, при КТ в сосуд добавляли 3,8 мл раствора huMAb2-3 ($C=5,09$ мг/мл в PBS pH 7,4 буфер) с последующим добавлением 0,336 мл DMA и 0,0437 мл раствора линкера нитро-SPDB (5 экв. - 15 мМ раствор в DMA). Раствор перемешивали на центрифуге "вортекс" в течение 30 с и затем медленно перемешивали при КТ в течение 3 ч. Добавляли дополнительный объем 0,0035 мл раствора линкера нитро-SPDB (0,4 экв. - 15 мМ раствор в DMA). Через 1 ч при КТ при перемешивании на магнитной мешалке последовательно добавляли 2,60 мл буфера PBS с pH 7,5, 0,248 мл DMA и 0,074 мл раствора DM4 (15 мМ раствор в DMA). Через 1 ч при КТ неочищенную реакционную смесь фильтровали на 0,45-мкм фильтре и очищали на обессоливающей колонке HiPrep 26/10 (Sephadex G25, GE Healthcare), предварительно выдерживали с 1 CV 1M NaOH, 2 CV воды и 2 CV буфера из гистидина (10 мМ), глицина (130 мМ), сахарозы (5%), pH 5,5. Конъюгат элюировали буфером из гистидина (10 мМ), глицина (130 мМ), сахарозы (5%), pH 5,5, и фракции мономерных конъюгатов объединяли и фильтровали на 0,22-мкм фильтре.

Таким образом, получали 11 мл конъюгата huMAb2-3-SPDB-DM4 ($c=1,08$ мг/мл) в виде бесцветного прозрачного раствора. Затем конъюгат анализировали на конечную нагрузку лекарственного средства и чистоту мономеров: DAR (UV)=3,9; DAR (SEC)=3,8;

RT=17,44 мин; чистота мономеров=98,4%.

Результат анализа HRMS представлен на фиг. 14.

huMAb2-4-SPDB-DM4.

Аналитические данные:

M_w (Ab)=14 7 628 г/моль; M_w (DM4)=780,38 г/моль;

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

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

При перемешивании, при КТ в сосуд добавляли 3,8 мл раствора huMAb2-4 ($C=5,09$ мг/мл в PBS pH 7,4 буфер) с последующим добавлением 0,345 мл DMA и 0,0448 мл раствора линкера нитро-SPDB (5 экв. - 15 мМ раствор в DMA). Раствор перемешивали на центрифуге "вортекс" в течение 30 с и затем медленно перемешивали при КТ в течение 3 ч. Добавляли дополнительный объем 0,0027 мл раствора линкера нитро-SPDB (0,3 экв. - 15 мМ раствор в DMA). Через 1 ч при КТ при перемешивании на магнитной мешалке последовательно добавляли 2,70 мл буфера PBS с pH7,5, 0,263 мл DMA и 0,075 мл раствора DM4 (15 мМ раствор в DMA). Через 1 ч при КТ неочищенную реакционную смесь фильтровали на 0,45-мкм фильтре и очищали на обессоливающей колонке HiPrep 26/10 (Sephadex G25, GE Healthcare), предварительно выдерживали с 1 CV 1M NaOH, 2 CV воды и 2 CV буфера из гистидина (10 мМ), глицина (130 мМ), сахарозы (5%), pH 5,5. Конъюгат элюировали буфером из гистидина (10 мМ), глицина (130 мМ), сахарозы (5%), pH 5,5, и фракции мономерных конъюгатов объединяли и фильтровали на 0,22-мкм фильтре.

Таким образом, получали 11 мл конъюгата huMAb2-4-SPDB-DM4 ($c=1,23$ мг/мл) в виде бесцветного прозрачного раствора. Затем конъюгат анализировали на конечную нагрузку лекарственного средства и чистоту мономеров: DAR (UV)=3,8; DAR (SEC)=3,8;

RT=17,53 мин; чистота мономеров=99,3%.

Результат анализа HRMS представлен на фиг. 15.

Пример 1.2. Цитотоксичность *in vitro*.

Материалы и методы.

Оценивали действие конъюгатов антител к CEACAM5 с майтанзиноидами на жизнеспособность опухолевых клеток, как описано в примере 3.4.

Результаты.

Таблица 19

Цитотоксическая активность специфичных к CEACAM5 гуманизированных ADC в отношении CEACAM5+ линии клеток MKN45

ADC	Цитотоксическая активность, 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
Неродственное ADC	8,52 \pm 2,07

Эти конъюгаты chMAb2-SPDB-DM4, huMAb2-1-SPDB-DM4, huMAb2-2-SPDB-DM4 и huMAb2-3-SPDB-DM4 и неродственный конъюгат с DM4 продемонстрировали цитотоксическую активность в отношении клеток MKN45 в культуре *in vitro* с IC_{50} 0,24, 0,18, 0,23, 0,16 и 8,52 нМ, соответственно. Цитотоксическая активность конъюгатов с антителами к CEACAM5 была в 53-35 раз ниже, чем измеряемая активность неродственного конъюгата с DM4, что указывает на опосредуемую CEACAM5 цитотоксическую активность конъюгатов с антителами к CEACAM5.

Пример 7.3. Эффективность *in vivo* против первичных опухолей толстого кишечника CR-IGR-034P, п.к. имплантированных самкам голых мышей CD-1.

Материалы и методы.

Две гуманизированные последовательности в виде конъюгатов huMAb2-3-SPDB-DM4 и huMAb2-4-SPDB-DM4 оценивали на 4 уровнях дозирования в сравнении с chMAb2-SPDB-DM4 в отношении измеримых первичных опухолей толстого кишечника CR-IGR-034P, п.к. имплантированных самкам голых мышей CD-1. Контрольные группы оставляли без обработки. Дозы конъюгатов приведены в мг/кг. Их вводили в дозах 10, 5, 2,5 и 1,25 мг/кг посредством внутривенной (в/в) болюсной инъекции на сутки 19 после имплантации опухоли.

Оценку токсичности и эффективности проводили, как описано в примере 5.

Результаты.

Результаты представлены на фиг. 5 и в табл. 20 (ниже).

При использовании схемы с одним введением в дозах 1,25, 2,5, 5 и 10 мг/кг все конъюгаты, тестируемые в этом исследовании, не вызывают токсичности.

huMAb2-4-SPDB-DM4 и chMAb2-SPDB-DM4 были высокоактивными при 10 мг/кг с $\Delta T/\Delta C$ -4% ($p < 0,0001$ в сравнении с контролем) и регрессом опухоли 21 и 19%, соответственно, активными при 5 мг/кг с $\Delta T/\Delta C$ 12 ($p=0,0105$ в сравнении с контролем) и 17% ($p=0,0417$ в сравнении с контролем), соответственно, и минимально активны при 2,5 мг/кг с $\Delta T/\Delta C$ 36 и 37% (несущественны в сравнении

с контролем), соответственно, и неактивны при 1,25 мг/кг. huMAb2-3-SPDB-DM4 был высокоактивным при 10 мг/кг с $\Delta T/\Delta C$ -6% ($p < 0,0001$ в сравнении с контролем) и регрессом опухоли 31%, очень активным при 5 мг/кг с $\Delta T/\Delta C$ 4% ($p < 0,0001$ в сравнении с контролем), активным при 2,5 мг/кг с $\Delta T/\Delta C$ 12 ($p = 0,0322$ в сравнении с контролем) и минимально активным при 1,25 мг/кг, $\Delta T/\Delta C$ 34% (не значимо в сравнении с контролем).

На основании этих результатов гуманизированные последовательности huMAb2-3-SPDB-DM4 и huMAb2-4-SPDB-DM4 пригодны для разработки терапевтических ADC. Из двух последовательностей лучшей являлась huMAb2-3-SPDB-DM4.

Таблица 20

Оценка противоопухолевой активности конъюгатов huMAb2-3-SPDB-DM4 и huMAb2-4-SPDB-DM4 и chMAb2-SPDB-DM4 против первичной аденокарциномы толстой кишки человека CR-IGR-034P у самок мышей CD-1

Средство ¹	Пуль/ Доза в мл/кг	Доза в мг/кг на инъекцию	Схема в сутках	Вызванная лекарственным средством гибель (сутки)	Среднее изменение массы тела в % на мышь в нижней точке (сутки)	Среднее $\Delta T/\Delta C$ в % (сутки)	Средний % регресса (сутки)	Регрессы		Биостатистическое значение p^2	Комментарии
								Частичный	Полный		
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	Высокоактивный
		5	19	0/6	-4,5 (D45)	12 (D32)	-	0/6	0/6	=0,0105	Активный
		2,5	19	0/6	-4,2 (D20)	36 (D32)	-	0/6	0/6	н.э.	Минимально активны
		1,25	19	0/6	-4,1 (D20)	42 (D32)	-	0/6	0/6	н.э.	Неактивный
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	Высокоактивный
		5	19	0/6	-3,3 (D20)	4 (D38)	-	0/6	0/6	<0,0001	Очень активный
		2,5	19	0/6	-5,4 (D45)	12 (D38)	-	0/6	0/6	= 0,0322	Активный
		1,25	19	0/6	-3,0 (D27)	34 (D38)	-	0/6	0/6	н.э.	Минимально активный
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	Очень активный
		5	19	0/6	-3,2 (D27)	17 (D32)	-	0/6	0/6	= 0,0417	Очень активный
		2,5	19	0/6	-3,4 (D20)	37 (D32)	-	0/6	0/6	н.э.	Минимально активный
		1,25	19	0/6	-2,8 (D27)	50 (D32)	-	0/6	0/6	н.э.	Неактивный
Контроль	-	-	19	-	-3,9 (D24)	-	-	-	-	-	-

¹: состав лекарственного средства: HGS (10 мМ гистидин, 130 мМ глицин, 5% об./об. сахара, 0,01% Tween80) pH7,4;

²: значение p: критерий Даннета в сравнении с контролем после 2-стороннего дисперсионного анализа с повторными измерениями преобразованных в ранги изменений объема опухолей от исходного уровня; н.э.: не значимо.

Пример 7.4. Эффективность in vivo против первичных опухолей желудка STO-IND-006, п./к. имплантированных самкам мышей SCID.

Материалы и методы.

Гуманизированный конъюгат huMAb2-3-SPDB-DM4 оценивали на 3 уровнях дозирования против измеримых первичных опухолей желудка STO-IND-00 6, п./к. имплантированных самкам мышей SCID. Контрольные группы оставляли без обработки. Дозы конъюгатов приведены в мг/кг. Их вводили в дозах 10, 5 и 2,5 мг/кг посредством внутривенной (в/в) болюсной инъекции на сутки 27 после имплантации опухоли.

Оценку токсичности и эффективности проводили, как описано в примере 5.

Результаты.

При использовании схемы с одним введением в дозах 2,5, 5 и 10 мг/кг, huMAb2-3-SPDB-DM4 не индуцирует токсичности.

Как представлено на фиг. 6 и в табл. 21, huMAb2-3-SPDB-DM4 был очень активным при 10 мг/кг с $\Delta T/\Delta C$ 7% ($p < 0,0001$ в сравнении с контролем), активным при 5 мг/кг с $\Delta T/\Delta C$ 36% ($p = 0,0281$ в сравнении с контролем) и неактивным при 2,5 мг/кг.

Таблица 21

Оценка противоопухолевой активности конъюгатов huMAb2-3-SPDB-DM4 против первичной аденокарциномы желудка человека STO-IND-006 у самок мышей SCID

Средство ¹	Путь/ Доза в мг/кг	Доза в мг/кг на инъекцию	Схема в сутках	Вызванная лекарственным средством гибель (сутки)	Среднее изменение массы тела в % на мышшь в нижней точке (сутки нижней точки)	Среднее $\Delta T/\Delta C$ в % (сутки)	Средний % регресса (сутки)	Регрессы		Вместостатическое значение r^2	Комментарии
								Частичный	Полный		
huMAb2-3-SPDB-DM4	в/в (10 мг/кг)	10	27	0/6	-10,5 (D45)	7 (D34)	-	0/6	0/6	<0,0001	Очень активный
		5	27	0/6	-8,4 (D45)	36 (D45)	-	0/6	0/6	=0,0281	Активный
		2,5	27	0/6	-5,8 (D45)	50 (D38)	-	0/6	0/6	н.э.	Неактивный
Контроль	-	-	27	-	-2,5 (D38)	-	-	-	-	-	-

¹: состав лекарственного средства: HGS (10 мМ гистидин, 130 мМ глицин, 5% об./об. сахара, 0,01% Tween80) pH7,4;

²: значение r : критерий Даннета в сравнении с контролем после 2-стороннего дисперсионного анализа с повторными измерениями преобразованных в ранги изменений объема опухолей от исходного уровня;

н.э.: не значимо.

