

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037613**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.04.21

(21) Номер заявки
201692148

(22) Дата подачи заявки
2015.04.27

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)

(54) ГУМАНИЗИРОВАННЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ СЕАСАМ1

(31) 61/984,786; 62/099,155

(32) 2014.04.27; 2015.01.01

(33) US

(43) 2017.03.31

(86) PCT/IL2015/050433

(87) WO 2015/166484 2015.11.05

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ФЭЙМУЭЙВ ЛТД. (IL)

(72) Изобретатель:
**Бен-Моше Техила, Сапир Яр, Мендел
Илана, Маркел Гал, Шахтер Якоб,
Ортенберг Рона (IL), Карр Френсис
Джозеф, Холгейт Роберт Джордж Э.,
Джонс Тимоти Дэвид (GB)**

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

(56) WO-A1-2013054320
D2: Almagro, J.C., & Fransson, J. (2008).
Humanization of antibodies. *Frontiers in Bioscience*,
Vol. 13, pages 1619-1633. 01 Jan 2008 (2008/01/01)
pages 1619-1625, especially fig. 5

WO-A2-2014055967

WO-A1-2013082366

WO-A1-2015075710

WO-A1-2015075725

WO-A1-2015101996

(57) Предложены гуманизированные антитела, способные к специфическому связыванию с молекулами СЕАСАМ1 человека. Также предложены фармацевтические композиции, содержащие эти антитела, а также способы их применения для лечения и диагностики злокачественной опухоли и других состояний.

B1

037613

037613

B1

Область изобретения

Настоящее изобретение относится в основном к гуманизированным антителам, способным специфически связываться с молекулами CEACAM человека. Более конкретно, настоящее изобретение относится к антителам против CEACAM1, содержащим CDR, происходящие из мыши, и гуманизированные области тяжелой и легкой цепей с определенными обратными мутациями.

Уровень техники, к которому относится изобретение

Родственная карциноэмбриональному антигену молекула клеточной адгезии 1 (CEACAM1), также известная как белок кластера дифференцировки 66а (CD66а), является представителем семейства генов карциноэмбрионального антигена (CEA) и принадлежит суперсемейству иммуноглобулинов (Ig). Уровень CEACAM1 повышается в Т- и NK-клетках при активации, и его гомофильные взаимодействия приводят к ингибированию цитотоксического эффекта лимфоцитов. Исследования нескольких типов опухолей человека показали, что использование каскада CEACAM1 может обеспечить иммунное ускользание опухоли. Доклинические модели опухолей на животных показали, что блокада взаимодействий CEACAM1 моноклональными антителами (mAb) может усилить иммунный ответ на опухоли. Согласно оценке, в США в 2013 г. наблюдали 1660290 новых случаев злокачественной опухоли и 580350 связанных со злокачественной опухолью смертей.

Было показано, что иммунотерапевтическая блокада точки контроля является перспективным новым направлением лечения злокачественной опухоли. Каскады иммунной точки контроля состоят из диапазона костимулирующих и ингибиторных молекул, которые действуют согласованно для поддержания аутоотолерантности и защиты тканей от повреждения иммунной системой в физиологических условиях. Опухоли пользуются определенными каскадами точки контроля для ускользания от иммунной системы. Таким образом, ингибирование таких каскадов стало перспективной стратегией лечения злокачественной опухоли (Pardoll, D.M., 2012, Nat Rev Cancer, 12, 252-264). Противоопухолевая иммунотерапия посредством блокады CEACAM1 в принципе не ограничивается каким-либо одним типом опухоли, а может иметь активность усиления терапевтического иммунного ответа на ряд гистологически различающихся опухолей.

Антитело против цитотоксических Т-лимфоцитов 4 (CTLA-4) ипилимумаб (одобренное в 2011 г.) было первым иммунотерапевтическим средством, которое продемонстрировало пользу при лечении пациентов со злокачественной опухолью (Robert et al., 2011, N. Engl. J. Med., Vol. 364, pages 2517-2526). Антитело препятствует ингибиторным сигналам в ходе представления антигена Т-клеткам. Антитело против белка запрограммированной клеточной смерти 1 (PD-1) пембролизумаб (одобренное в 2014 г.) блокирует отрицательную иммунную регуляторную передачу сигнала рецептора PD-1, экспрессируемого Т-клетками (Hamid, 2013, N. Engl. J. Med., Vol. 2, pages 134-144). Антитела, блокирующие ось PD-1/PL-L1, продемонстрировали перспективные результаты в нескольких испытаниях у пациентов с различными типами опухолей (Dolan and Gupta 2014, Cancer Control, Vol. 21, pages 231-237). В 2014 г. для одобрения контролируемых органов было предоставлено дополнительное средство против PD-1 для лечения немелкоклеточного рака легкого (NSCLC). В настоящее время в активном исследовании исследуют многие другие иммунные точки контроля, среди которых ген активации лимфоцитов 3 (LAG3), CD137, OX40 (также обозначаемый как CD134), и иммуноглобулинподобные рецепторы киллерных клеток (KIR) (Gelao et al., 2014, Toxins, Vol. 6, pages 914-933).

Гуманизированные антитела представляют собой антитела из не являющегося человеком вида (например, антитела мыши), белковые последовательности которых модифицированы для увеличения их сходства с вариантами антител, продуцируемыми у человека в природе. Процесс "гуманизации" обычно применяют для моноклональных антител, разработанных для введения человеку, и проводят, когда процесс разработки специфического антитела вовлекает получение в иммунной системе, не являющейся человеческой (такой как у мышей). Белковые последовательности антител, продуцированных таким образом, отличаются от антител, встречающихся у человека в природе, и, таким образом, они являются иммуногенными при введении пациентам-людям. Гуманизированные антитела считаются отличающимися от химерных антител, которые имеют белковые последовательности, сходные с антителами человека, но содержат большие участки не являющегося человеческим белка.

Является возможным получение гуманизированного антитела без получения химерной промежуточной структуры. Прямое получение гуманизированного антитела можно проводить путем встраивания соответствующих кодирующих CDR сегментов (ответственных за желаемые свойства связывания) в каркас антитела человека, что является процессом, известным как "пересадка CDR". Как правило, после разработки антитела, которое имеет желаемые свойства у мыши (или другого не являющегося человеком животного), ДНК, кодирующую CDR этого антитела, можно секвенировать. После установления точных последовательностей желаемых CDR, эти последовательности встраивают в конструкцию, содержащую ДНК для каркасной области антитела человека.

В WO 2010/125571 авторов настоящего изобретения описано моноклональное антитело мыши (MRG-1), продуцируемое конкретной гибридомной клеткой. mAb является в высокой степени селективным в отношении CEACAM1 и не реагирует перекрестно с другими представителями семейства CEACAM. В WO 2013/054331 авторов настоящего изобретения описано химерное антитело (CM-10),

также в высокой степени селективное в отношении SEACAM1.

Хотя существует прогресс в области иммунотерапии, остается постоянная потребность в новых способах лечения, которые являются более эффективными и более длительными и которые вовлекают новые мишени и могут использоваться либо в качестве отдельных средств, либо в комбинации с известными способами терапии, чтобы в итоге достигнуть длительных ответов у пациентов со злокачественной опухолью. Остается неудовлетворенная потребность в предоставлении гуманизированных антител, распознающих конкретные белки SEACAM, которые являются более безопасными и более эффективными и которые можно использовать в диагностических и терапевтических целях при заболеваниях, вовлекающих экспрессию или активацию белков SEACAM.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к гуманизированным антителам, которые распознают SEACAM1. Отдельные гуманизированные антитела в соответствии с настоящим изобретением содержат многочисленные определенные "обратные мутации" в их последовательностях переменных областей, а именно мутации с гуманизированной последовательностью обратно в последовательность мыши. Эти обратные мутации вносят в остатки, важные для поддержания исходной конформации антитела и аффинности связывания, и одновременно имеющие наиболее низкую встречаемость потенциальных Т-клеточных эпитопов, таким образом, минимизируя риск неблагоприятного иммунного ответа на антитела.

Для получения гуманизованного mAb, распознающего SEACAM1, которое имеет определенные последовательности CDR в желаемой ориентации и конформации и каркасную область человека, авторы настоящего изобретения идентифицировали ключевые остатки в каркасной области человека (вне последовательностей CDR), которые влияют на презентацию CDR, и спланировали ряд мутаций в этих ключевых остатках для восстановления правильной презентации CDR, одновременно минимизируя иммуногенность антител. Таким образом, настоящее изобретение относится впервые к высокоаффинному, неиммуногенному, высокоспецифическому гуманизованному антителу против SEACAM1.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к гуманизованному моноклональному антителу (mAb), которое специфически распознает SEACAM1 человека или его фрагмент, содержащие, по меньшей мере, антигенсвязывающий домен, содержащий по меньшей мере одну переменную область, выбранную из группы, состоящей из (i) переменной области тяжелой цепи, содержащей CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3 соответственно; и (ii) переменной области легкой цепи, содержащей CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 соответственно; где по меньшей мере одна из (i) и (ii) содержит 1-25 обратных мутаций аминокислотных остатков с последовательности человека на последовательность мыши.

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретение относится к гуманизованному моноклональному антителу (mAb) или его фрагменту, специфически распознающим SEACAM1 человека, которые содержат по меньшей мере одну переменную область, выбранную из группы, состоящей из (i) аминокислотной последовательности переменной области тяжелой цепи, содержащей последовательности CDR, указанные в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3, где аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи отличается от SEQ ID NO: 57 на 1-25 аминокислотных остатков в последовательностях каркасных областей; и (ii) аминокислотной последовательности переменной области легкой цепи, содержащей последовательности CDR, указанные в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, где аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи отличается от SEQ ID NO: 58 1-10 аминокислотными остатками в последовательностях каркасной области.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к гуманизованному моноклональному антителу (mAb) или его фрагменту, специфически распознающим SEACAM1 человека, которые содержат: (i) последовательности CDR, указанные в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6; (ii) аминокислотную последовательность переменной области тяжелой цепи, которая отличается 3-13 аминокислотными остатками каркасной области от SEQ ID NO: 57; и (iii) аминокислотную последовательность переменной области легкой цепи, которая отличается 3-5 аминокислотными остатками каркасной области от SEQ ID NO: 58.

Согласно определенным вариантам осуществления аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи отличается от SEQ ID NO: 57 3-13 аминокислотными остатками в последовательностях каркасной области. Согласно другим вариантам осуществления аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи отличается от SEQ ID NO: 58 3-5 аминокислотными остатками в последовательностях каркасной области.

Согласно другим вариантам осуществления настоящее изобретение относится к не полностью гуманизованному моноклональному антителу, содержащему: (i) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3 соответственно, и аминокислотную последовательность каркасной области, которая отличается 2-9 аминокислотами от аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 9; и/или (ii) переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6

соответственно, и аминокислотную последовательность каркасной области, которая отличается 2-4 аминокислотами от аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 13; и к его аналогам, производным и антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически распознают СЕАСАМ1 человека.

Согласно некоторым вариантам осуществления последовательность mAb содержит 1-50 обратных мутаций на последовательность мыши. Согласно другим вариантам осуществления, последовательность mAb содержит 2-30 обратных мутаций на последовательность мыши. Согласно другим вариантам осуществления последовательность mAb содержит 3-20 обратных мутаций на последовательность мыши. Согласно другим вариантам осуществления последовательность mAb содержит 4-15 обратных мутаций на последовательность мыши. Согласно другим вариантам осуществления тяжелая цепь последовательности mAb содержит 1-15 обратных мутаций на последовательность мыши. Согласно другим вариантам осуществления легкая цепь последовательности mAb содержит 1-15 обратных мутаций на последовательность мыши. Согласно другим вариантам осуществления тяжелая цепь последовательности mAb содержит 2-9 обратных мутаций на последовательность мыши и легкая цепь последовательности mAb содержит 2-4 обратных мутаций на последовательность мыши.