Пример 7.5. Эффективность *in vivo* против первичных опухолей легких LUN-NIC-0014, п./к. имплантированных самкам мышей SCID.

Материалы и методы.

Гуманизированный конъюгат huMAb2-3-SPDB-DM4 оценивали на 3 уровнях дозирования в отношении измеримых первичных опухолей легких LUN-NIC-0014, п./к. имплантированных самкам мышей SCID. Контрольные группы оставляли без обработки. Дозы конъюгатов приведены в мг/кг. Его вводили в дозах 10, 5 и 2,5 мг/кг посредством внутривенной (в/в) болюсной инъекции на сутки 29 после имплантации опухоли.

Оценку токсичности и эффективности проводили, как описано в примере 5.

Результаты.

При использовании схемы с одним введением в дозах 2,5, 5 и 10 мг/кг, huMAb2-3-SPDB-DM4 не индуцировал токсичности.

Как представлено на фиг. 18 и в табл. 22, huMAb2-3-SPDB-DM4 был высокоактивным при 10 и 5 мг/кг с $\Delta T/\Delta C$ меньше 0% ($p < 0,0001$ в сравнении с контролем) и регрессом опухоли 67 и 57% соответственно, и активным при 2,5 мг/кг с $\Delta T/\Delta C$ 12% ($p = 0,0363$ в сравнении с контролем).

Таблица 22

Оценка противоопухолевой активности конъюгата huMAb2-3-SPDB-DM4 против первичной аденокарциномы легких человека LUN-NIC-0014 у самок мышей SCID

Средство ¹	Путь/ Доза в мг/кг	Доза в мг/кг на инъекцию	Схема в сутках	Вызванная лекарственным средством гибель (сутки)	Среднее изменение массы тела в % на мышь в нижней точке (сутки нижней точки)	Среднее ΔТ/ΔС в % (сутки 42)	Средний % регресса (сутки 42)	Регрессы		Биостатистическое значение p ²	Комментарии
								Частичный	Полный		
huMAb2-3-SPDB-DM4	в/в (10 мл/кг)	10	29	0/6	+1,7 (D32)	<0	67	5/6	1/6	<0,0001	Высокоактивный
		5	29	0/6	-1,1 (D36)	<0	57	4/6	0/6	<0,0001	Высокоактивный
		2,5	29	0/6	+0,5 (D32)	12 (D39)	-	0/6	0/6	0,0363 (D39)	Активный
Контроль	-	-	-	-	+0,1 (D34)	-	-	-	-	-	-

¹: состав лекарственного средства: HGS (10 мМ гистидин, 130 мМ глицин, 5% об./об. сахара, 0,01% Tween80) pH 7,4;

²: значение p: критерий Даннета в сравнении с контролем после 2-стороннего дисперсионного анализа с повторными измерениями преобразованных в ранги изменений объема опухолей от исходного уровня.

Пример 1.6. Эффективность *in vivo* против первичных опухолей толстого кишечника CR-IGR-034P, п./к. имплантированных самкам мышей SCID.

Материалы и методы.

Оценивали три конъюгата, состоящие из гуманизированного huMAb2-3, конъюгированного с DM4 посредством двух различных линкеров (SPDB и сульфо-SPDB), на 2 уровнях дозирования в отношении измеримых первичных опухолей толстого кишечника CR-IGR-034P, п./к. имплантированных самкам мышей SCID. Контрольные группы оставляли без обработки. Дозы конъюгатов приведены в мг/кг. Их вводили в дозах 5 и 2,5 мг/кг посредством внутривенной (в/в) болюсной инъекции на сутки 19 после имплантации опухоли.

Оценку токсичности и эффективности проводили, как описано в примере 5.

Результаты.

При использовании схемы с одним введением в дозах 2,5 и 5 мг/кг, huMAb2-3-SPDB-DM4 и huMAb2-3-сульфо-SPDB-DM4 не индуцировал токсичности.

Как представлено на фиг. 19 и в табл. 23, huMAb2-3-SPDB-DM4 был активным при 5 и 2,5 мг/кг с ΔТ/ΔС 12% и 40%, соответственно (p<0,0001 в сравнении с контролем), huMAb2-3-сульфо-SPDB-DM4 был высокоактивным при 5 мг/кг с ΔТ/ΔС менее 0% (p<0,0001 в сравнении с контролем) и регрессом опухоли 12% и активным при 2,5 мг/кг с ΔТ/ΔС 1% (p<0,0001 в сравнении с контролем).

Таблица 23

Оценка противоопухолевой активности конъюгатов huMAb2-3-SPDB-DM4 и huMAb2-3-сульфо-SPDB-DM4 против первичной аденокарциномы толстой кишки человека CR-IGR-034P у самок мышей SCID

Средство ¹	Путь/ Доза в мг/кг	Доза в мг/кг на инъекцию	Схема в сутках	Вызванная лекарственным средством гибель (сутки)	Среднее изменение массы тела в % на мышь в нижней точке (сутки нижней точки)	Среднее ΔТ/ΔС в % (сутки 34)	Средний % регресса (сутки 34)	Регрессы		Биостатистическое значение p ²	Комментарии
								Частичный	Полный		
huMAb2-3-SPDB-DM4	в/в (10 мл/кг)	5	19	0/6	+1,6 (D20)	12	-	0/6	0/6	<0,0001	Активный
		2,5	19	0/6	-1,5 (D38)	40	-	0/6	0/6	<0,0001	Минимально активны
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	Высокоактивный
		2,5	19	0/6	+0,7 (D20)	11	-	0/6	0/6	<0,0001	Активный
		2,5	19	0/6	+2,5 (D20)	66	-	0/6	0/6	0,0306	Неактивный
Контроль	-	-	-	-	+0,5 (D34)	-	-	-	-	-	-

¹: состав лекарственного средства: HGS (10 мМ гистидин, 130 мМ глицин, 5% об./об. сахара, 0,01% Tween80) pH7,4;

²: значение p: критерий Даннета в сравнении с контролем после 2-стороннего дисперсионного анализа с повторными измерениями преобразованных в ранги изменений объема опухолей от исходного уровня.

Пример 8. Разработка иммуногистохимического (ИНС) протокола, предназначенного для детекции белка CEACAM5 человека и обезьяны в фиксированных в формалине и погруженных в парафин (FFPE) тканях.

Материалы и методы.

Ткани.

В качестве источника тканей человека (опухолевых и неопухолевых), а также яванского макака (нормальных) использовали микропанели тканей FFPE (ТМА, табл. 24).

Таблица 24

Микропанели фиксированных в формалине и погруженных в парафин тканей, используемые в качестве источника тканей

Ссылка	Поставщик	Описание
ASM221	Pantomics	Обезьяна Суно, 22 органа, 22 образца
CyFDA	US Biomax	Микропанель нормальных тканей обезьяны Суно, 33 органа, взято у 6 нормальных индивидуумов (99 образцов)
COC1501	Pantomics	Панель тканей рака толстого кишечника, 150 образцов нормальных/доброкачественных (5 образцов) и злокачественных (70 образцов) тканей
COC1502	Pantomics	Панель тканей рака толстого кишечника, 150 образцов нормальных/доброкачественных (5 образцов) и злокачественных (70 образцов) тканей
COC1503	Pantomics	Панель тканей рака толстого кишечника, 150 образцов нормальных/доброкачественных (5 образцов) и злокачественных (70 образцов) тканей

MTU951	Pantomics	40 типов опухолей содержащих доброкачественные, злокачественные и метастатические образцы из 27 анатомических участков
LUC1501	Pantomics	Панель тканей рака легких, 150 образцов нормальных/доброкачественных (5 образцов) и злокачественных (70 образцов) тканей
LUC1502	Pantomics	Панель тканей рака легких, 150 образцов нормальных/доброкачественных (5 образцов) и злокачественных (70 образцов) тканей
LUC1503	Pantomics	Панель тканей рака легких, 150 образцов нормальных/доброкачественных (5 образцов) и злокачественных (70 образцов) тканей
MNO961	Pantomics	35 типов нормальных тканей на основе рекомендации FDA для тестирования перекрестной реактивности антител.
MNO661	Pantomics	33 типа нормальных тканей на основе рекомендации FDA для тестирования перекрестной реактивности антител.
MNO341	Pantomics	33 типа нормальных тканей на основе рекомендации FDA для тестирования перекрестной реактивности антител.
PAC481	Pantomics	Панель тканей рака поджелудочной железы содержит 20 образцов злокачественных опухолей и 4 образца нормальных и незлокачественных тканей поджелудочной железы

CC4	Superbiochips	Панель из 59 образцов, содержащая 59 образцов рака легких
A218 (III)	Ассумах	Панель тканей рака пищевода содержит 40 образцов опухолей и 8 не являющихся неоплазией образцов
A219 (II)	Ассумах	панель тканей злокачественных опухолей головы и шеи содержит 45 образцов опухолей и 8 не являющихся неоплазией образцов
A213 (II)	Ассумах	панель тканей злокачественных опухолей яичника содержит 43 образцов опухолей и 8 не являющихся неоплазией образцов
A301 (IV)	Ассумах	Панель тканей различных злокачественных опухолей с соответствующими нормальными тканями (30 образцов злокачественных опухолей, 30 не являющихся неоплазией образцов)
A103 (V)	Ассумах	Панель различных нормальных тканей в двух повторениях (45 образцов)
MAN2	Superbiochips	Панель из 59 образцов, содержащая 9 или 10 нормальных образцов желудка, пищевода, легких, колоректальных тканей, щитовидной железы и почек
MA2	Superbiochips	Панель из 59 образцов, содержащая 9 или 10 образцов рака желудка, пищевода, легких, колоректального рака, рака щитовидной железы и почек
MBN4	Superbiochips	Панель из 59 образцов, содержащая 9 или 10 нормальных образцов молочной железы, печени, мочевого пузыря, яичника, поджелудочной железы, предстательной железы

MB4	Superbiochips	Панель из 59 образцов, содержащая 9 или 10 образцов молочной железы, печени, мочевого пузыря, яичника, поджелудочной железы, рака предстательной железы
MCN4	Superbiochips	Панель из 59 образцов, содержащая 9 или 10 нормальных образцов эндометрия, желчного пузыря, гортани, шейки матки, кожи
MC4	Superbiochips	Панель из 59 образцов, содержащая 9 или 10 образцов рака эндометрия, желчного пузыря, гортани, шейки матки, лимфомы, меланомы
CJ1	Superbiochips	Панель из 59 образцов, содержащая 59 образцов рака яичника
CDN3	Superbiochips	Панель из 59 образцов, содержащая 59 образцов нормальной толстой кишки и прямой кишки
CCN2	Superbiochips	Панель из 59 образцов, содержащая 59 образцов нормального легкого (соответствующая CC4)
BB5	Superbiochips	60 образцов различных типов злокачественных опухолей от 30 человек
AA9	Superbiochips	Панель из 59 образцов, содержащая 59 образцов нормальных органов
TMAhu3a	Asterand	Панель тканей различных злокачественных опухолей (76 образцов)
STC1501	Pantomics	Панель тканей рака желудка, 150 образцов, содержащая 75 образцов нормальных, реактивных и злокачественных тканей желудка

STC1502	Pantomics	Панель тканей рака желудка, 150 образцов, содержащая 75 образцов нормальных, реактивных и злокачественных тканей желудка
STC1503	Pantomics	Панель тканей рака желудка, 150 образцов, содержащая 75 образцов нормальных, реактивных и злокачественных тканей желудка
STC481	Pantomics	Панель тканей рака желудка, 16 образцов, 48 образцов, один нормальный парный с двумя образцами опухолевой ткани от каждого пациента

Антитела.

В качестве первичного моноклонального антитела мыши к CEACAM5 человека использовали MAb2. В качестве вторичного антитела использовали конъюгированные с биотином антитела козы к IgG1 мыши (специфичные к цепи $\gamma 1$) (ссылка 1070-08, партия L4309-X761, Southern Biotech, USA).

Иммуноокрашивание.

Применяли способ демаскировки антигена с использованием буфера Cell Conditioning 1 (CC1) при 95°C в течение 8 мин, и затем при 100°C в течение 28 мин. После стадии блокирования эндогенного биотина, стекла инкубировали с первичным антителом к антигену, разведенным в забуференном фосфатом солевом растворе (PBS) при 5 мкг/мл в течение 2 ч при 24°C. Вторичное антитело козы к антителам мыши, конъюгированное с биотином, инкубировали при 24°C в течение 32 мин при 0,5 мкг/мл. Иммуноокрашивание проводили с использованием тетрагидрохлорида 3,3-диаминобензидина (DAB) из набора хромогенной детекции DABMap™ (760-124, Ventana Medical Systems, Inc, USA) по рекомендациям производителя. Стадию контрастного окрашивания проводили с использованием гематоксилина (760-2037, Ventana Medical Systems, Inc, USA) и использовали реагент, придающий синюю окраску (760-2037, Ventana Medical Systems, Inc, USA). Окрашенные стекла подвергали дегидратации и покрывали цитосилом XYL (8312-4, Richard-Allan Scientific, USA).

ИНС классификация.

Иммуноокрашенные стекла сканировали с использованием системы ScanScope XT (Aperio Technologies, Vista, CA). С использованием программного обеспечения ImageScope (версия 10.2.2.2319, Aperio Technologies) получали оцифрованные изображения при увеличении x20.

Оценка окрашивания включала гистологический реакционноспособный участок, основной тип реакционноспособных клеток, интенсивность окрашивания и частоту окрашивания клеток. Отрицательные образцы классифицировали как 0+. Положительные образцы классифицировали по шкале интенсивности от 1+ до 4+. Диапазоны интенсивностей описывали как слабая [0;2+], умеренная [2+;3+] и сильная [3+;4+]. Частота окрашивания клеток представляла собой процент иммуноокрашенных клеток, и ее определял гистолог, наблюдая среднее для образца. Частоту окрашивания клеток классифицировали по 5 категориям пропорциональной шкалы: 1 (0-5%), 2 (6-25%), 3 (26-50%), 4 (51-75%) и 5 (76-100%).

Шкалу общей экспрессии для опухолей адаптировали из шкалы Оллреда (AS) (Mohsin S, Weiss H, Navighurst 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). Эту AS получали, добавляя интенсивность и пропорциональные шкалы с получением общей шкалы в диапазоне 0-9. AS выражали в виде процента от максимума на общей шкале и классифицировали на 5 категорий: очень низкое (0-25%), слабое (26-50%), умеренное (51-75%) и высокое (76-100%). Степень поражения определяли как процент от положительных случаев для показания.

Описательный статистический анализ.

Описательную статистику рассчитывали с использованием программного обеспечения Microsoft Excel 2003. Для каждого показания определяли количество случаев, количество положительных случаев, степень поражения, средний показатель интенсивности, среднюю частоту, средний показатель Оллреда, диапазон интенсивности, диапазон частоты и диапазон показателя Оллреда.

Пример 8.1. Использование моноклонального антитела к CEACAM5 для оценки белка CEACAM5 в FFPE опухолях человека посредством иммуногистохимии (ИНС).

Исследовали большую панель опухолей человека с использованием коммерческих стекол с па-

нелями тканей (формат FFPE). Экспрессию белка CEACAM5 наблюдали в мембране+цитоплазме опухолевых клеток (фиг. 1C, D). В более дифференцированных опухолях определенная доля окрашивания мембран поляризовалась на апикальном полюсе клеток. Выявлено, что белок CEACAM5 экспрессирован в

89% случаев аденокарциномы толстого кишечника (194/219, интенсивность 2-2,5+, частота 53-59%, AS 60-66%);

49% случаев аденокарциномы желудка (95/195, интенсивность 2,5+, частота 53%, AS 62%);

41% случаев аденокарциномы легких (24/58, интенсивность 1,8-2+, частота 50-53%, AS 54-58%);

7 9% случаев плоскоклеточной карциномы шейки матки (11/14, интенсивность 2+, частота 22%, AS 46%);

53% случаев аденокарциномы поджелудочной железы (18/34, интенсивность 2+, частота 23%, AS 42%);

37% случаев плоскоклеточной карциномы пищевода (23/62, интенсивность 2+, частота 16%, AS 38%);

4% случаев карциномы яичника (3/77, интенсивность 2+, частота 43%, AS 54%);

11% случаев карциномы щитовидной железы (2/18, интенсивность 1,5+, частота 63%, AS 56%);

25% случаев карциномы мочевого пузыря (5/20, интенсивность 1,5+, частота 61%, AS 56%);

7% случаев аденокарциномы эндометрия (1/14, интенсивность 2+, частота 50%, AS 56%);

11% случаев карциномы протоков молочной железы (2/18, интенсивность 1,5+, частота 53%, AS 50%);

53% случаев холангиокарциномы (2/6, интенсивность 1,5+, частота 75%, AS 50%);

53% случаев плоскоклеточной карциномы легких (31/148, интенсивность 1,5+, частота 22%, AS 39%);

8% случаев аденокарциномы предстательной железы (1/13, интенсивность 2+, частота 50%, AS 44%);

25% случаев плоскоклеточной карциномы кожи (2/8, интенсивность 1,5+, частота 23%, AS 39%).

Пример 8.2. Тканевая перекрестная реактивность моноклонального антитела к CEACAM5 у яванского макака (*Macaca fascicularis*) и сравнение с профилем экспрессии у человека.

Внеклеточный домен, происходящий из белка CEACAM5 человека (h) или яванского макака (c), получали посредством транзитной экспрессии в клетках эмбриональной почки человека HEK293 с использованием плазмиды с кДНК CEACAM5 (пример 1, табл. 1). Клеточные осадки фиксировали в 10% формалине (Sigma Aldrich, USA) в течение 16 ч и погружали в парафин в виде фрагмента ткани в соответствии со стандартной гистологической процедурой.

В качестве источника нормальных тканей человека и обезьяны использовали коммерческую ТМА (табл. 21).

Перекрестную реактивность MAb2 демонстрировали посредством иммуноокрашивания трансфицированных CEACAM5 человека и обезьяны клеток (с локализацией в мембране и в цитоплазме).

В нормальных тканях яванского макака экспрессия белка CEACAM5 выявлена в клетках всасывающего цилиндрического эпителия (2/3 положительных случаев, со средней интенсивностью 1,5+, со средней частотой 55%).

В неопухолевых тканях человека экспрессию CEACAM5 также наблюдали в клетках всасывающего цилиндрического эпителия (62/64 положительных случаев, средняя интенсивность 2+, средняя частота 90%). В тканях человека экспрессию CEACAM5 в меньшей степени наблюдали в эпителиальных клетках пищевода, эпителиальных клетках головы и шеи, эпителиальных клетках желудочной ямки и эпителиальных клетках шейки матки.

Пример 9. Конъюгат антитела с лекарственным средством (вариант).

huMAb2-3 к CEACAM5-сульфо-SPDB-DM4.

Аналитические данные:

M_w (Ab)=147417 г/моль; M_w (DM4)=780,38 г/моль;

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

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

При перемешивании, при КТ в сосуд добавляли 7,0 мл раствора huMAb2-3 к CEACAM5 (C=5,32 мг/мл в PBS pH 7,4 буфер) с последующим добавлением 1,6 мл DMA и 168,4 мкл раствора линкера нитро-сульфо-SPDB (описанного в WO 2009134977) (10 экв. - 15 мМ раствор в DMA). Раствор медленно перемешивали при КТ в течение 3 ч. Добавляли дополнительный объем 3,4 мкл раствора линкера нитро-сульфо-SPDB (2,0 экв. - 15 мМ раствор в DMA). Через 2 ч при КТ при перемешивании на магнитной мешалке последовательно добавляли 2,90 мл буфера PBS pH 7,4, 0,407 мл DMA и 0,322 мл раствора DM4 (15 мМ раствор в DMA). Через 1 ч при КТ и 16 ч при 5°C неочищенную реакционную смесь очищали на обессоливающей колонке HiPrep 26/10 (Sephadex G25, GE Healthcare), предварительно выдерживали с 1 CV 1M NaOH, 2 CV воды и 2 CV буфера из гистидина (10 мМ), глицин (130 мМ), сахароза (5%), pH 5,5. Конъюгат элюировали буфером из гистидина (10 мМ), глицин (130 мМ), сахарозы (5%), pH 5,5, и фракции мономерных конъюгатов объединяли и фильтровали на 0,22-мкм фильтре.

Таким образом, получали 19 мл конъюгата huMAb2-3 к CEACAM5-сульфо-SPDB-DM4 ($c=1,51$ мг/мл) в виде бесцветного прозрачного раствора. Затем конъюгат анализировали на конечную нагрузку лекарственного средства и чистоту мономеров: DAR (UV)=3,4; DAR (SEC)=3,3; чистота мономеров=99,8%; данные HRMS: см. фиг. 20.

huMAb2-3 к CEACAM5-SMCC-DM1.

Аналитические данные:

$M = (Ab) = 147417$ г/моль; $M_w (DM1) = 738$ г/моль;

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

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

При перемешивании, при КТ в сосуд добавляли 11,3 мл раствора huMAb2-3 к CEACAM5 ($C=3,47$ мг/мл в буфер А pH 6,5) с последующим добавлением 0,387 мл DMA и 178 мкл раствора линкера SMCC (10 экв. - 15 mM раствор в DMA). Раствор медленно перемешивали при КТ в течение 2 ч. В неочищенной реакционной смеси заменяли буфер на обессоливающую колонку HiPrep 26/10 (Sephadex G25, GE Healthcare), предварительно выдерживали с 2 CV 0,2M NaOH, 5 CV воды и 5 CV цитратного буфера (pH 5,5). Конъюгат элюировали цитратным буфером (pH 5,5) и фракции мономерных конъюгатов объединяли и фильтровали на 0,22-мкм фильтре. К полученному раствору, при перемешивании, при КТ последовательно добавляли 0,476 мл DMA и 0,124 мл раствора DM1 (15 mM раствор в DMA). Через 2 ч при КТ неочищенную реакционную смесь дважды очищали на обессоливающей колонке HiPrep 26/10 (Sephadex G25, GE Healthcare), предварительно выдерживали с 2CV NaOH 0,2M, 5 CV воды и 5 CV буфера из гистидина (10 mM), глицина (130 mM), сахарозы (5%), pH 5,5. Конъюгат элюировали буфером из гистидина (10 mM), глицина (130 mM), сахарозы (5%), pH 5,5, и фракции мономерных конъюгатов объединяли, фильтровали на 0,22-мкм фильтре.

Таким образом, получали 9,5 мл конъюгата huMAb2-3 к CEACAM5-SMCC-DM1 ($c=1,73$ мг/мл) в виде бесцветного прозрачного раствора. Затем конъюгат анализировали на конечную нагрузку лекарственного средства и чистоту мономеров: DAR (UV)=2,7; DAR (SEC)=2,9; чистота мономеров=99,6%; данные HRMS: см. фиг. 21.

Пример 10. Характеристика эпитопа и паратопа CEACAM5-A3B3 в комплексе с Fab VH1aVL1c MAb2 с использованием замены водород-дейтерий в ассоциации с масс-спектрометрией (HDX MS).

Пример 10.1. Принцип HDX MS.

Замена водород-дейтерий в амидах (HDX) в ассоциации с масс-спектрометрией (MS) обеспечивает идентификацию областей белков, которые полагают участвующими в конформационных изменениях или взаимодействиях. Более конкретно, этот способ обеспечивает идентификацию областей антигена, демонстрирующих после инкубации в дейтерированном буфере и протеолиза, снижение включения дейтерия в его форме, связанной с антителом по сравнению с его свободной формой.

Эпитоп принадлежит к тем областям, замена в которых замедляется связыванием с антителом. В вышедшей недавно статье подробно описаны различные стадии с характеристикой эпитопов с использованием этого подхода (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).

Пример 10.2. Материалы.