Согласно некоторым конкретным вариантам осуществления гуманизованное mAb содержит 1-25 мутаций в последовательности тяжелой цепи, указанной в SEQ ID NO: 57, с последовательности человека на последовательность мыши. Согласно некоторым вариантам осуществления тяжелая цепь гуманизованного mAb содержит по меньшей мере одну мутацию в остатке, выбранном из группы, состоящей из V11, R38, M48, V68, M70, R72, T74, S77, R85, R87, T91, Y95 и T115 SEQ ID NO: 57. Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере одна обратная мутация в SEQ ID NO: 57 выбрана из группы, состоящей из V11L, R38K, M48I, V68A, M70L, R72A, T74K, S77N, R85S, R87T, T91S, Y95F и T115S.

Согласно другим некоторым конкретным вариантам осуществления гуманизованное mAb содержит 1-25 мутаций в последовательности легкой цепи, указанной в SEQ ID NO: 58, с последовательности человека на последовательность мыши. Согласно некоторым вариантам осуществления легкая цепь гуманизованного mAb содержит по меньшей мере одну мутацию в остатке, выбранном из группы, состоящей из P44, F71, F73, P80 и Y87 SEQ ID NO: 58. Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере одна обратная мутация в SEQ ID NO: 58 выбрана из группы, состоящей из P44V, F71Y, F73L, P80Q и Y87F.

Согласно некоторым вариантам осуществления тяжелая цепь гуманизованного mAb содержит по меньшей мере одну мутацию в остатке, выбранном из группы, состоящей из V11, R38, M48, V68, M70, R72, T74, S77, R85, R87, T91, Y95 и T115 SEQ ID NO: 57, и легкая цепь гуманизованного mAb содержит по меньшей мере одну мутацию в остатке, выбранном из группы, состоящей из P44, F71, F73, P80 и Y87 SEQ ID NO: 58. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения.

Согласно некоторым вариантам осуществления тяжелая цепь гуманизованного mAb содержит по меньшей мере одну мутацию в остатке, выбранном из группы, состоящей из V68, M70, R72, T74, S77, R85, R87, T91 и Y95 SEQ ID NO: 57, и легкая цепь гуманизованного mAb содержит по меньшей мере одну мутацию в остатке, выбранном из группы, состоящей из F71, F73, P80 и Y87 SEQ ID NO: 58. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения.

Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере одна обратная мутация в SEQ ID NO: 57 выбрана из группы, состоящей из V11L, R38K, M48I, V68A, M70L, R72A, T74K, S77N, R85S, R87T, T91S, Y95F и T115S, и по меньшей мере одна обратная мутация в SEQ ID NO: 58 выбрана из группы, состоящей из P44V, F71Y, F73L, P80Q и Y87F. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения.

Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере одна обратная мутация в SEQ ID NO: 57 выбрана из группы, состоящей из V68A, M70L, R72A, T74K, S77N, R85S, R87T, T91S и Y95F, и по меньшей мере одна обратная мутация в SEQ ID NO: 58 выбрана из группы, состоящей из F71Y, F73L, P80Q и Y87F. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело содержит по меньшей мере одну последовательность каркасной области тяжелой цепи, указанную в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело содержит последовательность каркасной области тяжелой цепи, указанную в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело содержит последовательности каркасной области тяжелой цепи, указанные в SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 23. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления

ласти легкой цепи, указанную в SEQ ID NO: 35. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO: 29, и последовательность вариабельной области легкой цепи, указанную в SEQ ID NO: 35. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO: 30, и последовательность вариабельной области легкой цепи, указанную в SEQ ID NO: 35. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO: 31, и последовательность вариабельной области легкой цепи, указанную в SEQ ID NO: 35. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO: 32, и последовательность вариабельной области легкой цепи, указанную в SEQ ID NO: 35.

Согласно некоторым вариантам осуществления тяжелая цепь гуманизированного mAb выбрана из изомеров IgG4 и IgG1. Согласно некоторым вариантам осуществления тяжелая цепь гуманизированного mAb имеет изотип IgG4. Согласно некоторым вариантам осуществления легкая цепь гуманизированного mAb представляет собой изотип к. Согласно некоторым конкретным вариантам осуществления гуманизированное mAb имеет изотип к легкой цепи и изотип IgG4 тяжелой цепи. Согласно другим конкретным вариантам осуществления гуманизированное mAb имеет изотип к легкой цепи и изотип IgG1 тяжелой цепи.

Согласно некоторым вариантам осуществления mAb содержит легкую цепь, указанную в SEQ ID NO: 52. Согласно некоторым вариантам осуществления mAb содержит тяжелую цепь, указанную в SEQ ID NO: 53 или SEQ ID NO: 59. Согласно некоторым вариантам осуществления mAb содержит легкую цепь, указанную в SEQ ID NO: 52, и тяжелую цепь, указанную в SEQ ID NO: 53. Согласно некоторым вариантам осуществления mAb содержит легкую цепь, указанную в SEQ ID NO: 52, и тяжелую цепь, указанную в SEQ ID NO: 59.

Согласно некоторым вариантам осуществления mAb содержит вариабельную область легкой цепи, указанную в SEQ ID NO: 58, и тяжелую цепь, указанную в SEQ ID NO: 53. Согласно некоторым вариантам осуществления mAb содержит вариабельную область легкой цепи, указанную в SEQ ID NO: 58, и тяжелую цепь, указанную в SEQ ID NO: 59. Согласно некоторым вариантам осуществления mAb содержит легкую цепь, указанную в SEQ ID NO: 52, и вариабельную область тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO: 57.

Настоящее изобретение также относится к mAb, содержащему вариабельную область легкой цепи, указанную в SEQ ID NO: 58, и вариабельную область тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO: 57.

В некоторых вариантах осуществления гуманизированное mAb или его антигенсвязывающий фрагмент способны связываться с белком CEACAM1 человека с аффинностью по меньшей мере приблизительно 10^{-8} М. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное mAb или его антигенсвязывающий фрагмент способны связываться по меньшей мере с одним из белков CEACAM3 человека и CEACAM5 человека с аффинностью по меньшей мере приблизительно 5×10^{-7} М.

Кроме того, в другом аспекте настоящее изобретение относится к аналогам и/или производным моноклонального антитела, описанного выше, обладающим по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с антигенсвязывающим фрагментом указанного моноклонального антитела.

Фрагменты mAb, распознающие CEACAM1, которые содержат по меньшей мере антигенсвязывающий домен, также входят в объем настоящего изобретения при условии, что они содержат определенные выше последовательности CDR и по меньшей мере одну обратную мутацию последовательности человека на последовательность мыши.

Кроме того, в другом аспекте настоящее изобретение относится к выделенным полинуклеотидам, кодирующим моноклональное антитело, описанное выше, или его фрагмент, которые специфически распознают CEACAM1 человека.

В некоторых вариантах осуществления выделенная полинуклеотидная последовательность содержит последовательности ДНК, указанные в любой из SEQ ID NO: 44-51, которые кодируют вариабельную область гуманизированного mAb или их аналоги, обладающие по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с указанными последовательностями. В некоторых вариантах осуществления выделенная полинуклеотидная последовательность содержит последовательности ДНК, указанные в SEQ ID NO: 54 или SEQ ID NO: 55, которые кодируют тяжелую цепь гуманизированного mAb, или их аналоги, обладающие по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с указанными последовательностями. В некоторых вариантах осуществления выделенная полинуклеотидная последовательность содержит последовательность ДНК, указанную в SEQ ID NO: 56, которая кодирует легкую цепь гуманизированного mAb, или ее аналоги, обладающие по меньшей мере 90% идентичностью последовательности с указанными последовательностями.

Кроме того, в другом аспекте настоящее изобретение относится к плазмиде, содержащей выделенный полинуклеотид, описанный выше.

Кроме того, в другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции,

содержащей терапевтически эффективное количество моноклонального антитела, описанного выше, и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент.

Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтическая композиция содержит 1-50 мг/мл гуманизованного mAb к CEACAM1. Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтическая композиция содержит основную аминокислоту. Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтическая композиция содержит сахар. Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтическая композиция содержит поверхностно-активное вещество. Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтическая композиция содержит основную аминокислоту, сахар и поверхностно-активное вещество. Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтическая композиция содержит: (i) 1-10 мг/мл основной аминокислоты; (ii) 10/100 мг/мл сахара; (iii) 0,01-1 мг/мл поверхностно-активного вещества; (iv) 1-50 мг/мл гуманизованного mAb к CEACAM1, 4-6 мг/мл основной аминокислоты, 70-100 мг/мл сахара и 0,1-1 мг/мл неанионного поверхностно-активного вещества; или (v) 10 мг/мл гуманизованного mAb к CEACAM1, 4,65 мг/мл L-гистидина, 82 мг/мл сахарозы и 0,20 мг/мл полисорбата 20.

Согласно некоторым вариантам осуществления основная аминокислота выбрана из группы, состоящей из гистидина, аргинина, лизина и орнитина. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения. Согласно некоторым вариантам осуществления композиция содержит 1-10, 2-9, 3-7 или 4-6 мг/мл основной аминокислоты. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения.

Согласно некоторым вариантам осуществления сахар выбран из группы, состоящей из: сахарозы, трегалозы, глюкозы, декстрозы и мальтозы. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения. Согласно некоторым вариантам осуществления композиция содержит 10-200, 10-100, 50-150 или 70-100 мг/мл сахара. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения.

Согласно другим вариантам осуществления композиция содержит полиол, включая, но не ограничиваясь ими, маннит и сорбит. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения.

Согласно некоторым вариантам осуществления поверхностно-активное вещество является неанионным. Согласно некоторым вариантам осуществления поверхностно-активное вещество выбрано из группы, состоящей из полисорбатов, сложных эфиров сорбитана и полоксамеров. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения. Согласно некоторым вариантам осуществления поверхностно-активное вещество выбрано из группы, состоящей из полисорбата 20, полисорбата 80. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения. Согласно некоторым вариантам осуществления, композиция содержит 0,01-10, 0,01-1, 0,05-5 или 0,1-1 мг/мл поверхностно-активного вещества. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения. Согласно некоторым вариантам осуществления, фармацевтическая композиция содержит 4-6 мг/мл основной аминокислоты, 70-100 мг/мл сахара и 0,1-1 мг/мл поверхностно-активного вещества.

Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтическая композиция находится в жидкой форме и содержит 1-50 мг/мл гуманизованного mAb к CEACAM1, содержащего по меньшей мере одну обратную мутацию на последовательность мыши. Согласно другим вариантам осуществления фармацевтическая композиция является лиофилизированной. Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтическая композиция содержит 10 мг/мл гуманизованного mAb к CEACAM1, 4,65 мг/мл L-гистидина, 82 мг/мл сахарозы и 0,20 мг/мл полисорбата 20.

Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере одно гуманизованное mAb или фрагмент, определенные выше, и дополнительный иммуномодулятор или ингибитор киназы. Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтическую композицию, содержащую по меньшей мере одно гуманизованное mAb или фрагмент, определенные выше, и фармацевтическую композицию, содержащую дополнительный иммуномодулятор или ингибитор киназы, используют для лечения злокачественной опухоли посредством раздельного введения.

Согласно некоторым конкретным вариантам осуществления дополнительный иммуномодулятор выбран из группы, состоящей из антитела против белка запрограммированной клеточной смерти 1 (PD-1), PD-L1 и PD-L2, активированной цитотоксической лимфоцитарной клетки, активирующего лимфоциты средства и ингибитора каскада RAF/MEK. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения. Согласно некоторым конкретным вариантам осуществления дополнительный иммуномодулятор выбран из группы, состоящей из mAb к PD-1, mAb к PD-L1, mAb к PD-L2, интерлейкина 2 (IL-2), лимфокин-активируемой киллерной (ЛАК) клетки.