Кодирующие вариабельные домены последовательности MAb2_VH1aVL1c (SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 29) клонировали в экспрессирующий вектор млекопитающих в слиянии с кодирующими последовательностями домена CH1 человека (как обнаружено в полученных из расщепленного папаином IgG1 Fab) с последующей гексагистидиновой меткой или с константным доменом Скаппа человека, соответственно. Получали партию Fab MAb2_VH1aVL1c в культивируемых в суспензии клетках HEK293-FSTM посредством транзиторной трансфекции двумя экспрессирующими плазмидами, кодирующими две цепи, в комплексе с 293fectinTM (Invitrogen). Через семь суток после трансфекции собирали супернатант культуры, содержащий секретлируемый белок, центрифугировали и фильтровали на 0,22 мкм мембране. Fab очищали посредством аффинной хроматографии на IMAC (HisTrap, GE Healthcare) с использованием градиента имидазола в PBS. Затем объединенные фракции, содержащие Fab, очищали эксклюзионной хроматографией (Superdex 200, GE Healthcare), уравновешенной PBS.

Получали меченный His домен A3B3 hCEACAM5 (SEQ ID NO: 67) с использованием культивируемых в колбе клеток HEK293-FSTM посредством транзиторной трансфекции экспрессирующей плазмиды. Каждые сутки добавляли кифунензин (ингибитор процесса, обусловленного расщеплением гликозилирования). Супернатант культуры, содержащий секретлируемый белок собирали через семь суток после трансфекции, центрифугировали и фильтровали на 0,22-мкм мембране. В супернатант добавляли EndoN до 625 мк/мл, затем 3 ч инкубировали при 37°C. Дегликозилированный hCEACAM5-A3B3 очищали аффинной хроматографией на IMAC (HisTrap, GE Healthcare) с использованием градиента имидазола в PBS. Затем объединенные фракции, содержащие дегликозилированный hCEACAM5-A3B3, очищали эксклюзионной хроматографией (Superdex 200, GE Healthcare), уравновешенной PBS. Масс-спектрометрический анализ дегликозилированного hCEACAM5-A3B3 продемонстрировал две молекулы (22485 и 22278 Да), что указывает на то, что белок несет 7

или 8 остатков N-ацетилглюкозамина (GlcNAc).

Для получения комплекса, оба белка объединяли с избытком в 1,5 моль дегликозилированного hCEACAM5-A3B3 на один моль Fab. Этот избыток удаляли эксклюзионной хроматографией на Superdex 200, уравновешенной забуференным фосфатом соевым раствором. Фракции соответствующие Fab с антигеном, использовали для исследования обмена дейтерия.

Пример 10.3. Методы.

Эксперименты обмена водорода/дейтерия (HDX) были полностью автоматизированы с использованием автодозатора PAL (CTC Analytics). Он обеспечивал старт и гашение обмена, контроль температуры протеолиза (4°C), инъекцию дейтерированных пептидов, управление клапанами для инъекции и промывки, и запуск сбора данных масс-спектрометром и насосов ВЭЖХ. Охлаждаемый посредством эффекта Пельтье бокс (4°C), содержал два автоматических клапана впуска (6-портовый для инъекции и 10-портовый для отмывки), обессоливающий картридж (пептидную микроловушку из Bruker-Michrom) и колонке ВЭЖХ (Poroshell 120 EC-C18, 1×50 мм, 2,7 мкм из Agilent Technologies). Дейтерирование начинали посредством 5-кратного разведения CEACAM5, mAb или комплекса PBS в D₂O. Для гашения обратного обмена и восстановления дисульфидных мостиков в течение 2 мин при 4°C использовали 2 M GndHCl, 0,8M TCEP, 1 M глицин.

Белки расщепляли протеазами пепсином и непентезином, и пептиды обессоливали с использованием насоса ВЭЖХ Agilent Technologies с TFA 0,03% в воде при 100 мкл/мин. Затем пептиды разделяли с использованием другого насоса ВЭЖХ Agilent Technologies в 15-100% градиенте В в 20 мин (А: TFA 0,03% в воде; В: ацетонитрил 90%, TFA 0,03% в воде). Массы пептидов измеряли с использованием масс-спектрометра с электрораспылением-TOF (Agilent 6210).

Пептиды идентифицировали посредством tandemной MS (MCMC) с использованием Bruker APEX-Q FTMS (9,4 T) и Bruker 12 T Solarix.

Для получения данных использовали программное обеспечение Data Analysis (Bruker) и Mass Hunter (Agilent Technologies). Для обработки данных MCMC использовали Data Analysis и Mascot (Matrix Science). Для обработки данных HDX использовали программное обеспечение Mass Hunter и HD Examiner (Sierra Analytics).

Эксперименты HDX повторяли по меньшей мере три раза.

Пример 10.4. Результаты.

Идентификация и отбор пептидов.

При дейтерировании дисульфидные мостики оставляли интактными для сохранения связанной с ними структурной информации. Для предпочтения протеолиза и идентификации пептидов мостики восстанавливали TCEP после стадии гашения при низком pH и низкой температуре. Используя MCMC после расщепления комплекса CEACAM5-Fab, было возможно идентифицировать большое количество пептидов, полученных из этих трех белковых цепей. После экспериментов HDX выбирали только эксперименты, дающие хорошее качество сигнала: 25, 30 и 20 пептидов из антигена CEACAM5-A3-B3, тяжелой цепи Fab MAb2_VH1aVL1c и легкой цепи MAb2_VH1aVL1c, соответственно. Эти пептиды перекрывают 89%, 77% и 68% последовательностей антигена CEACAM5-A3-B3, тяжелой цепи Fab MAb2_VH1aVL1c и легкой цепи MAb2_VH1aVL1c, соответственно (табл. 25). Неперекрываемые области цепей Fab в основном находились в их C-концевых частях.

Таблица 25

Перекрытие последовательности дейтерированными пептидами	
Пептиды	Перекрытие последовательностей
СЕАСАМ5-А3-В3	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
Тяжелая цепь 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
Легкая цепь 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

Все 8 остатков аспарагина, которые являются потенциальными участками гликозилирования, были идентифицированы в нескольких пептидах с GlcNAc, оставшимся после эндо-Н-дегликозилирования. В частности, N114 обнаружен в пептиде 108-115. В первых экспериментах (не использовавшихся для HDX), N166 обнаружен в обеих формах (с GlcNAc и без GlcNAc). Это может объяснять гетерогенность, наблюдаемую при масс-спектрометрии СЕАСАМ5-А3В3 после дегликозилирования, соответствующую 7 и 8 GlcNAc.

Идентификация эпитопа и паратопа.

Свободный антиген, свободный Fab и их комплекс подвергали дейтерированию в течение 2 мин или 20 мин при 4°C или 20 мин при комнатной температуре (26°C). Учитывая зависимость кинетики обмена атомов водорода амидов от температуры (приблизительно 3-кратное возрастание обмена с увеличением на 10°C), последнее условие эквивалентно 200 мин дейтерирования при 4°C.

Эпитоп.

Сравнивали кинетику включения дейтерия у 25 отобранных пептидов СЕАСАМ5-А3В3, когда антиген был дейтерирован в свободной форме и когда он находился в комплексе с Fab. Несколько пептидов не продемонстрировали какого-либо значимого различия в HDX (Δ HDX) в обоих состояниях. В отличие от этого некоторые из них (108-115 и 128-143) продемонстрировали значимую Δ HDX. Вторую область перекрывали 5 различных пептидов: 128-142, 128-143, 130-142, 130-143 и 140-143, демонстрирующих через 2 мин дейтерирования Δ HDX $13-15 \pm 2\%$ (до $1,6 \pm 0,2$ D).

Сравнивая 128-142 с 130-142 и 128-143 с 130-143 авторы в каждом случае не обнаружили какого-либо значимого изменения Δ HDX (1,3-1,4 D для первых двух пептидов и 1,6 для последних двух через 2 мин дейтерирования), что означает, что амиды W129 и R130, вероятно, не входят в эпитоп. В отличие от этого, сравнение 128-142 с 128-143 и 130-142 с 130-143, авторы обнаружили небольшое изменение Δ HDX (приблизительно 0,2 D), что означает, что амид F143 является вовлеченным. Δ HDX в пептиде 140-143 (приблизительно 0,3 D) означает, что амиды V141 или L142 также могут быть вовлеченными. Из 9 амидов от I131 до Q140, некоторые из них вовлечены в эпитоп (в среднем приблизительно разделяли 1 Δ HDX).

Эти различия во включении дейтерия указывают на то, что эпитоп находится в конкретных областях (амидах), т.е. в пептидах с последовательностями SGANLNL (SEQ ID NO: 76) и INGI-PQQHTQVLV (SEQ ID NO: 77).

Паратоп.

Кинетика включения дейтерия у 30 отобранных пептидов тяжелой цепи Fab сравнивали, когда Fab был дейтерирован в свободной форме и когда он находился в комплексе с антигеном. Почти все пептиды не демонстрировали каких-либо значимых Δ HDX в обоих состояниях. Только один пептид (100-109) через 200 мин дейтерирования продемонстрировал Δ HDX: $11 \pm 2\%$ ($0,7 \pm 0,2$ D). Область (амиды) 101-109 тяжелой цепи Fab MAb2_VH1aVL1c вовлечена в паратоп.

Кинетика включения дейтерия для 20 отобранных пептидов легкой цепи Fab сравнивали, когда Fab был дейтерирован в свободной форме и когда он находился в комплексе с антигеном. Почти все пептиды не демонстрировали каких-либо значимых Δ HDX в обоих состояниях. Только два пептида

(47-54 и 87-104) демонстрировали различие. Через 20 мин дейтерирования оно составляло $10 \pm 2\%$ ($0,6 \pm 0,2$ D) для первого пептида и $5 \pm 2\%$ ($0,9 \pm 0,2$ D) для второго пептида, соответственно. Области 48-54 и 88-104 легкой цепи MAб2_VH1aVL1c вовлечены в паратоп.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения выделенного антитела или его фрагмента, которое связывается с доменом A3-B3 белков молекулы клеточной адгезии, связанной с карциноэмбриональным антигеном 5 (CEACAM5) человека и *Macaca fascicularis*, и которое содержит:

а) CDR1-H с последовательностью SEQ ID NO: 1 или с последовательностью, которая отличается от SEQ ID NO: 1 одной консервативной аминокислотной заменой;

CDR2-H с последовательностью SEQ ID NO: 2 или с последовательностью, которая отличается от SEQ ID NO: 2 одной консервативной аминокислотной заменой;

CDR3-H с последовательностью SEQ ID NO: 3 или с последовательностью, которая отличается от SEQ ID NO: 3 одной консервативной аминокислотной заменой;

CDR1-L с последовательностью SEQ ID NO: 4 или с последовательностью, которая отличается от SEQ ID NO: 4 одной консервативной аминокислотной заменой;

CDR2-L с последовательностью SAS или с последовательностью, которая отличается от SAS одной консервативной аминокислотной заменой; и

CDR3-L с последовательностью SEQ ID NO: 6 или с последовательностью, которая отличается от SEQ ID NO: 6 одной консервативной аминокислотной заменой; или

б) CDR1-H с последовательностью SEQ ID NO: 13 или с последовательностью, которая отличается от SEQ ID NO: 13 одной консервативной аминокислотной заменой;

CDR2-H с последовательностью SEQ ID NO: 14 или с последовательностью, которая отличается от SEQ ID NO: 14 одной консервативной аминокислотной заменой;

CDR3-H с последовательностью SEQ ID NO: 15 или с последовательностью, которая отличается от SEQ ID NO: 15 одной консервативной аминокислотной заменой;

CDR1-L с последовательностью SEQ ID NO: 16 или с последовательностью, которая отличается от SEQ ID NO: 16 одной консервативной аминокислотной заменой;

CDR2-L с последовательностью SAS или с последовательностью, которая отличается от SAS одной консервативной аминокислотной заменой; и

CDR3-L с последовательностью SEQ ID NO: 18 или с последовательностью, которая отличается от SEQ ID NO: 18 одной консервативной аминокислотной заменой,

где способ включает стадии, состоящие из:

(i) культивирования клетки-хозяина, трансформированной выделенной нуклеиновой кислотой, содержащей последовательность, кодирующую указанное антитело или указанный фрагмент;

(ii) экспрессии указанного антитела или указанного фрагмента и

(iii) выделения экспрессированного антитела или указанного фрагмента.