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей гуманизованное mAb, содержащее обратные мутации, как определено выше, или его антигенсвязывающий фрагмент, и к фармацевтической композиции, содержащей mAb по меньшей мере к одному из белка запрограммированной клеточной смерти 1 (PD-1), PD-L1 и PD-L2, или его антигенсвязывающий фрагмент, для применения для лечения злокачественной опухоли посредством раздель-

ного введения.

Согласно другим вариантам осуществления предусматривается фармацевтическая композиция, содержащая гуманизованное mAb к CEACAM1, определенное выше, или его антигенсвязывающий фрагмент, и активированную цитотоксическую лимфоцитарную клетку. В определенных вариантах осуществления активированная цитотоксическая лимфоцитарная клетка выбрана из группы, состоящей из клетки LAK, клетки CIK и любой их комбинации. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления изобретения. В определенных вариантах осуществления активированная цитотоксическая лимфоцитарная клетка представляет собой лимфокин-активируемую киллерную (ЛАК) клетку.

В других вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит гуманизованное mAb к CEACAM1 или его антигенсвязывающий фрагмент, и активирующее лимфоциты средство или его фрагмент, их аналог или слитый белок. В определенных вариантах осуществления активирующее лимфоциты средство выбрано из группы, состоящей из IL-2, IFN γ , антитела против CD3 и их фрагментов, аналогов или слитых белков. В определенных вариантах осуществления активирующее лимфоциты средство представляет собой IL-2 или его фрагмент, аналог или слитый белок. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления изобретения.

В других вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит ингибитор киназы, выбранной из группы, состоящей из мутантной киназы B-Raf, киназы MEK1 и киназы MEK2, и гуманизованного mAb к CEACAM1 человека, определенного выше, или его антигенсвязывающего фрагмента.

Согласно некоторым конкретным вариантам осуществления ингибитор киназы B-Raf ослабляет или предупреждает фосфорилирование MEK1 или MEK2 мутантной киназой B-Raf. В определенных вариантах осуществления ингибитор киназы B-Raf ослабляет или препятствует димеризации мутантной киназы B-Raf. В определенных вариантах осуществления ингибитор киназы MEK1 ослабляет или препятствует фосфорилированию MAPK киназой MEK1. В определенных вариантах осуществления ингибитор киназы MEK2 ослабляет или препятствует фосфорилированию MAPK киназой MEK2.

Кроме того, настоящее изобретение относится согласно другим вариантам осуществления к ингибитору киназы, выбранному из группы, состоящей из мутантной киназы B-Raf, киназы MEK1 и киназы MEK2, и к гуманизованному mAb к CEACAM1 человека или его антигенсвязывающему фрагменту для применения для лечения злокачественной опухоли. Два активных ингредиента могут быть частью одной или отдельных фармацевтических композиций, которые можно вводить одновременно или посредством отдельных введений.

Гуманизованное mAb к CEACAM1 в соответствии с настоящим изобретением и дополнительный иммуномодулятор могут содержаться в одной фармацевтической композиции или в отдельных композициях для одновременного или отдельного введения.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция предназначена для лечения заболевания или нарушения, ассоциированных с экспрессией, активацией или функцией представителя семейства белков CEACAM, включая, но не ограничиваясь ими, CEACAM1. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция предназначена для лечения заболевания или нарушения, ассоциированных с экспрессией, активацией или функцией CEACAM1. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой клеточно-пролиферативное заболевание или нарушение. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления клеточно-пролиферативное заболевание или нарушение представляет собой злокачественную опухоль.

Согласно некоторым вариантам осуществления злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из меланомы, рака ободочной и прямой кишки, мочевого пузыря, легкого, немелкоклеточной карциномы легкого (NSCLC), немелкоклеточной аденокарциномы легкого (NSCLA), желудочно-кишечного рака, рака поджелудочной железы, молочной железы, предстательной железы, щитовидной железы, желудка, яичника, меланомы и рака тела матки. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения.

Кроме того, в другом аспекте настоящее изобретение относится к диагностической композиции, содержащей по меньшей мере одно гуманизованное mAb или его фрагмент, которые специфически распознают CEACAM1 человека, как описано выше.

Кроме того, в другом аспекте настоящее изобретение относится к способу предупреждения, смягчения или лечения заболевания или нарушения, ассоциированного с экспрессией, активацией или функцией белка CEACAM1, включающему введение индивидууму, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, описанной выше.

В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой злокачественную опухоль. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой инфекцию, например вирусную инфекцию.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело, содержащееся в фармацевтической композиции, связано с цитотоксической частью.

В определенных вариантах осуществления способ, описанный выше, включает введение индиви-

дууму по меньшей мере одной дозы гуманизированного mAb к SEACAM1 в диапазоне от 0,01 до 10 мг/кг массы тела. В определенных вариантах осуществления способ, описанный выше, включает введение (i) множества идентичных или различающихся доз гуманизированного mAb; (ii) множества возрастающих доз или (iii) фармацевтической композиции один раз в неделю, один раз в 2 недели, один раз в 3 недели, один раз в 4 недели или один раз в 5 недель. В определенных вариантах осуществления способ, описанный выше, включает 1-10 курсов введения, причем каждый курс включает 2-5 инфузий каждые 1-4 недели гуманизированного mAb, а затем 2-8 недель между курсами.

В определенных вариантах осуществления способ, описанный выше, кроме того, включает введение лимфоцитарной клетки или множества лимфоцитарных клеток. В некоторых вариантах осуществления способ, описанный выше, кроме того, включает введение индивидууму экспрессирующих SEACAM1 лимфоцитов. В некоторых вариантах осуществления лимфоциты включают Т-клетки, НК-клетки или инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL). Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления лимфоцитарная клетка экспрессирует SEACAM1, PD-1 или оба из них. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения. В определенных таких вариантах осуществления лимфоцитарная клетка экспрессирует SEACAM1 и PD-1. В некоторых вариантах осуществления лимфоцитарная клетка выбрана из группы, состоящей из инфильтрирующей опухоль лимфоцитарной (TIL) клетки, лимфокин-активируемой киллерной (LAK) клетки, цитокин-индуцируемой киллерной (CIK) клетки, Т-клетки, В-клетки, НК-клетки и любой их комбинации. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения. В определенных таких вариантах осуществления лимфоцитарная клетка выбрана из группы, состоящей из инфильтрирующей опухоль лимфоцитарной (TIL) клетки и лимфокин-активируемой киллерной (LAK) клетки. В определенных таких вариантах осуществления лимфоцитарная клетка представляет собой инфильтрирующую опухоль лимфоцитарную (TIL) клетку или множество клеток TIL. В определенных таких вариантах осуществления лимфоцитарная клетка представляет собой лимфокин-активируемую киллерную (LAK) клетку или множество LAK-клеток. В определенных вариантах осуществления лимфоцитарная клетка является активированной. В некоторых вариантах осуществления лимфоцитарная клетка является цитотоксической для злокачественной клетки. В некоторых вариантах осуществления злокачественная клетка экспрессирует SEACAM1, PD-L1, PD-L2 или любую их комбинацию. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления злокачественная клетка экспрессирует SEACAM1, PD-L1 или оба из них. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления злокачественная клетка экспрессирует SEACAM1, PD-L2 или оба из них. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения. В определенных таких вариантах осуществления злокачественная клетка экспрессирует SEACAM1 и PD-L1 и PD-L2.

В определенных вариантах осуществления способы, описанные выше, кроме того, включают введение индивидууму средства, активирующего лимфоциты. Согласно некоторым вариантам осуществления средство, активирующее лимфоциты, выбрано из группы, состоящей из IL-2, IFN γ и антитела против CD3. В определенных вариантах осуществления способы, описанные выше, кроме того, включают введение индивидууму дополнительной композиции против злокачественной опухоли.

Кроме того, в другом аспекте настоящее изобретение относится к способу иммуномодулирования, причем способ включает приведение в контакт экспрессирующего SEACAM1 лимфоцита с антителами или их фрагментами, описанными выше.

Кроме того, в другом аспекте настоящее изобретение относится к способу ингибирования миграции экспрессирующей SEACAM1 опухолевой клетки, причем способ включает приведение в контакт указанной экспрессирующей SEACAM1 опухолевой клетки с антителами или их фрагментами, описанными выше, тем самым ингибируя миграцию указанной экспрессирующей SEACAM1 опухолевой клетки.

Кроме того, в другом аспекте настоящее изобретение относится к способу ингибирования гомотипического или гетеротипического белок-белкового взаимодействия SEACAM1, причем способ включает приведение экспрессирующего SEACAM1 лимфоцита в контакт с антителами или их фрагментами, описанными выше, тем самым ингибируя гомотипическое или гетеротипическое белок-белковое взаимодействие SEACAM1.

Кроме того, в другом аспекте настоящее изобретение относится к способу увеличения продолжительности или прогрессирования ответа или выживаемости индивидуума, имеющего злокачественную опухоль, включающему введение индивидууму эффективных количеств композиции, содержащей моноклональное антитело, как описано выше, и антинеопластической композиции, где указанная антинеопластическая композиция содержит по меньшей мере одно химиотерапевтическое средство, причем совместное введение антитела и антинеопластической композиции эффективно увеличивает продолжительность или прогрессирование выживаемости.

Способ по настоящему изобретению может включать введение фармацевтической композиции, определенной выше, вместе с дополнительной композицией против злокачественной опухоли. Согласно конкретному варианту осуществления композиция против злокачественной опухоли содержит по мень-

шей мере одно химиотерапевтическое средство. Согласно другим конкретным вариантам осуществления композиция против злокачественной опухоли содержит иммуномодулирующее средство. Средство против злокачественной опухоли, которое можно вводить совместно с антителом в соответствии с настоящим изобретением или отдельно, может включать любое такое средство, известное в данной области, проявляющее активность против злокачественной опухоли.

Согласно некоторым вариантам осуществления предусматривается способ лечения злокачественной опухоли, включающий введение индивидууму, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции, содержащей гуманизованное антитело, которое распознает CEACAM1 и содержит обратные мутации на последовательность мыши, и фармацевтической композиции, содержащей дополнительный иммуномодулятор или ингибитор киназы.

Согласно некоторым вариантам осуществления иммуномодулятор выбран из группы, состоящей из mAb к PD-1, mAb к PD-L1, mAb к PD-L2, интерлейкина 2 (IL-2), лимфокин-активируемой киллерной (LAK) клетки, и ингибитор киназа представляет собой ингибитор B-Raf/MEK.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение двух или более фармацевтических композиций проводят одновременно. В некоторых вариантах осуществления введения двух или более фармацевтических композиций проводят последовательно. В некоторых вариантах осуществления способа дополнительный иммуномодулятор вводят до гуманизованного mAb к CEACAM1 человека или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления способа, иммуномодулятор вводят одновременно с mAb к CEACAM1 человека или его антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых вариантах осуществления способа иммуномодулятор вводят после гуманизованного mAb к CEACAM1 человека или его антигенсвязывающего фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение указанному пациенту фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело к CEACAM1 человека или его антигенсвязывающий фрагмент, и фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело к PD-1 человека или его антигенсвязывающий фрагмент. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения.

Согласно другим вариантам осуществления способы лечения пациента, имеющего злокачественную опухоль, описанную выше, включают стадию введения пациенту фармацевтической композиции, содержащей ингибитор киназы, выбранной из группы, состоящей из мутантной киназы B-Raf, киназы MEK1 и киназы MEK2, и фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело к CEACAM1 человека или его антигенсвязывающий фрагмент, где злокачественные клетки экспрессируют мутантную киназу B-Raf, тем самым осуществляя лечение злокачественной опухоли.

В некоторых вариантах осуществления способы лечения злокачественной опухоли, описанные выше, кроме того, включают стадию введения указанному пациенту фармацевтической композиции, содержащей лимфоцитарную клетку. В некоторых вариантах осуществления введения фармацевтической композиции, содержащей лимфоцитарную клетку, проводят одновременно по меньшей мере с одной из фармацевтических композиций, содержащих антитела. В некоторых вариантах осуществления способа введение двух или более фармацевтических композиций проводят последовательно.