2. Способ получения выделенного антитела или его фрагмента, которое связывается с доменом A3-B3 белков CEACAM5 человека и *Macaca fascicularis* и содержит:

а) CDR1-H с последовательностью SEQ ID NO: 7 или с последовательностью, которая отличается от SEQ ID NO: 7 одной консервативной аминокислотной заменой;

CDR2-H с последовательностью SEQ ID NO: 8 или с последовательностью, которая отличается от SEQ ID NO: 8 одной консервативной аминокислотной заменой;

CDR3-H с последовательностью SEQ ID NO: 9 или с последовательностью, которая отличается от SEQ ID NO: 9 одной консервативной аминокислотной заменой;

CDR1-L с последовательностью SEQ ID NO: 10 или с последовательностью, которая отличается от SEQ ID NO: 10 одной консервативной аминокислотной заменой;

CDR2-L с последовательностью NTK или NTR или с последовательностью, которая отличается от NTK или NTR одной консервативной аминокислотной заменой; и

CDR3-L с последовательностью SEQ ID NO: 12 или с последовательностью, которая отличается от SEQ ID NO: 12 одной консервативной аминокислотной заменой; или

б) CDR1-H с последовательностью SEQ ID NO: 19 или с последовательностью, которая отличается от SEQ ID NO: 19 одной консервативной аминокислотной заменой;

CDR2-H с последовательностью SEQ ID NO: 20 или с последовательностью, которая отличается от SEQ ID NO: 20 одной консервативной аминокислотной заменой;

CDR3-H с последовательностью SEQ ID NO: 21 или с последовательностью, которая отличается от SEQ ID NO: 21 одной консервативной аминокислотной заменой;

CDR1-L с последовательностью SEQ ID NO: 22 или с последовательностью, которая отличается от SEQ ID NO: 22 одной консервативной аминокислотной заменой;

CDR2-L с последовательностью NAK или с последовательностью, которая отличается от NAK одной консервативной аминокислотной заменой; и

CDR3-L с последовательностью SEQ ID NO: 24 или с последовательностью, которая отличается от SEQ ID NO: 24 одной консервативной аминокислотной заменой; или

с) CDR1-H с последовательностью SEQ ID NO: 25 или с последовательностью, которая отличается от SEQ ID NO: 25 одной консервативной аминокислотной заменой;

CDR2-H с последовательностью SEQ ID NO: 26 или с последовательностью, которая отличается от SEQ ID NO: 26 одной консервативной аминокислотной заменой;

CDR3-H с последовательностью SEQ ID NO: 27 или с последовательностью, которая отличается от SEQ ID NO: 27 одной консервативной аминокислотной заменой;

CDR1-L с последовательностью SEQ ID NO: 28 или с последовательностью, которая отличается от SEQ ID NO: 28 одной консервативной аминокислотной заменой;

CDR2-L с последовательностью NAK или с последовательностью, отличающейся от NAK одной консервативной аминокислотной заменой; и

CDR3-L с последовательностью SEQ ID NO: 30 или последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 30 одной консервативной аминокислотной заменой,

где способ включает стадии, состоящие из:

(i) культивирования клетки-хозяина, трансформированной выделенной нуклеиновой кислотой, содержащей последовательность, кодирующую указанное антитело или указанный фрагмент;

(ii) экспрессии указанного антитела или указанного фрагмента и

(iii) выделения экспрессированного антитела или указанного фрагмента.

3. Способ по п.1 или 2, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент:

а) связывается с доменом А3-В3 белков CEACAM5 человека и *Macaca fascicularis* и

б) не дает значительной перекрестной реакции с CEACAM1 человека, CEACAM6 человека, CEACAM7 человека, CEACAM8 человека, CEACAM1 *Macaca fascicularis*, CEACAM6 *Macaca fascicularis* и CEACAM8 *Macaca fascicularis*, содержит вариабельные области тяжелой и легкой цепей антитела, выбранного из группы, состоящей из:

а) антитела, содержащего вариабельный домен тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 31 и вариабельный домен легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 32;

б) антитела, содержащего вариабельный домен тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 33 и вариабельный домен легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 34;

с) антитела, содержащего вариабельный домен тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 33 и вариабельный домен легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 34, в котором К в положении 52 заменен на R;

д) антитела, содержащего вариабельный домен тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 35 и вариабельный домен легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 36;

е) антитела, содержащего вариабельный домен тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 37 и вариабельный домен легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 38; и

ф) антитела, содержащего вариабельный домен тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 39 и вариабельный домен легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 40.

4. Способ по любому из пп.1-3, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с доменом А3-В3 CEACAM5 человека и *Macaca fascicularis*:

а) с отношением аффинности CEACAM5 человека к аффинности к CEACAM5 *Macaca fascicularis*, которое составляет ≤ 12 ; или

б) с аффинностью CEACAM5 человека и/или CEACAM5 *Macaca fascicularis*, которая составляет ≤ 10 нМ, или

с) с соотношением аффинности CEACAM5 человека к аффинности CEACAM5 *Macaca fascicularis*, которое составляет ≤ 12 , и аффинностью CEACAM5 человека и/или CEACAM5 *Macaca fascicularis*, которое составляет ≤ 10 нМ.

5. Способ по любому из пп.1-3, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с двумя областями домена А3-В3 белка CEACAM5 человека, которые содержат последовательности SEQ ID NO: 76 и SEQ ID NO: 77 соответственно.

6. Способ по любому из пп.1, 2, 4 и 5, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

а) вариабельный домен тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 31 или с последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей, и вариабельный домен легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 32, или с последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей; или

б) вариабельный домен тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 33 или с последовательностью, которая по крайней мере на 85% идентична ей, и вариабельный домен легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 34 или с последовательностью, которая по крайней мере на 85% идентична ей; или

с) вариабельный домен тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 35 или с последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей, и вариабельный домен легкой цепи с

последовательностью SEQ ID NO: 36 или с последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей; или

d) переменный домен тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 37 или с последовательностью, которая по крайней мере на 85% идентична ей, и переменный домен легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 38 или с последовательностью, которая по крайней мере на 85% идентична ей; или

e) переменный домен тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 39 или с последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей, и переменный домен легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 40, или с последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей.

7. Способ по любому из пп.1-6, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой химерное или гуманизованное антитело.

8. Способ по любому из пп.1-7, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело, содержащее:

a) тяжелую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 41 и легкую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 42; или

b) тяжелую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 43 и легкую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 44; или

c) тяжелую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 45 и легкую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 46; или

d) тяжелую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 47 и легкую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 48; или

e) тяжелую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 49 и легкую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 50.

9. Способ по любому из пп.2 и 4-7, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

a) переменный домен тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 74; и

b) переменный домен легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 55 или SEQ ID NO: 75.

10. Способ по пп.2, 4-7 и 9, где указанное антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит:

a) переменный домен тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 51 и переменный домен легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 17; или

b) переменный домен тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 5 и переменный домен легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 23; или

c) переменный домен тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 5 и переменный домен легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 29; или

d) переменный домен тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 51 и переменный домен легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 55; или

e) переменный домен тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 74 и переменный домен легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 75.

11. Способ получения выделенного антитела или его фрагмента, которое связывается с доменом A3-B3 белков CEACAM5 человека и *Macaca fascicularis* и содержит:

a) тяжелую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 87 или с последовательностью, которая по крайней мере на 85% идентична ей, содержащей:

a) CDR1-H с последовательностью SEQ ID NO: 7 или последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 7 одной консервативной аминокислотной заменой;

CDR2-H с последовательностью SEQ ID NO: 8 или последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 8 одной консервативной аминокислотной заменой; и

CDR3-H с последовательностью SEQ ID NO: 9 или последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 9 одной консервативной аминокислотной заменой; и

b) легкую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 88 или с последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей,

содержащую CDR1-L с последовательностью SEQ ID NO: 10 или последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 10 одной консервативной аминокислотной заменой;

CDR2-L с последовательностью NTK или NTR или последовательностью, отличающейся от NTK или NTR одной консервативной аминокислотной заменой; и

CDR3-L с последовательностью SEQ ID NO: 12 или последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 12 одной консервативной аминокислотной заменой,

где способ включает стадии, состоящие из:

(i) культивирования клетки-хозяина, трансформированной выделенной нуклеиновой кислотой, содержащей последовательность, кодирующую указанное антитело или указанный фрагмент;

- (ii) экспрессии указанного антитела или указанного фрагмента и
- (iii) выделения экспрессированного антитела или указанного фрагмента.

12. Способ по любому из пп.1-11, где указанное антитело является биспецифическим или мультиспецифическим антителом.

13. Способ по любому из пп.1-12, где указанный антигенсвязывающий фрагмент представляет собой фрагмент, выбранный из группы, состоящей из Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, (dsFv)₂, scFv, sc(Fv)₂ и диател.

14. Способ по любому из пп.1-12, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент подходящим образом выделяют из культуральной среды с помощью обычных процедур очистки иммуноглобулинов.

15. Способ получения иммуноконъюгата, содержащего антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, полученного способом по любому из пп.1-14, и по меньшей мере один агент, ингибирующий рост опухолевых клеток, где указанный способ включает стадии:

(i) приведения в контакт водного раствора антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, полученного способом по любому из пп.1-14, с растворами линкера и указанного агента, ингибирующего рост опухолевых клеток.

16. Способ получения иммуноконъюгата по п.15, где водный раствор со стадии (i) является забуференным.

17. Способ получения иммуноконъюгата по п.15 или 16, где указанный способ также содержит стадию (ii) отделения конъюгата, который образовался на стадии (i), от непрореагировавшего антитела.

18. Способ получения иммуноконъюгата по п.15 или 16, где после стадии (i) раствор, содержащий конъюгат, может быть подвергнут дополнительной стадии (iii), где проводят хроматографию, ультрафильтрацию и/или диафильтрацию.

19. Способ получения иммуноконъюгата по п.17, где после стадии (ii) раствор, содержащий конъюгат, может быть подвергнут дополнительной стадии (iii), где проводят хроматографию, ультрафильтрацию и/или диафильтрацию.

20. Способ получения иммуноконъюгата по любому из пп.15-19, где указанный агент, ингибирующий рост, представляет собой цитотоксический агент или радиоактивный изотоп.

21. Способ получения иммуноконъюгата по любому из пп.15-20, где указанный ингибирующий рост агент выбран из группы, состоящей из химиотерапевтических агентов, ферментов, антибиотиков и токсинов, таких как низкомолекулярные токсины или ферментативно активные токсины, таксоиды, алкалоиды барвинка, майтанзиноид или аналоги майтанзиноида, томамицин или производные пирролобензодиазепина, производные криптофицина, производные лептопицина, ауристин или аналоги доластатина, пролекарства, ингибиторы топоизомеразы II, ДНК-алкилирующие средства, антитубулиновые средства, СС-1065 или аналог СС-1065.

22. Способ получения иммуноконъюгата по любому из пп.15-21, где указанный ингибирующий рост агент представляет собой (N²'-деацетил-N²'-(3-меркапто-1-оксопропил)майтанзин) DM1 или N²'-деацетил-N²'-(4-метил-4-меркапто-1-оксопентил)майтансин (DM4).

23. Способ получения иммуноконъюгата по любому из пп.15-22, где антитело ковалентно присоединено по меньшей мере к одному агенту, ингибирующему рост опухолевых клеток, через расщепляемый или нерасщепляемый линкер.

24. Способ получения иммуноконъюгата по любому из пп.15-23, где указанный линкер выбран из группы, состоящей из N-сукцинимидилпиридилдितिобутирата (SPDB), 4-(пиридин-2-илдисульфанил)-2-сульфомасяной кислоты (сульфо-SPDB) и сукцинимидил(N-малеимидо-метил)циклогексан-1-карбоксилата (SMCC).

25. Способ получения иммуноконъюгата по любому из пп.15-24, где антитело содержит переменную область тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 5 и переменную область легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 29.

26. Способ получения иммуноконъюгата по любому из пп.15-25, где иммуноконъюгат характеризуется значением коэффициента лекарственное средство-антитело (DAR) в диапазоне от 1 до 10.