В некоторых вариантах осуществления лимфоцитарную клетку предварительно инкубируют с гуманизованным mAb к CEACAM1 человека с его антигенсвязывающим фрагментом или с дополнительным иммуномодулятором. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения.

Фармацевтическую композицию в соответствии с настоящим изобретением можно вводить любыми подходящими способами, такими как интраназально, подкожно, внутримышечно, внутривенно, внутриартериально, внутрисуставным путем, внутрь очага повреждения, перорально или местным путем. Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтическую композицию вводят парентерально. Согласно некоторым конкретным вариантам осуществления используют внутривенное (в/в) введение.

Согласно некоторым вариантам осуществления способ лечения злокачественной опухоли или другого ассоциированного с CEACAM1 заболевания или нарушения в соответствии с настоящим изобретением включает введение индивидууму, нуждающемуся в этом, по меньшей мере одной дозы гуманизованного mAb к CEACAM1 в диапазоне от 0,01 до 10 мг/кг массы тела.

Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере одна доза выбрана из группы, состоящей из 0,01-0,1 мг/кг; 0,1-1 мг/кг; 1-10 мг/кг и 10-50 мг/кг.

Согласно некоторым вариантам осуществления способ включает введение множества доз гуманизованного mAb, где множество доз являются идентичными или различаются. Согласно некоторым вариантам осуществления способ включает введение множества возрастающих доз. Согласно некоторым вариантам осуществления способ включает по меньшей мере один курс введения в течение по меньшей мере 12 недель.

Согласно другим вариантам осуществления продолжительность лечения составляет 12-50 недель. Согласно некоторым конкретным вариантам осуществления продолжительность лечения выбрана из группы, состоящей из 12-20 недель, 20-30 недель и 30-50 недель. Согласно другим вариантам осуществ-

ления режим лечения включает несколько курсов введения, каждый из которых длится по меньшей мере 12 недель.

Согласно некоторым вариантам осуществления режим лечения включает 1-8 курсов, причем каждый курс включает 4 инфузии гуманизованного mAb против CEACAM в течение по меньшей мере 4 недель. Согласно некоторым вариантам осуществления режим лечения включает 2-6 курсов.

Согласно некоторым вариантам осуществления введение проводят один раз в неделю, один раз в 2 недели, один раз в 3 недели, один раз в 4 недели или один раз в 5 недель. Каждая возможность представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения.

Согласно некоторым вариантам осуществления режим лечения включает 1-10 курсов, причем каждый курс включает 2-5 инфузий каждые 1-4 недели, гуманизованного mAb согласно изобретению, а затем 2-8 недель между курсами.

Согласно некоторым вариантам осуществления предусматривается режим увеличения дозы, включающий введение, начинающееся с 0,01 мг/кг и продолжающееся до 0,03 мг/кг, 0,1 мг/кг, 0,3 мг/кг, 1 мг/кг, 3 мг/кг и 10 мг/кг. Согласно другим вариантам осуществления режим лечения включает 6 курсов по 4 инфузии в каждом, проводимые каждые 2 недели.

Кроме того, в другом аспекте настоящее изобретение относится к способу диагностики злокачественной опухоли у индивидуума, нуждающемуся в этом, причем способ включает приведение биологического образца, происходящего или полученного от указанного индивидуума, в контакт с диагностической композицией, описанной выше, где образование комплекса за пределами заданного порогового значения указывает на злокачественную опухоль у указанного индивидуума.

Кроме того, в другом аспекте настоящее изобретение относится к способу определения экспрессии CEACAM1, причем способ включает приведение биологического образца в контакт с антителами или их фрагментами, описанными выше, и измерение уровня образования иммунных комплексов. Согласно некоторым вариантам осуществления способ включает сравнение указанного уровня иммунного комплекса со стандартной кривой, полученной на основе известных количеств CEACAM1.

Кроме того, в другом аспекте настоящее изобретение относится к способу диагностики заболевания или нарушения, ассоциированного с экспрессией белка CEACAM, включающему стадии инкубации биологического образца с моноклональным антителом, как описано выше; обнаружение связанного белка CEACAM с использованием поддающегося обнаружению зонда; сравнение количества связанного белка CEACAM со стандартной кривой, полученной для эталонных образцов, содержащих известные количества белка CEACAM; вычисление количества белка CEACAM в биологическом образце, исходя из стандартной кривой; и сравнение количества белка CEACAM с нормальным количеством белка CEACAM.

Согласно некоторым вариантам осуществления гуманизованное mAb согласно изобретению используют в качестве прогностического биомаркера, ассоциированного с лечением, направленным против CEACAM1, исходя из уровней экспрессии CEACAM1 в образцах опухоли до лечения. Уровни экспрессии CEACAM1 определяют с использованием способов, известных в данной области, с использованием гуманизованного mAb согласно изобретению.

Кроме того, в одном аспекте настоящее изобретение относится к применению моноклонального антитела, как описано выше, для диагностики, предупреждения или лечения клеточно-пролиферативного или связанного с ангиогенезом заболевания или нарушения или инфекции.

Кроме того, в одном аспекте настоящее изобретение относится к применению моноклонального антитела, как описано выше, для получения лекарственного средства для лечения нарушения или заболевания, ассоциированных с экспрессией или активацией белка CEACAM.

Кроме того, в одном аспекте настоящее изобретение относится к применению моноклонального антитела, как описано выше, для получения диагностической композиции для диагностики клеточно-пролиферативного или связанного с ангиогенезом заболевания или нарушения или инфекции.

Кроме того, в одном аспекте настоящее изобретение относится к частично гуманизованному моноклональному антителу, содержащему переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность каркасной области, указанную в SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 22, или переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность каркасной области, указанную в SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 или SEQ ID NO: 27.

Следующие варианты осуществления и полный объем применимости настоящего изобретения станут очевидными из подробного описания, приведенного далее. Однако следует понимать, что подробное описание и конкретные примеры, хотя и указывают на предпочтительные варианты осуществления изобретения, приведены только в качестве иллюстрации, поскольку различные изменения и модификации сущности и объема изобретения станут понятными специалистам в данной области из этого подробного описания.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлена структурная модель V-областей химерного антитела против CEACAM-1 (CM-10) вид сверху (A) и пространственно-боковой вид (B), полученные с использованием программы моделирования по гомологии белковой структуры Swiss PDB.

На фиг. 2 представлен окрашенный кумасси синим гель SDS-PAGE с антителами, очищенными с

использованием белка А. Приблизительно 2 мкг каждого образца наносили на гель NuPage 4-12% Bis-Tris (каталожный номер Invitrogen № NP0322BOX) и разделяли при 200 В в течение 40 мин. (А) Варианты IgG1 с пересаженными CDR; (В) варианты IgG4 (S241P) с пересаженными CDR. В качестве стандарта молекулярной массы использовали Fermentas Pageruler Plus (SM1811) (содержащий эталонные полосы на уровне 10, 25 и 70 кДа). Образцы были пронумерованы следующим образом:

№	1	2	3	4	5	6	7	8
V _H /	VH1/	VH1/	VH1/	VH2/	VH2/	VH2/	VH3/	VH3/
V _L	VK1	VK2	VK3	VK1	VK2	VK3	VK1	VK2

№	9	10	11	12	13	14	15	16
VH/	VH3/	VH4/	VH4/	VH4/	VH5/	VH5/	VH5/VK3	Химерный
VL	VK3	VK1	VK2	VK3	VK1	VK2		IgG

На фиг. 3 показана графическая иллюстрация результатов конкурентных анализов связывания ELISA для рекомбинантного CEACAM-1 человека. Различные концентрации очищенных вариантов гуманизированного IgG-антитела подвергали конкуренции с постоянной концентрацией биотинилированного IgG против CEACAM-1 (химерный IgG1 CM-10): (А) варианты IgG1; и (В) варианты IgG4 (S241P). Обнаружение связанного биотинилированного химерного CM-10 проводили с использованием стрептавидин-HRP и субстрата ТМВ.

На фиг. 4 представлены синергичные эффекты антител против CEACAM1 и против PD-1 на цитотоксичность клеток ТИЛ человека против клеток меланомы человека. Клетки ТИЛ инкубировали с различными концентрациями гуманизированного mAb к CEACAM1 человека (пунктирная черная линия, сферический символ), mAb к PD-1 человека (сплошная серая линия, прямоугольный символ) или комбинации обоих антител (сплошная черная линия, треугольный символ). Обработанные IFN- γ клетки меланомы добавляли для инкубации в течение ночи. Результаты соответствуют среднему значению % цитотоксичности \pm SE при определении с использованием классического анализа высвобождения LDH в трех экземплярах лунок на обработку. *P<0,05, парный Т-критерий по сравнению с моноклональным антителом к CEACAM1 человека отдельно.

На фиг. 5А-В представлены синергические эффекты антител против CEACAM1 и против PD-1 на уровне гранзима В и цитотоксичность ТИЛ-клеток человека в отношении клеток меланомы человека, когда антитела против PD-1 добавляли перед добавлением антител против CEACAM1. Клетки меланомы человека выращивали в присутствии IFN- α для индукции экспрессии PD-L1.

ТИЛ-клетки человека инкубировали со средой отдельно (черный), неспецифическим IgG-антителом (белый), различными концентрациями моноклонального антитела к CEACAM1 человека (вертикальные линии), моноклональным антителом к PD-1 человека (горизонтальные линии) или комбинацией обоих антител (точки).

(А) Результаты соответствуют среднему значению % цитотоксичности \pm SE при определении с использованием классического анализа высвобождения LDH в трех экземплярах лунок на обработку. *P \leq 0,05, парный Т-критерий по сравнению с PD-1 отдельно.

(В) Результаты соответствуют уровням гранзима В \pm SE при определении с использованием коммерческого набора ELISA для гранзима В в трех экземплярах лунок на обработку.

На фиг. 6 представлены синергичные эффекты антител против CEACAM1 и против PD-1 на цитотоксичность LAK-клеток человека против клеток меланомы человека, когда антитела против PD-1 добавляли до добавления антител против CEACAM1. Клетки меланомы человека выращивали в присутствии IFN- α для индукции экспрессии PD-L1. LAK-клетки человека, полученные посредством активации РВМС от здорового донора-человека посредством IL-2, инкубировали со средой отдельно (белый), неспецифическим IgG-антителом (черный), различными концентрациями моноклонального антитела к CEACAM1 человека (вертикальные линии), моноклональным антителом к PD-L1 человека (горизонтальные линии) или комбинацией обоих антител (точки). Результаты соответствуют среднему значению % цитотоксичности \pm SE при определении с использованием классического анализа высвобождения LDH в трех экземплярах лунок на обработку. *P \leq 0,05, парный Т-критерий по сравнению с PD-L1 отдельно. Показатель аддитивности вычисляли, как описано выше.

На фиг. 7 показано, что обработка антителами против CEACAM1 повышает экспрессию PD-L1 на злокачественных клетках-мишенях. NK-клетки (NK92MI) инкубировали с CM-24 (10 мкг/мл) или без него, а затем добавляли клетки меланомы человека (SKMEL28).

Клетки инкубировали в течение 24, 48 и 72 ч и уровни PD-L1 измеряли в каждый момент времени посредством FACS-анализа. Представлено среднее соотношение для антитела против PD-L1 по сравнению с соответствующим изотипическим контролем для указанных обработок в различные моменты времени.

На фиг. 8 представлены синергические эффекты антител против CEACAM1 и против PD-1 на про-

грессирование опухоли у иммунокомпетентных мышей. Клетки лимфомы мыши имплантировали подкожно в область живота мышей BALB/C (1 септ). На 10, 15 и 20 сутки мышам внутривенно вводили либо PBS (пунктирная черная линия, незакрашенные круги), либо антитело против CEACAM1 мыши (сплошная серая линия, серые прямоугольники), либо антитело против PD-1 мыши (сплошная серая линия, серые треугольники), либо комбинацию обоих антител (сплошная черная линия, черные сферы).

На фиг. 9 показано, что антитела против CEACAM1 повышают цитотоксичность LAK-клеток человека в отношении клеток меланомы человека. LAK-клетки человека инкубировали с CM-24 в различных концентрациях в течение 30 мин при 37°C. Злокачественные клетки меланомы человека (SKMEL28) добавляли для инкубации в течение 24 ч. Результаты соответствуют среднему значению % цитотоксичности ± SE при определении с использованием классического анализа высвобождения LDH в трех экземплярах лунок на обработку. *P ≤ 0,05, парный T-критерий по сравнению с эффекторами + клетки-мишени со средой отдельно.

На фиг. 10 показано, что антитела против CEACAM1 повышают цитотоксичность LAK-клеток человека против клеток рака поджелудочной железы человека T3M4. LAK-клетки человека инкубировали с CM-24 в различных концентрациях в течение 30 мин при 37°C. Клетки рака поджелудочной железы человека T3M4 добавляли для инкубации в течение 24 ч. Результаты соответствуют среднему значению % цитотоксичности ± SE при определении с использованием классического анализа высвобождения LDH в трех экземплярах лунок на обработку. *P ≤ 0,05, парный T-критерий по сравнению с эффекторами + клетки-мишени со средой отдельно.

На фиг. 11 показано, что антитела против CEACAM1 усиливают секрецию IFN-γ LAK-клетками человека в присутствии злокачественных клеток человека. LAK-клетки человека инкубировали с CM-24 в различных концентрациях в течение 30 мин при 37°C. Клетки рака легкого человека H358 (11A) или H460 (11B) добавляли для инкубации в течение 24 ч. Секрецию IFN-γ измеряли посредством ELISA. Результаты соответствуют среднему значению ± SE для величин высвобождения гранзимы В для 3 повторов на обработку. *P < 0,05, парный T-критерий по сравнению с эффекторами + клетки-мишени со средой отдельно.

На фиг. 12A и 12B представлена корреляция между экспрессией типов CEACAM1: CEACAM1-длинный (A) и CEACAM1-короткий (B), и устойчивость к ингибиторам мутантов B-Raf в злокачественных клетках.

На фиг. 13A представлены пиктограммы легких, извлеченных из мышей, которым были пересажены клетки меланомы и которых лечили в соответствии с группами лечения, указанными на чертеже; на фиг. 13B представлена средняя масса опухоли в каждой группе лечения; и на фиг. 13C представлено количество очагов повреждения на мышь в каждой группе лечения.

На фиг. 14 представлена столбиковая диаграмма, на которой показан процент занятости рецептора CEACAM1 в TIL-клетках, выделенных в модели очагов повреждения легкого.

На фиг. 15A и 15B представлены аминокислотные последовательности легкой и тяжелой цепей подвергнутого обратной мутации гуманизированного mAb против CEACAM1, обозначаемого как CM-24, в настоящее время проходящего клинические испытания. На фиг. 15A представлена последовательность легкой цепи (SEQ ID NO: 52), где аминокислотные остатки 1-107 представляют собой вариабельную область, включающую CDR, и аминокислотные остатки 108-214 (полужирным шрифтом) представляют собой константную область легкой цепи к. На фиг. 15B, на которой показана последовательность тяжелой цепи (SEQ ID NO: 53), аминокислотные остатки 1-120 представляют собой вариабельную область, аминокислотные остатки 121-447 (полужирным шрифтом) представляют собой константную область тяжелой цепи IgG4, и спрогнозированный участок N-гликозилирования (аспарагин 297) подчеркнут. На фиг. 15C, на которой показана последовательность тяжелой цепи (SEQ ID NO: 59), аминокислотные остатки 1-121 представляют собой вариабельную область, аминокислотные остатки 122-450 (полужирным шрифтом) представляют собой константную область тяжелой цепи IgG1, и спрогнозированный участок N-гликозилирования (аспарагин 300) подчеркнут.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к не полностью гуманизированным моноклональным антителам, которые распознают CEACAM1. Преимущественно антитела по изобретению являются практически полностью гуманизированными, таким образом, избегая риска неблагоприятного иммунного ответа на антитела, и, таким образом, являются безопасными для применения *in vivo* у человека. Антитела по изобретению характеризуются наличием уникальной последовательности CDR и новых не полностью гуманизированных последовательностей и конструкции каркасной области. Уникальные свойства моноклональных антител по настоящему изобретению расширяют их терапевтическую применимость для лечения и диагностики дополнительных типов злокачественных опухолей и различных инфекций. Более конкретно моноклональные антитела, предоставленные в рамках настоящего изобретения, имеют конкретные комбинации CDR и не полностью гуманизированные последовательности каркасной области и обладают уникальными свойствами и улучшенной безопасностью и эффективностью относительно известных не являющихся человеческими антител человека против CEACAM1.

Уникальные свойства антител, предоставленных в рамках настоящего изобретения, обеспечивают несколько преимуществ для применения этих антител у человека, в частности в применениях, требующих длительного или повторяющегося введения, когда другие, не являющиеся человеческими, антитела не могут быть введены ввиду опасений индукции иммуногенного ответа на сами по себе не являющиеся человеческими антитела. Избегание такого иммунного ответа становится более важным, когда подвергаемому лечению индивидуумом является пациент, страдающий заболеванием, где следует избегать дальнейшего ухудшения здоровья пациента. Кроме того, в другом аспекте настоящее изобретение относится к не полностью гуманизованному моноклональному антителу, содержащему: (i) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3 соответственно, и аминокислотную последовательность не CDR (каркасная область), которая отличается 2-9 аминокислотами от аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 9; и/или (ii) переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6 соответственно, и аминокислотную последовательность не CDR, которая отличается 2-4 аминокислотами от аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 13; и к его аналогам, производным и антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически распознают SEACAM1 человека.

Для ясности следует подчеркнуть, что переменные области антител, предоставленных в рамках настоящего изобретения, содержат: (a) последовательности CDR, ранее описанные авторами настоящего изобретения, и (b) последовательности каркасной области, также обозначаемые в настоящем описании как последовательности не CDR, по меньшей мере одна из которых отличается по меньшей мере одним остатком от соответствующей полностью человеческой последовательности каркасной области.

В определенных вариантах осуществления выражение "последовательность, которая отличается от другой последовательности", как используют в рамках изобретения, означает последовательность, которая содержит замену по меньшей мере одной аминокислоты, вставку по меньшей мере одной аминокислоты, делецию по меньшей мере одной аминокислоты или любую их комбинацию по сравнению с соответствующей последовательностью. В определенных вариантах осуществления выражение "последовательность, которая отличается от другой последовательности", как используют в рамках изобретения, означает последовательность, которая содержит замену по меньшей мере одной аминокислоты по сравнению с соответствующей последовательностью. Термин "последовательность не CDR", как используют в рамках изобретения, относится к последовательности каркасной области, а именно к любой аминокислотной последовательности, содержащейся в переменной области антитела, которая не является последовательностью CDR, идентифицированной в рамках настоящего изобретения. Примеры последовательности не CDR включают последовательности, предшествующие или соседние с CDR1, последовательности между CDR1 и CDR2, последовательности между CDR2 и CDR3 и последовательности после или соседние с CDR3.

Поскольку переменные области антител, предоставленных в рамках настоящего изобретения, отличаются по меньшей мере одной аминокислотой от переменных областей полностью человеческих антител, их также называют "не полностью гуманизованными" и "не полностью человеческими" антителами.

Термин "SEACAM1" используют для обозначения белкового продукта гена SEACAM1, например, NP_001020083.1, NP_001703.2. У человека на настоящий момент обнаружено 11 различных вариантов SEACAM1 по сплайсингу. Индивидуальные изоформы SEACAM1 отличаются количеством внеклеточных иммуноглобулинподобных доменов (например, SEACAM1 с четырьмя внеклеточными иммуноглобулинподобными доменами известен как SEACAM1-4), закориванием на мембране и/или длиной их цитоплазматической хвостовой части (например, SEACAM1-4 с длинной цитоплазматической хвостовой частью известен как SEACAM1-4L, и SEACAM1-4 с короткой цитоплазматической хвостовой частью известен как SEACAM1-4S). N-концевой домен SEACAM1 начинается непосредственно после сигнального пептида и его структура считается структурой IgV-типа. Например, в аннотации P13688 для SEACAM1, N-концевой домен IgV-типа состоит из 108 аминокислот, от аминокислоты 35 до аминокислоты 142. Этот домен был идентифицирован как ответственный за гомофильную активность связывания (Watt et al., 2001, Blood. 98, 1469-79). Все варианты, включая эти варианты по сплайсингу, включены в термин "SEACAM1".

Термины "антитело против SEACAM1", "антитело, которое распознает SEACAM1", "антитело против SEACAM1" и "антитело к SEACAM1" являются взаимозаменяемыми, и их используют в настоящем описании для обозначения антитела, которое связывается с белком SEACAM1 с достаточной аффинностью и специфичностью.

Термин "антиген", как используют в рамках изобретения, относится к молекуле или части молекулы, способной индуцировать образование антител и связываться антителом. Антиген может иметь один или более одного эпитопа. Специфическая реакция, упоминаемая выше, указывает на то, что антиген реагирует высокоселективным образом с соответствующим антителом и не реагирует с множеством других антител, которые могут индуцироваться другими антигенами. Антиген в соответствии с настоящим

изобретением представляет собой белок SEACAM1 или его фрагмент.

Термин "антигенная детерминанта" или "эпитоп", как используют в рамках изобретения, относится к области молекулы антигена, которая специфически реагирует с конкретным антителом. Пептидные последовательности, происходящие из эпитопа, можно использовать, отдельно или совместно с частью-носителем, применяя способы, известные в данной области, для иммунизации животных и для получения дополнительных поликлональных или моноклональных антител. Выделенные пептиды, происходящие из эпитопа, можно использовать в диагностических способах для обнаружения антител и в качестве лекарственных средств, когда требуется ингибирование указанных антител.

Антитела, или иммуноглобулины, содержат две тяжелых цепи, связанных вместе дисульфидными связями, и две легких цепи, причем каждая из легких цепей связана с соответствующей тяжелой цепью дисульфидными связями в "Y"-образной конфигурации. Протеолитическое расщепление антитела обеспечивает домены Fv (фрагмент варибельный) и Fc (фрагмент кристаллический).

Антигенсвязывающие домены, Fab, включают области, в которых полипептидная последовательность варьируется. Термин F(ab')₂ соответствует двум плечам Fab', связанным вместе дисульфидными связями. Центральную ось антитела называют Fc-фрагментом. Каждая тяжелая цепь имеет на одном конце варибельный домен (V_H), за которым следует ряд константных доменов (C_H). Каждая легкая цепь имеет варибельный домен (V_L) на одном конце и константный домен (C_L) на ее другом конце, варибельный домен легкой цепи расположен параллельно варибельному домену тяжелой цепи, и константный домен легкой цепи расположен параллельно первому константному домену тяжелой цепи (CH1). Варибельные домены каждой пары легкой и тяжелой цепей образуют антигенсвязывающий центр. Домены на легкой и тяжелой цепях имеют одинаковую общую структуру и каждый домен содержит четыре каркасных области, последовательности которых являются относительно консервативными, связанных тремя гиперварибельными доменами, известными как определяющие комплементарность области (CDR 1-3). Эти домены вносят вклад в специфичность и аффинность антигенсвязывающего центра. Изотип тяжелой цепи (γ, α, δ, ε или μ) определяет класс иммуноглобулина (IgG, IgA, IgD, IgE или IgM соответственно). Легкая цепь представляет собой любой из двух изотипов (каппа, κ, или лямбда, λ), встречающихся во всех классах антител.

Термин "антитело" используют в наиболее широком значении, и он включает моноклональные антитела (включая полноразмерные или интактные моноклональные антитела), поликлональные антитела, поливалентные антитела, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), и фрагменты антител, достаточно длинные для того, чтобы они проявляли желаемую биологическую активность.