27. Способ получения иммуноконъюгата по любому из пп.15-26, где иммуноконъюгат содержит антитело, которое связывается с доменом А3-В3 белков CEACAM5 человека и Macaca fascicularis, и содержит

CDR1-H с последовательностью SEQ ID NO: 7,

CDR2-H с последовательностью SEQ ID NO: 8,

CDR3-H с последовательностью SEQ ID NO: 9,

CDR1-L с последовательностью SEQ ID NO: 10,

CDR2-L с последовательностью NTR и

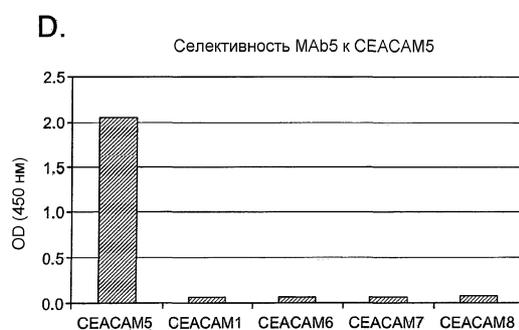
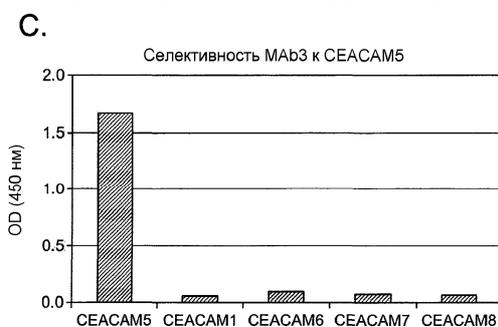
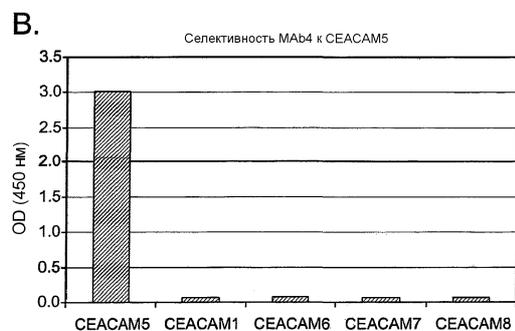
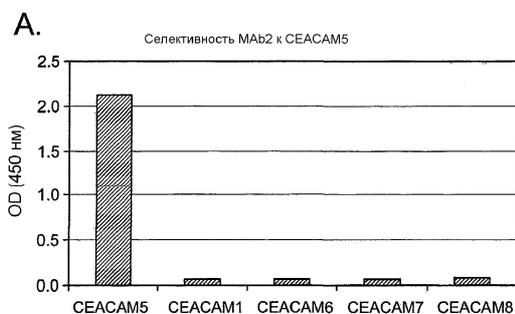
CDR3-L с последовательностью SEQ ID NO: 12,

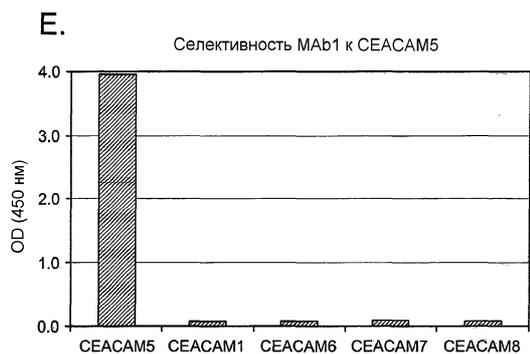
где антитело ковалентно связано через N-сукцинимидилпиридилдितिобутират (SPDB) с N²'-деацетил-N²'-(4-метил-4-меркапто-1-оксопентил)майтанзином (DM4).

28. Способ получения иммуноконъюгата по любому из пп.15-27, где указанное антитело содержит

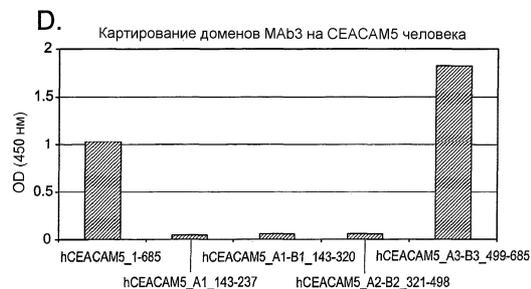
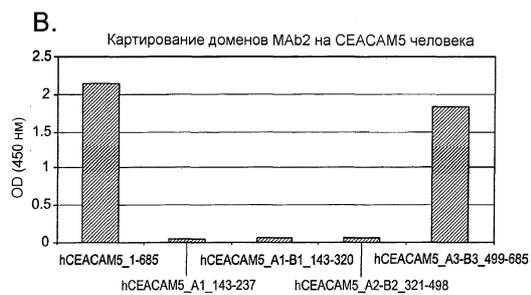
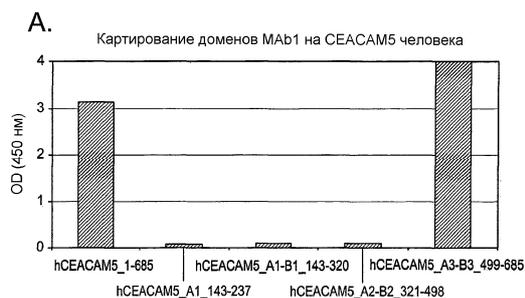
тяжелую цепь, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 87; и легкую цепь, состоящую из последовательности SEQ ID NO: 88.

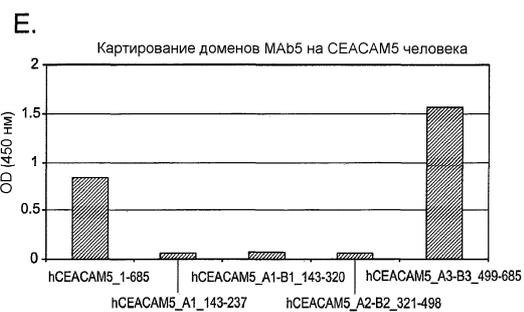
29. Способ получения фармацевтической композиции, содержащей антитело, полученное способом по любому из пп.1-14, или иммуноконъюгат, полученный способом по любому из пп.15-28, где эффективное количество указанного антитела или указанного иммуноконъюгата растворяют или диспергируют в фармацевтически приемлемом носителе или водной среде.



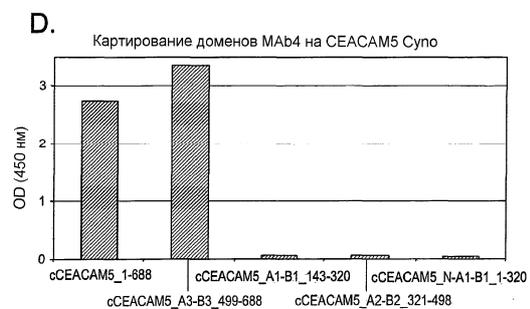
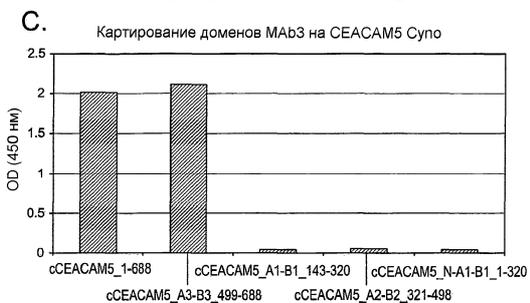
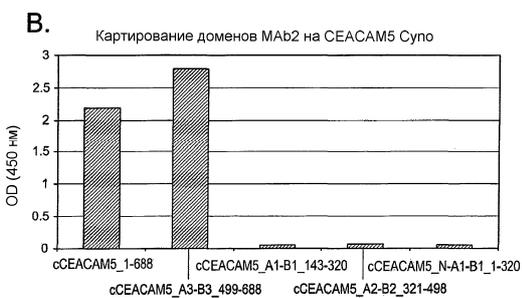
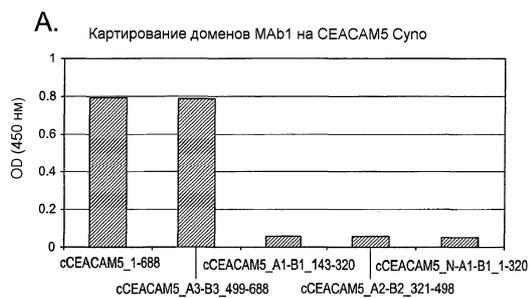


Фиг. 1

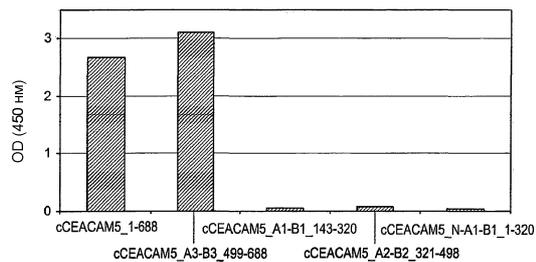




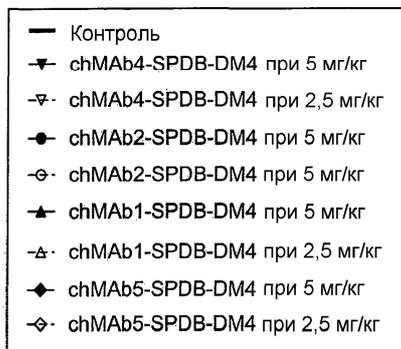
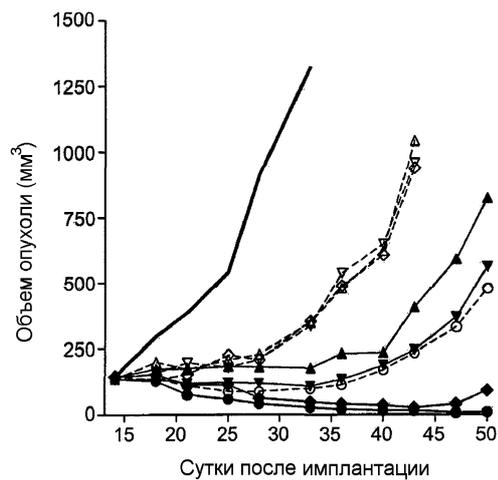
Фиг. 2



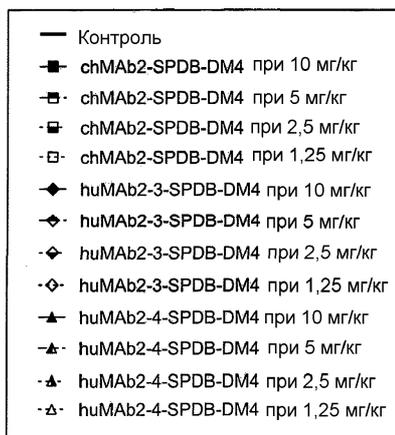
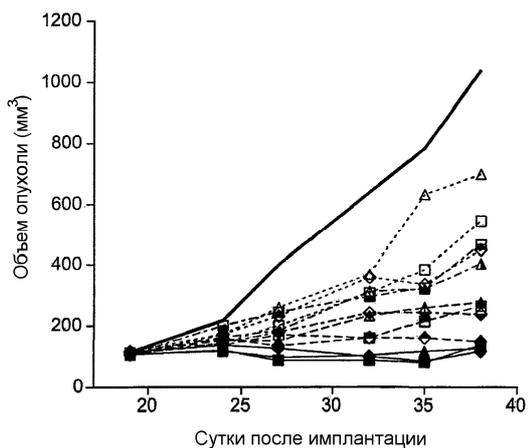
Е. Картирование доменов МАб5 на СЕАСАМ5 Суно