Антитело в соответствии с настоящим изобретением представляет собой молекулу, содержащую по меньшей мере антигенсвязывающую часть антитела. Антитело или антитела согласно изобретению включают интактные антитела, такие как поликлональные антитела или моноклональные антитела (mAb), а также их протеолитические фрагменты, такие как фрагменты Fab или F(ab')₂. Одноцепочечные антитела также входят в объем настоящего изобретения.

"Фрагменты антител" содержат только часть интактного антитела, обычно включающую антигенсвязывающий центр интактного антитела и, таким образом, сохраняющую способность связывать антиген. Примеры фрагментов антител, охватываемых настоящим определением, включают:

- (i) Fab-фрагмент, имеющий домены VL, CL, VH и CH1;
- (ii) Fab'-фрагмент, который представляет собой Fab-фрагмент, имеющий один или несколько остатков цистеина на C-конце домена CH1;
- (iii) Fd-фрагмент, имеющий домены VH и CH1;
- (iv) Fd'-фрагмент, имеющий домены VH и CH1, и один или несколько остатков цистеина на C-конце домена CH1;
- (v) Fv-фрагмент, имеющий домены VL и VH одного плеча антитела;
- (vi) dAb-фрагмент (Ward et al., Nature 1989, 341, 544-546), который состоит из VH-домена;
- (vii) выделенные области CDR;
- (viii) F(ab')₂-фрагменты, двухвалентный фрагмент, включающий два Fab'-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области;
- (ix) одноцепочечные молекулы антител (например, одноцепочечный Fv; scFv) (Bird et al., Science 1988, 242, 423-426; и Huston et al., PNAS (USA) 1988, 85, 5879-5883);
- (x) "диантитела" с двумя антигенсвязывающими центрами, содержащие варибельный домен тяжелой цепи (VH), связанный с варибельным доменом легкой цепи (VL) в одной полипептидной цепи (см., например, EP 404097; WO 93/11161; и Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90, 6444-6448);
- (xi) "линейные антитела", содержащие пару tandemных Fd-сегментов (VH-CH1-VH-CH1), которые вместе с комплементарными полипептидами легкой цепи образуют пару антигенсвязывающих областей (Zarata et al. Protein Eng., 1995, 8, 1057-1062; и патент США № 5641870).

Одноцепочечные антитела могут представлять собой одноцепочечные составные полипептиды, обладающие способностью связывать антиген и содержащие аминокислотные последовательности, гомо-

логичные или аналогичные вариабельным областям легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина, т.е. связанным V_H - V_L или одноцепочечному Fv (scFv).

Термин "нейтрализующее антитело", как используют в рамках изобретения, относится к молекуле, имеющей антигенсвязывающий центр к конкретному рецептору или лиганду-мишени, способным снижать или ингибировать (блокировать) активность или передачу сигнала через рецептор при определении с использованием анализов *in vivo* или *in vitro* согласно спецификации.

Термин "моноклональное антитело", как используют в рамках изобретения, относится к антителу, получаемому из совокупности, по существу, однородных антител, т.е. индивидуальные антитела, составляющие совокупность, являются идентичными, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифическими, будучи направленными против одного антигена. Более того, в противоположность препаратам поликлональных антител, которые, как правило, включают различные антитела, направленные против различных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты на антигене. Определение "моноклональные" не следует истолковывать как требующее получения антитела каким-либо конкретным способом.

Моноклональные Ab можно получать способами, известными специалистам в данной области. Например, моноклональные антитела, подлежащие применению в соответствии с настоящим изобретением, можно получать способом гибридом, впервые описанным Kohler et al., Nature 1975, 256, 495, или их можно получать способами рекомбинантных ДНК (см., например, патент США № 4816567). "Моноклональные антитела" также можно выделять из фаговых библиотек антител с использованием способов, описанных, например, в Clackson et al., Nature 1991, 352, 624-628 или Marks et al., J. Mol. Biol., 1991, 222:581-597.

mAb по настоящему изобретению могут относиться к любому классу иммуноглобулинов, включая IgG, IgM, IgE или IgA. Гибридому, продуцирующую mAb, можно культивировать *in vitro* или *in vivo*. Высокие титры mAb можно получать посредством продуцирования *in vivo*, где клетки из отдельных гибридом инъецируют внутривенно стимулированных пристином мышей Balb/c для получения асцитной жидкости, содержащей высокие концентрации желаемых mAb. Моноклональные Ab изотипа IgM или IgG можно очищать из таких асцитных жидкостей или из культуральных супернатантов с использованием способов колоночной хроматографии, хорошо известных специалистам в данной области.

Термин "антитело" человека, как используют в рамках изобретения, относится к антителу, которое обладает аминокислотной последовательностью, которая соответствует аминокислотной последовательности антитела, продуцируемой у человека и/или полученной с использованием любого из способов получения антител человека, как описано в настоящем описании. Это определение антитела человека, в частности, не включает гуманизированное антитело, содержащее не являющиеся человеческими антигенсвязывающие остатки. Антитела человека можно получать с использованием различных способов, известных в данной области.

Термины "молекула, имеющая антигенсвязывающую часть антитела" и "антигенсвязывающие фрагменты", как используют в рамках изобретения, включает не только интактные молекулы иммуноглобулинов любого изотипа и продуцированные любой клеточной линией животного или микроорганизмом, но также их антигенсвязывающую реакционноспособную фракцию, включающую, но не ограничивающуюся ими, Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент, вариабельную часть их тяжелой и/или легкой цепей, миниантитела Fab (см. WO 93/15210, патентная заявка США 08/256790, WO 96/13583, патентная заявка США 08/817788, WO 96/37621, патентная заявка США 08/999554, полное содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылки), димерные биспецифические миниантитела (см. Muller et al., 1998) и одноцепочечные антитела, включающие такую реакционноспособную фракцию, а также любой другой тип молекулы, в которую такая реактивная часть антитела физически встроена. Такие молекулы могут быть предоставлены посредством любого известного способа, включая, но не ограничиваясь ими, ферментативное расщепление, пептидный синтез или рекомбинантные способы.

Также изобретение относится к консервативным аминокислотным вариантам молекул антител согласно изобретению. Также можно получать варианты согласно изобретению, которые сохраняют общую молекулярную структуру кодируемых белков. Учитывая свойства индивидуальных аминокислот, содержащих описанные белковые продукты, некоторые рациональные замены будут понятны квалифицированному специалисту. Аминокислотные замены, т.е. "консервативные замены" можно вносить, например, исходя из сходства полярности, заряда, растворимости, гидрофобности, гидрофильности и/или амфифильной природы вовлеченных остатков. Термин "аналог антитела", как используют в рамках изобретения, относится к антителу, полученному из другого антитела посредством одной или нескольких консервативных замен.

Термин "вариант антитела", как используют в рамках изобретения, относится к любой молекуле, содержащей антитело по настоящему изобретению. Например, слитые белки, в которых антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связаны с другой химической структурой, считаются вариантами антител.

Термин "не полностью гуманизированное моноклональное антитело", как используют в рамках изо-

бретения, относится к моноклональному антителу, имеющему вариабельные домены тяжелой цепи и/или легкой цепи, в которых аминокислотные последовательности, фланкирующие и/или непосредственно соседние с CDR, не являются полностью человеческими, т.е. не являются идентичными каким-либо гомологичным или соответствующим последовательностям, взятым из природных антител человека.

В фармацевтических и лекарственных составах активное вещество предпочтительно используют вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемым носителем(ями) и необязательно любыми другими терапевтическими ингредиентами. Носитель(и) должен быть фармацевтически приемлемым с точки зрения совместимости с другими ингредиентами состава, и не должен быть чрезмерно вредоносным для их реципиента. Активное вещество предоставляют в количестве, эффективном для достижения желаемого фармакологического эффекта, как описано выше, и в количестве, подходящем для достижения желаемой суточной дозы.

Как правило, молекулы по настоящему изобретению, содержащие антигенсвязывающую часть антитела или содержащие другой полипептид, включающий пептидный миметик, суспендируют в стерильном солевом растворе для терапевтических применений. Альтернативно, фармацевтические композиции можно составлять для контроля высвобождения активного ингредиента (молекула, содержащая антигенсвязывающую часть антитела) или для продления его присутствия в системе пациента. Многочисленные подходящие системы доставки лекарственных средств известны и включают, например, имплантируемые системы высвобождения лекарственных средств, гидрогели, гидроксиметилцеллюлозу, микрокапсулы, липосомы, микроэмульсии, микросферы и т.п. Препараты с контролируемым высвобождением можно получать с использованием полимеров для комплексообразования или адсорбции молекулы в соответствии с настоящим изобретением. Например, биосовместимые полимеры включают матрицы из сополимера этилена и винилацетата и матрицы из полиангидридного сополимера димера стеариновой кислоты и себациновой кислоты. Скорость высвобождения молекулы в соответствии с настоящим изобретением, т.е. антитела или фрагмента антитела, из такого матрикса зависит от молекулярной массы молекулы, количества молекул в матриксе и размера диспергированных частиц.

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно вводить любыми подходящими способами, такими как перорально, местным путем, интраназально, подкожно, внутримышечно, внутривенно, внутриартериально, внутрисуставным путем, внутрь очага повреждения или парентерально. Обычно используют внутривенное (в/в) введение.

Специалистам в данной области будет очевидно, что терапевтически эффективное количество молекулы в соответствии с настоящим изобретением зависит, среди прочего, от схемы введения, единичной дозы вводимой молекулы, введения молекулы в комбинации с другими лекарственными средствами, иммунного статуса и здоровья пациента, терапевтической активности вводимой молекулы и мнения лечащего врача. Как используют в рамках изобретения, "терапевтически эффективное количество" относится к количеству молекулы, требуемому для смягчения одного или нескольких симптомов, ассоциированных с нарушением, подвергаемым лечению в течение периода времени.

Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству лекарственного средства, эффективному для лечения заболевания или нарушения у млекопитающего. В случае злокачественной опухоли терапевтически эффективное количество лекарственного средства может снижать количество злокачественных клеток; уменьшать размер опухоли; ингибировать (т.е. замедлять до некоторой степени и предпочтительно останавливать) инфильтрацию злокачественных клеток в периферические органы; ингибировать (т.е. замедлять до некоторой степени и предпочтительно останавливать) метастазирование опухоли; ингибировать до некоторой степени рост опухоли и/или смягчать до некоторой степени один или несколько симптомов, ассоциированных с нарушением. Если лекарственное средство может предупреждать и/или уничтожать существующие злокачественные клетки, оно может быть цитостатическим и/или цитотоксическим. Для терапии злокачественной опухоли эффективность *in vivo* можно, например, измерять путем оценки продолжительности выживания, времени до прогрессирования заболевания (TTP), частоты ответа (RR), длительности ответа и/или качества жизни.

Термин "сахар" относится к моносахаридам, дисахаридам и полисахаридам. Примеры сахаров включают, но не ограничиваются ими, сахарозу, трегалозу, декстрозу и другие.

Молекулы по настоящему изобретению в качестве активных ингредиентов растворяют, диспергируют или примешивают к эксципиенту, который является фармацевтически приемлемым и совместимым с активным ингредиентом, как хорошо известно. Подходящими эксципиентами являются, например, вода, физиологический раствор, фосфатно-солевой буфер (PBS), декстроза, глицерин, этанол и т.п. и их комбинации.

Специалистам в данной области хорошо известны другие подходящие носители. Кроме того, если желательно, композиция может содержать небольшие количества вспомогательных веществ, таких как смачивающие вещества или эмульгаторы, pH-буферные средства.