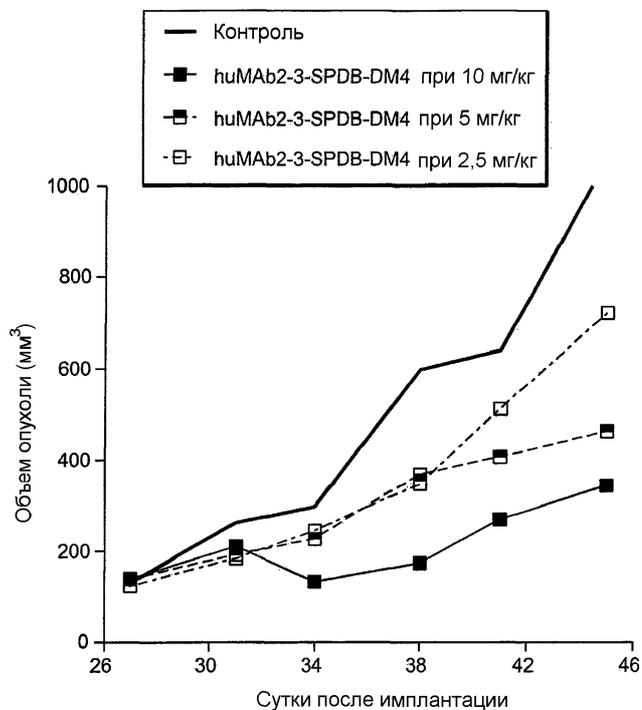
Фиг. 3



Фиг. 4



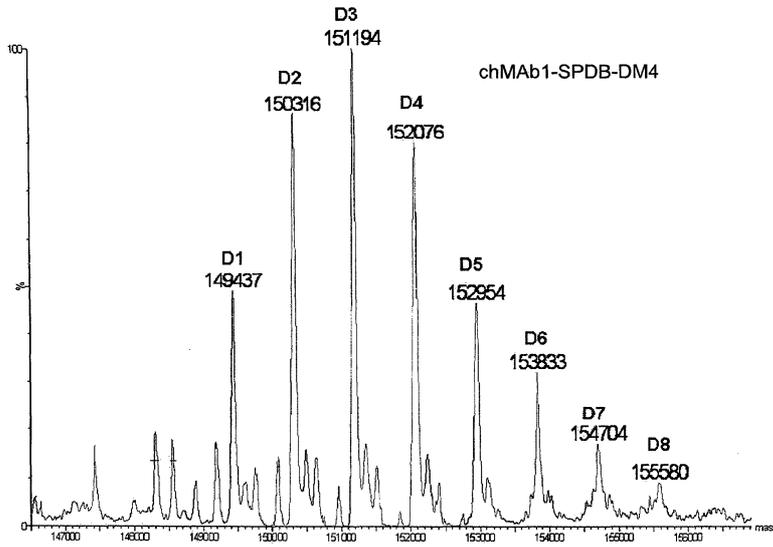
Фиг. 5



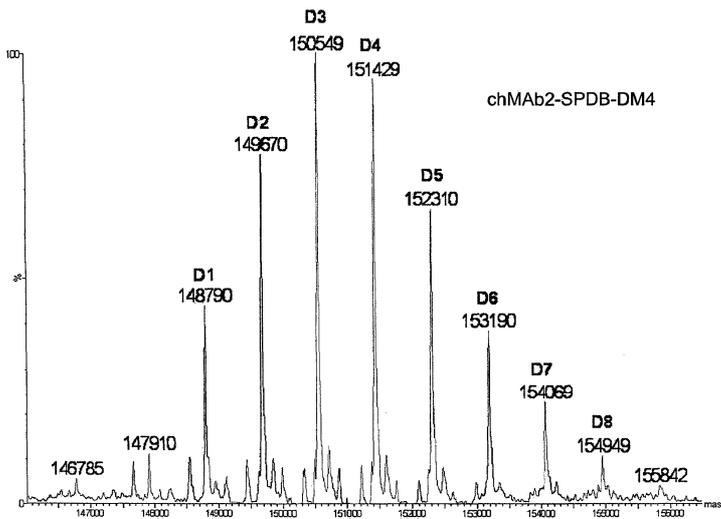
Фиг. 6

Mab3 VH	(1)	EVKLVESGGGLVKPGGSLTLP	CAAS	GF	FTFS	RYAMSWVRQTPEKRLEWVASI	SSGG -DTYY
Mab1 VH	(1)	EVMLVESGGGLVKPGGSLKLS	CAAS	GF	FTFS	SYAMSWVRQTPEKRLEWVAFI	SSGG SYIYY
Mab4 VH	(1)	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLS	CAAS	GF	FTSS	YDMSWVRQTPEKRLEWVAFI	SS YGGRTYY
Mab5 VH	(1)	ELQLVESGGVLVKPGGSLKLS	CAAS	GF	AFSS	YDMSWVRQTPEKRLEWVYI	INS GGGITYY
Mab2 VH	(1)	EVQLQESGGVLVKPGGSLKLS	CAAS	GF	VFSS	YDMSWVRQTPEKRLEWVAI	SS GGGITYY
Mab3 VH	(60)	PDSVKGRFTVSRDNARNILFL	QMSSL	RS	EDT	GMYYCARV	NY YD SS FLDWN
Mab1 VH	(61)	LDSVKGRFTISRDNAKNTLYL	QMSSL	RS	EDT	AMYYCAR	P AYY GN P AM DYWG
Mab4 VH	(67)	ADTVKGRFTISRDNAKNTLYL	QMSSL	KS	EDT	AMFYC	AA HY FG T SG PFAYWG
Mab5 VH	(61)	PDTVKGRFTISRDNARNTLYL	QMSSL	KS	EDT	AIYYC	TA HY FG SS GP F AYWG
Mab2 VH	(61)	PDTVQGRFTVSRDNAKNTLYL	QMNSL	KS	EDT	AIYYC	AA HY FG SS GP F AYWG
Mab3 VH	(1)	DIVMTQSQRFMSTLEGRVSVT	CKAS	Q	N	V	G T N V A W Y Q Q K P G Q S P K A L I Y S A S Y R Y S G V P D
Mab1 VH	(1)	DILMTQSQKFMSTVSGDRVSVT	CKAS	Q	N	V	G T N V A W Y Q Q K P G Q S P K L I Y S A S Y R Y S G V P D
Mab4 VH	(1)	DIQMTQSPASLSASVGETVIT	CRAS	E	N	I	S Y F A W Y Q Q K G S P Q L L V Y N A K L A E G V P S
Mab5 VH	(1)	DIQMTQSPASLSASVGETVIT	CRAS	E	N	I	S Y L A W Y Q Q K G S P Q L L V Y N A K L T E G V P S
Mab2 VH	(1)	DIQMTQSPASLSASVGETVIT	CRAS	E	N	I	F S Y L A W Y Q Q K G S P Q L L V N T K L A E G V P S