Фармацевтическую композицию в соответствии с настоящим изобретением можно вводить вместе с антинеопластической композицией. Согласно конкретному варианту осуществления антинеопластическая композиция содержит по меньшей мере одно химиотерапевтическое средство. Химиотерапевтическое средство, которое можно вводить вместе с антителом в соответствии с настоящим изобретением или

отдельно, может содержать любое такое средство, известное в данной области, которое проявляет активность против злокачественной опухоли, включая, но не ограничиваясь ими, митоксантрон, ингибиторы топоизомеразы, алкалоиды барвинка, нарушающие веретено деления винбластин, винкристин, винорелбин (таксол), паклитаксел, доцетаксел; алкилирующие средства мехлорэтамин, хлорамбуцил, циклофосфамид, мелфалан, ифосфамид; метотрексат; 6-меркаптопурин; 5-фторурацил, цитарабин, гемцитабин; подофиллотоксины этопозид, иринотекан, топотекан, дакарбазин; антибиотики: доксорубицин (адриамицин), блеомицин, митомицин; нитрозомочевину кармустин (BCNU), ломустин, эпирубицин, идарубицин, даунорубицин; неорганические ионы цисплатин, карбоплатин; интерферон, аспарагиназу; гормоны тамоксифен, леупролид, флутамид и магестрола ацетат.

Согласно конкретному варианту осуществления химиотерапевтическое средство выбрано из группы, состоящей из алкилирующих средств, антиметаболитов, аналогов фолиевой кислоты, аналогов пиримидинов, аналогов пуринов и родственных ингибиторов, алкалоидов барвинка, эпиподофиллотоксинов, антибиотиков, L-аспарагиназы, ингибитора топоизомеразы, интерферонов, координационных комплексов платины, антрацендион-замещенной мочевины, производных метилгидразина, адренокортикального супрессивного средства, адренокортикостероидов, прогестинов, эстрогенов, антиэстрогенов, андрогенов, антиандрогенов и аналогов гонадотропин-рилизинг фактора. Согласно другому варианту осуществления химиотерапевтическое средство выбрано из группы, состоящей из 5-фторурацила (5-FU), лейковорина (LV), иринотекана, оксалиплатина, капецитабина, паклитаксела и доцетаксела. Два или более химиотерапевтических средств можно использовать в коктейле для введения в комбинации с введением антитела против CEACAM1.

Термин "лечение", как используют в рамках изобретения, относится как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам. Нуждающиеся в лечении включают индивидуумов, которые уже имеют нарушение, а также индивидуумов, у которых нарушение намереваются предупредить.

Термины "злокачественная опухоль" и "злокачественный" относятся к или описывают физиологическое состояние у млекопитающих, которое, как правило, характеризуется нерегулируемым клеточным ростом. Примеры злокачественной опухоли включают, но не ограничиваются ими, карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкоз. Более конкретные примеры таких злокачественных опухолей включают меланому, рак легкого, щитовидной железы, молочной железы, толстого кишечника, предстательной железы, печени, мочевого пузыря, почки, шейки матки, поджелудочной железы, лейкоз, лимфому, миелоидную злокачественную опухоль, рак яичника, рак матки, саркому, рак желчных путей или рак эндометрия.

Термин "антинеопластическая композиция" относится к композиции, пригодной для лечения злокачественной опухоли, содержащей по меньшей мере одно активное лекарственное средство, способное ингибировать или предупреждать рост или функцию опухоли, и/или вызывать разрушение опухолевых клеток. Лекарственные средства, пригодные в антинеопластической композиции для лечения злокачественной опухоли, включают, но не ограничиваются ими, химиотерапевтические средства, радиоактивные изотопы, токсины, цитокины, такие как интерфероны, и антагонистические средства, нацеленные на цитокины, рецепторы цитокинов или антигены, ассоциированные с опухолевыми клетками. Предпочтительно лекарственное средство представляет собой химиотерапевтическое средство.

Термин "диагностика", как используют в рамках изобретения, относится к определению присутствия или отсутствия патологии, классификации патологии или симптома, определению тяжести патологии, мониторингу прогрессирования патологии, прогнозированию исхода патологии и/или определению перспектив к выздоровлению.

Термин "мутация аминокислотного остатка", как используют в рамках изобретения, относится к замене, вставке или делеции одного аминокислотного остатка. Термин "обратная мутация аминокислотного остатка", как используют в рамках изобретения, относится к замене одного аминокислотного остатка, встречающегося в каркасной области антитела человека, на соответствующий аминокислотный остаток, встречающийся в каркасной области антитела мыши.

Следующие примеры предоставлены для более подробной иллюстрации некоторых вариантов осуществления изобретения. Однако их никоим образом не следует истолковывать как ограничивающие широкий объем изобретения.

Примеры

Таблица 1

Последовательности CDR
Гуманизированное mAb в соответствии с настоящим изобретением содержит следующие шесть CDR

CDR3 V _L	CDR2 V _L	CDR1 V _L	CDR3 V _H	CDR2 V _H	CDR1 V _H
QQGKSLPRT	YTSRLHS	RTSQDIGNYLN	GDYYGGFAVDY	VINPGSGDTNYNEKF	GYAFTNNLIE
SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 3	KG SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 1

Таблица 2

Последовательности не CDR переменных областей полностью мыши и полностью человека

CDR3-X	CDR2-X-CDR3	CDR1-X-CDR2	X-CDR1	Цепь
WGQGSVTVSS (SEQ ID NO: 39)	KATLTADKSSNTAYM QLSSLTSDSAVYFC AR (SEQ ID NO: 38)	WVKQRPGQGLEWIG (SEQ ID NO: 37)	QVQLQQSGAELVRPG TSVKVSCAKS (SEQ ID NO: 36)	H мыши
WGQTTVTVSS (SEQ ID NO: 10)	RVTMTRDTSISTAYM ELSRRLSDDTAVYYC AR (SEQ ID NO: 9)	WVRQAPGQGLEWGM (SEQ ID NO: 8)	QVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSCAKS (SEQ ID NO: 7)	H человека
FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 43)	GVPSRFSGSGSGTDY SLTISNLEQEDIATY FC (SEQ ID NO: 42)	WYQQKPDGTVKLLI Y (SEQ ID NO: 41)	DIQMTQTTSSLSASL GDRVTISC (SEQ ID NO: 40)	L мыши
FGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 14)	GVPSRFSGSGSGTDF TFTISLQPEDIAATY YC (SEQ ID NO: 13)	WYQQKPGKAPKLLI Y (SEQ ID NO: 12)	DIQMTQSPSSLSASV GDRVTITC (SEQ ID NO: 11)	L человека

Таблица 3

Последовательности не CDR гуманизованных подвергнутых обратной мутации переменных областей тяжелой цепи

CDR3-X	CDR2-X-CDR3	CDR1-X-CDR2	X-CDR1	Вариант
WGQGSVTVSS (SEQ ID NO: 23)	RATL <u>TADK</u> SINTAYMELS SL <u>TS</u> SDSAVYFCAR (SEQ ID NO: 18)	WV K QAPGQGLEW I G (SEQ ID NO: 16)	QVQLVQSGAEL L KKP GASVKVSCAKS (SEQ ID NO: 15)	VH1
WGQTTVTVSS (SEQ ID NO: 10)	RATL <u>TADK</u> SINTAYMELS RLRSDDTAVY F CAR (SEQ ID NO: 19)	WV K QAPGQGLEW I G (SEQ ID NO: 16)	QVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCAKS (SEQ ID NO: 7)	VH2
WGQTTVTVSS (SEQ ID NO: 10)	RATL <u>TADK</u> SINTAYMELS RLRSDDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 20)	WVRQAPGQGLEW I G (SEQ ID NO: 17)	QVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCAKS (SEQ ID NO: 7)	VH3
WGQTTVTVSS (SEQ ID NO: 10)	RATL <u>TADK</u> SISTAYMELS RLRSDDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 21)	WVRQAPGQGLEW I G (SEQ ID NO: 17)	QVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCAKS (SEQ ID NO: 7)	VH4
WGQTTVTVSS (SEQ ID NO: 10)	RVTMT A D K SISTAYMELS RLRSDDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 22)	WVRQAPGQGLEW I G (SEQ ID NO: 17)	QVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCAKS (SEQ ID NO: 7)	VH5

*Выделенные полужирным шрифтом и подчеркнутые аминокислоты с обратными мутациями на последовательность мыши.

Таблица 4

Последовательности CDR подвергнутых обратной мутации гуманизованных
вариабельных областей легкой цепи

CDR3-X	CDR2-X-CDR3	CDR1-X- CDR2	X-CDR1	Вариант
FGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 14)	GVPSRFSGSGSGTDY T L TISSLQ Q EEDIATY F C (SEQ ID NO: 25)	WYQQKPGKAY KLLIY (SEQ ID NO: 24)	DIQMTQSPSSLSASV GDRVITIC (SEQ ID NO: 11)	VL1
FGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 14)	GVPSRFSGSGSGTDY T L TISSLQ P EEDIATY F C (SEQ ID NO: 26)	WYQQKPGKAY KLLIY (SEQ ID NO: 24)	DIQMTQSPSSLSASV GDRVITIC (SEQ ID NO: 11)	VL2
FGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 14)	GVPSRFSGSGSGTDY T F TISSLQ P EEDIATY F C (SEQ ID NO: 27)	WYQQKPGKAY KLLIY (SEQ ID NO: 24)	DIQMTQSPSSLSASV GDRVITIC (SEQ ID NO: 11)	VL3

*Выделенные полужирным шрифтом и подчеркнутые аминокислоты с обратными мутациями на последовательность мыши.

Таблица 5

Последовательности не CDR подвергнутых обратной мутации гуманизованных
вариабельных областей

SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность	Вариабельные области
28	SEQ ID NO: 15 - SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 16 - SEQ ID NO: 2 - SEQ ID NO: 18 - SEQ ID NO: 3 - SEQ ID NO: 23	Вариабельная область тяжелой цепи #1
29	SEQ ID NO: 7 - SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 16 - SEQ ID NO: 2 - SEQ ID NO: 19 - SEQ ID NO: 3 - SEQ ID NO: 10	Вариабельная область тяжелой цепи #2
30	SEQ ID NO: 7 - SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 17 - SEQ ID NO: 2 - SEQ ID NO: 20 - SEQ ID NO: 3 - SEQ ID NO: 10	Вариабельная область тяжелой цепи #3
31	SEQ ID NO: 7 - SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 17 - SEQ ID NO: 2 - SEQ ID NO: 21 - SEQ ID NO: 3 - SEQ ID NO: 10	Вариабельная область тяжелой цепи #4
32	SEQ ID NO: 7 - SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 17 - SEQ ID NO: 2 - SEQ ID NO: 22 - SEQ ID NO: 3 - SEQ ID NO: 10	Вариабельная область тяжелой цепи #5
33	SEQ ID NO: 11 - SEQ ID NO: 4 - SEQ ID NO: 24 - SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 25 - SEQ ID NO: 6 - SEQ ID NO: 14	Вариабельная область легкой цепи #1
34	SEQ ID NO: 11 - SEQ ID NO: 4 - SEQ ID NO: 24 - SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 26 - SEQ ID NO: 6 - SEQ ID NO: 14	Вариабельная область легкой цепи #2
35	SEQ ID NO: 11 - SEQ ID NO: 4 - SEQ ID NO: 24 - SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 27 - SEQ ID NO: 6 - SEQ ID NO: 14	Вариабельная область легкой цепи #3

Эталонная полностью гуманизованная последовательность тяжелой цепи (SEQ ID NO: 57), в которую вносят обратные мутации, состоит из QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSKAS (SEQ ID NO: 7) - GYAFTNLLIE (SEQ ID NO: 1) - WVRQAPGQGLEWMG (SEQ ID NO: 8) - VINPGSGDTNYNEKFKG (SEQ ID NO: 2) - RVTMTRDTSISTAYMELSRLLRSDDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 9) - GDYYGGFAVDY (SEQ ID NO: 3) - WGQGTITVTVSS (SEQ ID NO: 10).