Фиг. 7

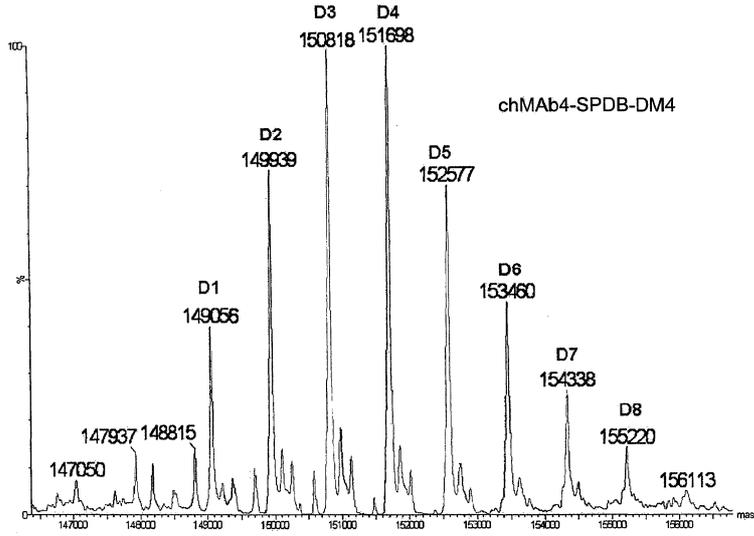


Фиг. 8

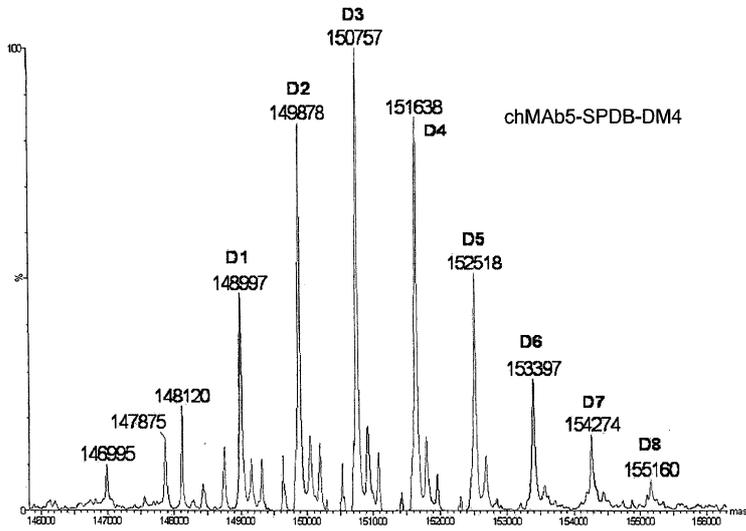


Фиг. 9

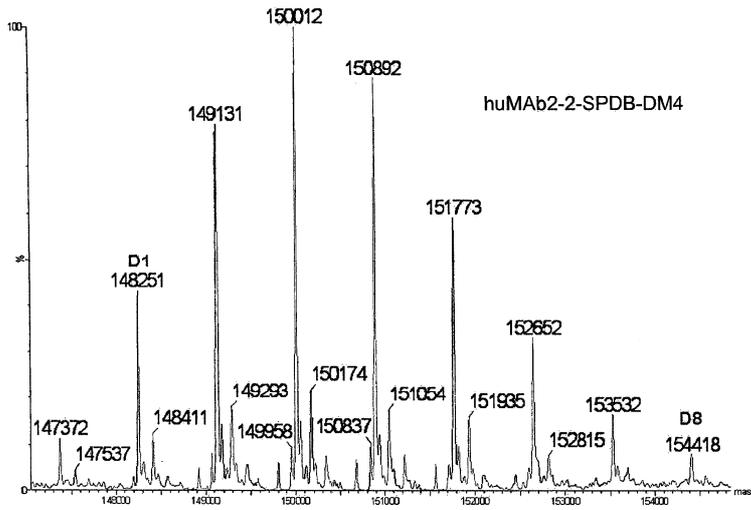
047681



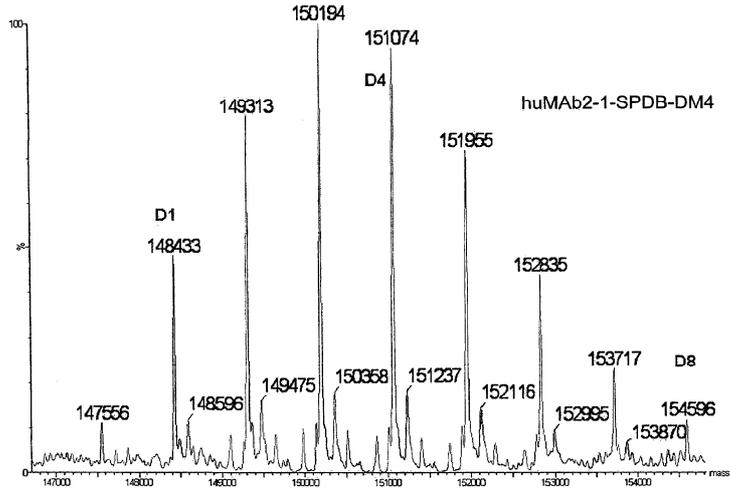
Фиг. 10



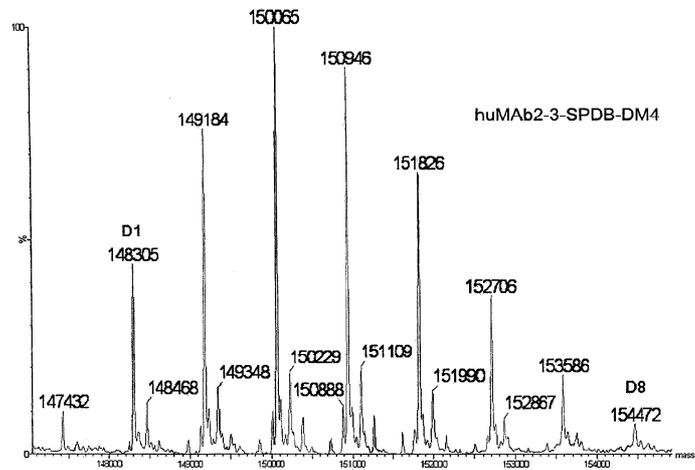
Фиг. 11



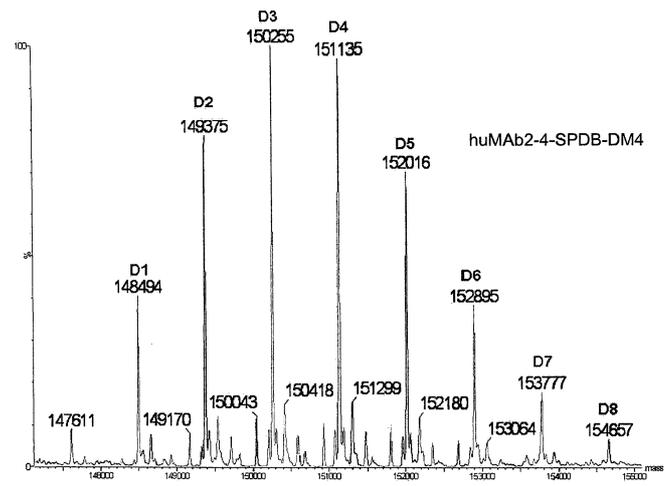
Фиг. 12



Фиг. 13



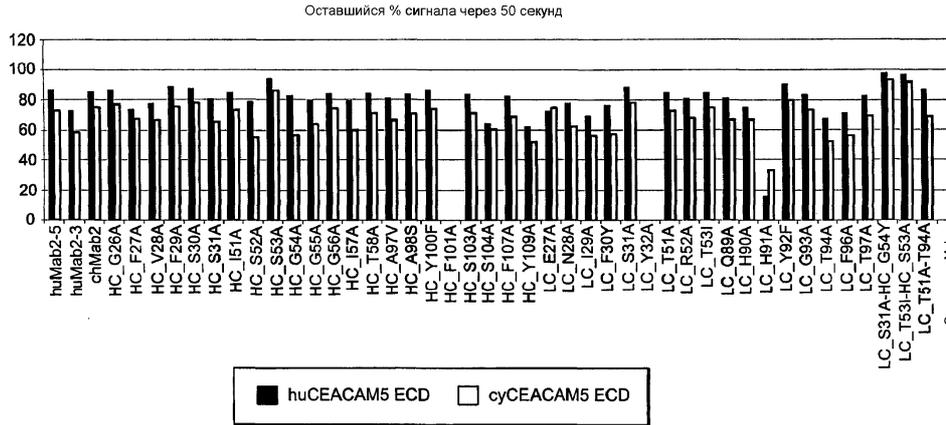
Фиг. 14



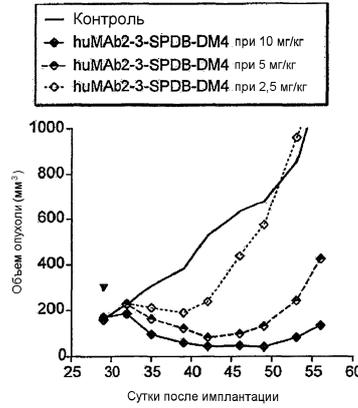
Фиг. 15



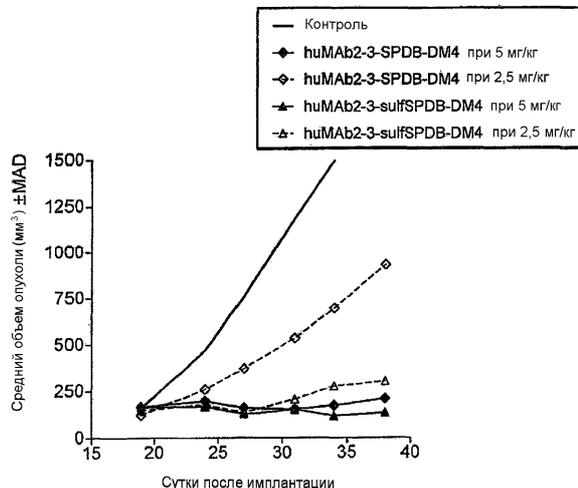
Фиг. 16



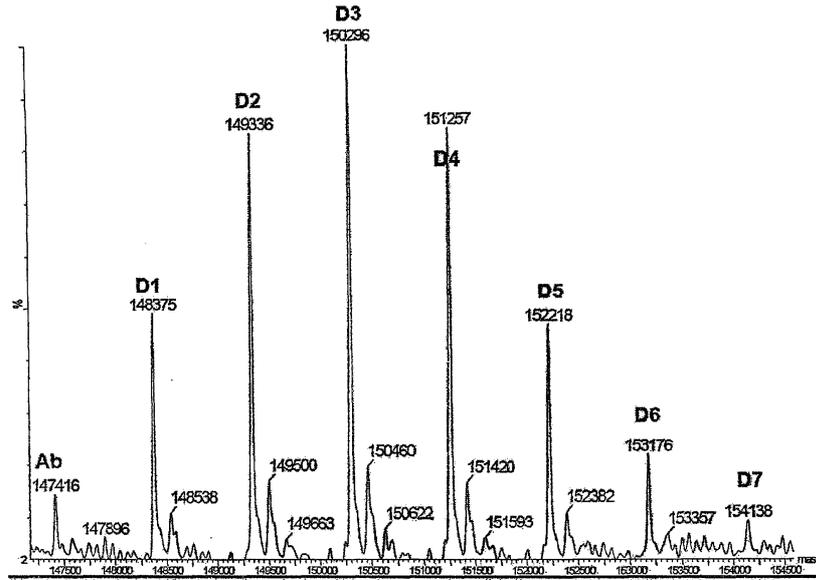
Фиг. 17



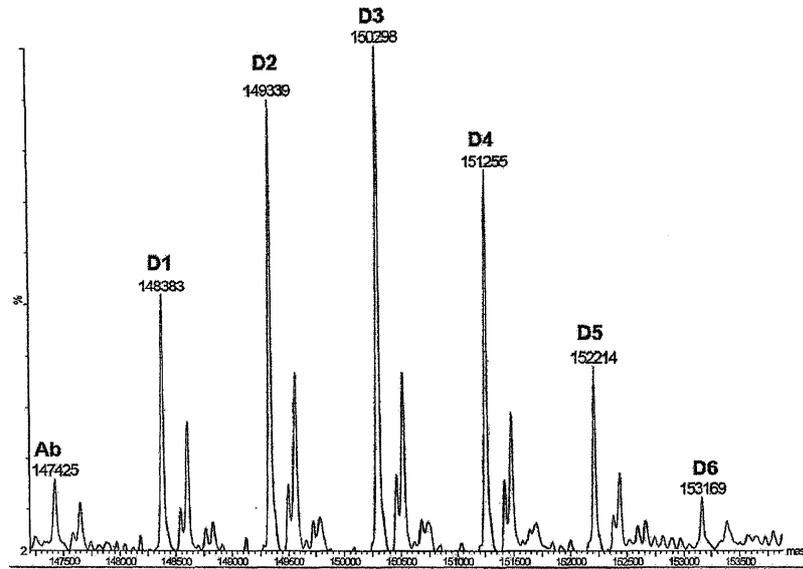
Фиг. 18



Фиг. 19



Фиг. 20



Фиг. 21

Выравнивание переменных доменов тяжелых цепей

Mab2	SEQ ID NO: 33	(1)	EVQLQESGGVLVPGGSLKLSCAAS	GFVFS SD	MSWRQTPEKRLIEWAY	ISSGGG IT	YF (60)
Mab4	SEQ ID NO: 37	(1)	EVQLVESGGGLVPGGSLKLSCAAS	GFVFS SD	MSWRQTPEKRLIEWAF	ISSYGG RT	YY (60)
Mab5	SEQ ID NO: 39	(1)	ELQLVESGGVLVPGGSLKLSCAAS	GFVFS SD	MSWRQTPEKRLIEWVY	INSGGG IT	YY (60)
Гуманиз. VH1a	SEQ ID NO: 5	(1)	EVQLQESGGFLVPGGSLKLSCAAS	GFVFS SD	MSWRQTPEKRLIEWAY	INSGGG IT	YA (60)
Гуманиз. VH1	SEQ ID NO: 51	(1)	EVQLQESGGFLVPGGSLKLSCAAS	GFVFS SD	MSWRQTPEKRLIEWAY	INSGGG IT	YF (60)
Гуманиз. VHg2	SEQ ID NO: 74	(1)	EVQLVESGGGLVPGGSLRISCAAS	GFVFS SYD	MSWRQAPKPKLEWVSY	ISGGGG IT	YY (60)

Mab2	SEQ ID NO: 33	(61)	PDIVQGRFTVSRDNRKNTLYLQMSLKSEDTAIYYC	AAHYFGSSG PFAY	WQGGILMTVSA	(126)
Mab4	SEQ ID NO: 37	(61)	ADTVKGRFTISRDNARNTLYLQMSLKSEDTAMFYC	AAHYFGT SGPFAY	WQGGILMTVSA	(126)
Mab5	SEQ ID NO: 39	(61)	PDIVKGRFTISRDNARNTLYLQMSLKSEDTAIYYC	TAHYFGSSG PFAY	WQGGILMTVSA	(126)
Гуманиз. VH1a	SEQ ID NO: 5	(61)	PSTVKGRTVSRDNRKNTLYLQMSLTSSEDTAVYYC	AAHYFGSSG PFAY	WQGGILMTVSS	(126)
Гуманиз. VH1	SEQ ID NO: 51	(61)	PSTVKGRTVSRDNRKNTLYLQMSLTSSEDTAIYYC	AAHYFGSSG PFAY	WQGGILMTVSA	(126)
Гуманиз. VHg2	SEQ ID NO: 74	(61)	ADSVKGRFTISRDNARNTLYLQMSLRAEDTAVYYC	AAHYFGSSG PFAY	WQGGILMTVSS	(126)

In : Положения в CDR, допускающие любую замену
 In : Положения в CDR, допускающие только консервативную замену
 In : Положения в CDR, не допускающие никаких замен

Фиг. 22

Выравнивание переменных доменов легких цепей

Mab2	SEQ ID NO: 34	(1) DIQMTQSPASLSASVGETVITTCRAS	ENLPSY LAWYQQKQKSPQLLVY	NIK TLAEGVPS (60)
Mab4	SEQ ID NO: 38	(1) DIQMTQSPASLSASVGETVITTCRAS	ENLYSY FAWYQQKQKSPQLLVY	NAK TLAEGVPS (60)
Mab5	SEQ ID NO: 40	(1) DIQMTQSPASLSASVGETVITTCRAS	ENLYSY LAWYQQKQKSPQLLVY	NAK TLAEGVPS (60)
Гуманиз. VL1	SEQ ID NO: 17	(1) DIQMTQSPASLSASVGDVITTCRAS	ENLPSY LAWYQQKPKSPKLLVY	NIK TLAEGVPS (60)
Гуманиз. VL1a	SEQ ID NO: 23	(1) DIQMTQSPASLSASVGDVITTCRAS	ENLPSY LAWYQQKPKSPKLLVY	NIK TLAEGVPS (60)
Гуманиз. VL1c	SEQ ID NO: 29	(1) DIQMTQSPASLSASVGDVITTCRAS	ENLPSY LAWYQQKPKSPKLLVY	NIK TLAEGVPS (60)
Гуманиз. VL1d	SEQ ID NO: 55	(1) DIQMTQSPASLSASVGDVITTCRAS	ENLPSY LAWYQQKPKSPKLLVY	NIK TLAEGVPS (60)
Гуманиз. VLg5	SEQ ID NO: 75	(1) DIQMTQSPASSLSASVGDVITTCRAS	ENLPSY LAWYQQKPKGKPKLLVY	NIK TLQSGVPS (60)
Mab2	SEQ ID NO: 34	(61) RFSGSGSGTQFSLKINSLOPEDFGSYC	QHNYGTFPT FSGGTKLEIK (107)	
Mab4	SEQ ID NO: 38	(61) RFSGSGSGTQFSLKINSLOPEDFGIYC	QHNYGLPFT FSGGTKLEIK (107)	
Mab5	SEQ ID NO: 40	(61) RFSGSGSGTQFSLKINSLOPEDFGSYC	QHNYGTFPT FSGGTKLEIK (107)	
Гуманиз. VL1	SEQ ID NO: 17	(61) RFSGSGSGTQFSLTISSLOPEDFGSYC	QHNYGTFPT FSGGTKLEIK (107)	
Гуманиз. VL1a	SEQ ID NO: 23	(61) RFSGSGSGTDFSLTISSLOPEDFATYC	QHNYGTFPT FSGGTKLEIK (107)	
Гуманиз. VL1c	SEQ ID NO: 29	(61) RFSGSGSGTDFSLTISSLOPEDFATYC	QHNYGTFPT FSGGTKLEIK (107)	
Гуманиз. VL1d	SEQ ID NO: 55	(61) RFSGSGSGTQFSLTISSLOPEDFGSYC	QHNYGTFPT FSGGTKLEIK (107)	
Гуманиз. VLg5	SEQ ID NO: 75	(61) RFSGSGSGTDFSLTISSLOPEDFATYC	QHNYGTFPT FSGGTKLEIK (107)	

In : Положения в CDR, допускающие любую замену
 In : Положения в CDR, допускающие только консервативную замену
 In : Положения в CDR, не допускающие никаких замен

Фиг. 23