Эталонная полностью гуманизованная последовательность легкой цепи (SEQ ID NO: 58), в которую внесены обратные мутации, состоит из DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITC (SEQ ID NO: 11) - RTSQDIGNYLN (SEQ ID NO: 4) - WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 12) - YTSRLHS (SEQ ID NO: 5) - GVPSRFSGSGSGTDFFTISSLQPEDIATYYC (SEQ ID NO: 13) - QQGKSLPRT (SEQ ID NO: 6) - FGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 14).

Пример 1. Конструирование последовательностей переосаженной области антитела с переосаженными CDR.

Структурные модели V-областей химерного антитела против CEACAM-1 получали с использованием Swiss PDB и анализировали для идентификации аминокислот в каркасных областях V-области, которые могут быть важными для связывающих свойств антитела (фиг. 1). Эти аминокислоты устанавливали для включения в один или несколько вариантов антител с переосаженными CDR. Как последовательности V_H, так и последовательности V_K CM-10 содержат типичные остатки каркасной области, и мотивы CDR 1, 2 и 3 сравнимы с многими антителами мыши. CDR были получены непосредственно из последовательности мыши. Затем модели Swiss PDB анализировали вместе с гомологией мышь/человек в ключевых положениях для установления каркасных областей и индивидуальных остатков, которые потенциально могли влиять на представление CDR.

Конструирование вариантов.

Аминокислотную последовательность V-области тяжелой и легкой цепей сравнивали против базы данных последовательностей V-области человека эмбрионального типа для идентификации последовательностей тяжелой и легкой цепей человека с наибольшей степенью гомологии для применения в качестве каркасных областей V-области. Затем конструировали серию V-областей тяжелой и легкой цепей путем пересадки CDR в каркасные области и, если необходимо, путем обратной мутации на последовательность мыши остатков, идентифицированных выше в качестве потенциально важных для сохранения эффективности связывания химерного антитела. Было определено, что небольшое количество остатков мыши должно быть сохранено в каждом варианте. Затем последовательности вариантов с наиболее низкой встречаемостью потенциальных T-клеточных эпитопов выбирали с использованием собственной технологии Antitope *in silico*, iTope™ и TCED™ (база данных T-клеточных эпитопов) (Perry et al. 2008, Bryson et al. 2010). Количество обратных мутаций определяли, начиная с последовательности мыши. Из структурного анализа было идентифицировано максимум 13 положений в V_H и 5 положений было идентифицировано в V_K в качестве остатков, которые могли быть структурно важными. Им отдавали предпочтение и конструировали варианты, которые включали различные их количества. Хотя отсутствует теоретический предел количества обратных мутаций, чем больше включено обратных мутаций, тем менее человеческой может быть последовательность. Пять V_H-цепей и три V_K-цепи конструировали с последовательностями, указанными в SEQ ID NO: 28-35.

iTope™ и TCED™.

Программное обеспечение iTope™ прогнозирует благоприятные взаимодействия между боковыми цепями аминокислот пептида и определенными связывающими карманами (в частности, положения карманов; p1, p4, p6, p7 и p9) в связывающих бороздках 34 аллелей MHC класса II человека. Определение положения ключевых связывающих остатков осуществляется посредством получения *in silico* 9-мерных пептидов, которые перекрываются на одну аминокислоту, охватывающих исследуемую белковую последовательность. Внутрилабораторное сравнение с физическими экспериментами по связыванию MHC класса II показало, что iTope™ можно использовать для успешного различения с высокой точностью пептидов, которые либо связывают, либо не связывают молекулы MHC класса II. Однако результаты следует оценивать ввиду того факта, что все прогнозирующие способы для связывания MHC класса II имманентно избыточно прогнозируют количество T-клеточных эпитопов, поскольку они не допускают других важных процессов в процессе представления антигена, таких как процессинг белка/пептида, распознавание T-клеточным рецептором или толерантность T-клеток к пептиду.

TCED™ содержит последовательности всех пептидов, ранее подвергнутых скринингу в анализах картирования T-клеточных эпитопов EpiScreen™. TCED™ используют для поиска любой исследуемой последовательности против большой (>10000 пептидов) базы данных пептидов посредством поиска в BLAST для специфической селекции сегментов, для которых ранее было показано, что они не стимулируют T-клеточные ответы. Кроме того, какие-либо области со значительной гомологией с T-клеточными эпитопами в базе данных были исключены.

Конструирование вариантов с переосаженными CDR.

Все гены вариантов областей V_H и V_K с переосаженными CDR для CM-10 синтезировали с использованием серии перекрывающихся олигонуклеотидов, которые были подвергнуты отжигу, лигированы и амплифицированы способом ПЦР для получения полноразмерных синтетических V-областей. Затем собранные варианты клонировали непосредственно в экспрессирующую векторную систему V_H-цепей и V_K-цепей как для IgG1, так и для IgG4 (S241P). Все конструкции подтверждали секвенированием.

Конструирование, экспрессия и очистка антител.

Гены химерных антител и все комбинации V_H- и V_K-цепей с переосаженными CDR (т.е. всего 15 пар

для каждого из IgG1 и IgG4 (S241P)) временно трансфицировали в клетки HEK293-EBNA (каталожный номер ATCC № CRL-10852) с использованием фосфата кальция. Смеси для временной трансфекции инкубировали в течение вплоть до пяти суток перед сбором супернатантов.

Химерные антитела и варианты СМ-10 с пересаженными CDR очищали из супернатантов временной культуры клеток на колонке с белком А-сефарозой (GE Healthcare cat. no. 110034-93), подвергли замене буфера на 1X PBS pH 7,4, и количественно определяли по OD_{280 нм} с использованием коэффициента экстинкции на основе спрогнозированной аминокислотной последовательности ($E_{c(0,1\%)} \approx 1,37-1,40$ для химерного антитела СМ-10 и его вариантов). Химерные антитела и лидирующие гуманизированные варианты анализировали посредством восстанавливающего SDS-PAGE. Наблюдали полосы, соответствующие спрогнозированным размерам цепей V_H и V_K, без признаков какой-либо контаминации (фиг. 2).

Пример 2. Конкурентное связывание очищенных антител с СЕАСАМ-1 человека.

Связывание очищенного химерного антитела СМ-10, а также химерных антител и каждым из вариантов с пересаженными CDR, с рекомбинантным СЕАСАМ-1 человека оценивали в конкурентном ELISA. Серии разведений (трехкратных) химерных или гуманизированных антител от 20 мкг/мл до 0,009 мкг/мл предварительно смешивали с постоянной концентрацией биотинилированного химерного СМ-10 (0,005 мкг/мл, конечная концентрация), а затем инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре на 96-луночном планшете для микротитрования с плоским дном Nunc Immuno MaxiSorp (Fisher, каталожный номер № DIS-971-030J), предварительно покрытым 0,5 мкг/мл рекомбинантного СЕАСАМ-1 человека (R&D Systems, каталожный номер 2244-СМ-050), разбавленного 1X PBS, pH 7,4. Обнаружение связывания биотинилированного антитела проводили с использованием стрептавидин-HRP (Sigma, каталожный номер № S5512) и субстрата ТМВ (Invitrogen, каталожный номер № 00-2023). Реакцию останавливали 3M HCl, считывали поглощение при 450 нм на устройстве для считывания планшетов Dynex Technologies MRX TC II и кривые связывания наносили на график.

Все гуманизированные варианты обеспечили сходные профили связывания с химерным СМ-10, кривые связывания для которых показаны на фиг. 3. Эти данные использовали для вычисления величин IC₅₀ для каждого антитела и их нормализовывали к IC₅₀ химерного СМ-10, как было включено в каждый ELISA и как показано в табл. 6 и 7.

Таблица 6

Величины IC₅₀ для гуманизированных вариантов против СЕАСАМ-1

Конструкция	IC ₅₀ [IgG], мкг/мл	
	Варианты IgG1	Варианты IgG4 (S241P)
VH1/VK1	0,78	0,78
VH1/VK2	0,70	0,70
VH1/VK3	0,77	0,54
VH2/VK1	0,68	0,43
VH2/VK2	0,78	0,76
VH2/VK3	0,76	0,71
VH3/VK1	0,69	0,71
VH3/VK2	0,85	0,77
VH3/VK3	0,86	0,73
VH4/VK1	0,73	0,69
VH4/VK2	0,78	0,69
VH4/VK3	0,99	0,63
VH5/VK1	0,77	0,74
VH5/VK2	0,72	0,70
VH5/VK3	0,74	0,70

Вычисленные относительные величины IC_{50} для гуманизированных вариантов антител против SEACAM-1

Конструкция	IC_{50} , приведенная к CM-10	
	Варианты IgG1	Варианты IgG4
VH1/VK1	1,46	1,52
VH1/VK2	1,32	1,36
VH1/VK3	1,44	1,05
VH2/VK1	1,29	0,84
VH2/VK2	1,24	1,26
VH2/VK3	1,21	1,16
VH3/VK1	1,10	1,16
VH3/VK2	1,36	1,26
VH3/VK3	1,37	1,23
VH4/VK1	1,15	1,15
VH4/VK2	1,24	1,17
VH4/VK3	1,56	1,06
VH5/VK1	1,17	1,23
VH5/VK2	1,09	1,16
VH5/VK3	1,12	1,17

Нормализованные данные IC_{50} продемонстрировали диапазон от 0,84 до 1,56 для всех исследованных вариантов, что указывает на то, что эффективность связывания всех антител с пересаженными CDR с SEACAM-1 человека была сравнимой с эффективностью связывания химерного CM-10.

Пример 3. Комбинирование гуманизированного mAb к SEACAM1 и антител против PD-1/PD-L.

А. Были продемонстрированы синергические эффекты антител против SEACAM1 и против PD-1 на цитотоксичность TIL-клеток человека против клеток меланомы человека. Злокачественные клетки меланомы человека (MALME 3M) выращивали в присутствии IFN- α для индукции экспрессии PD-L1. TIL-клетки человека (TIL14) инкубировали с моноклональным антителом к SEACAM1 человека (CM-24) (0,01 мкг/мл, 0,05 мкг/мл, 0,1 мкг/мл, 0,5 мкг/мл), моноклональным антителом к PD-1 человека (клон E12,2H7) или с комбинацией обоих антител (0,005, 0,025, 0,05 и 0,25 мкг/мл каждого антитела) в течение 30 мин при 37°C. Обработанные IFN- α злокачественные клетки меланомы человека добавляли для инкубации в течение ночи перед оценкой цитотоксичности. На фиг. 4 продемонстрировано, что как антитела против SEACAM1, так и антитела против PD-1, были способны связывать их соответствующие мишени на лимфоцитах человека, таких как клетки TIL, и что это связывание значительно увеличивало токсичность TIL-клеток человека против злокачественных клеток человека относительно монотерапии отдельно. Таким образом, было сделано заключение, что защита лимфоцитов от иммунодепрессивных сигналов злокачественных клеток-мишеней приводит к значительной цитотоксичности в отношении этих злокачественных клеток.

В. Также показаны синергические эффекты антител против SEACAM1 и против PD-1 на уровне гранзима В и цитотоксичность TIL-клеток человека против клеток меланомы человека, когда антитела против PD-1 добавляли перед добавлением антител против SEACAM1: злокачественные клетки меланомы человека (MALME 3M) выращивали в присутствии IFN- α для индукции экспрессии PD-L1. TIL-клетки человека (TIL14) инкубировали со средой отдельно (черный), неспецифическим IgG-антителом (0,8 мкг/мл, белый), различными концентрациями (0,05 мкг/мл, 0,1 мкг/мл, 0,2 мкг/мл, 0,4 мкг/мл, 0,8 мкг/мл) CM-24, mAb к PD-1 человека (клон E12.2H7) или комбинацией обоих антител (0,05 мкг/мл каждого, 0,1 мкг/мл каждого, 0,2 мкг/мл каждого, 0,4 мкг/мл каждого, 0,8 мкг/мл каждого). Сначала добавляли моноклональное антитело к PD-1 человека в течение 30 мин при 37°C, а затем добавляли mAb к SEACAM1 человека. Добавляли обработанные IFN- α злокачественные клетки меланомы человека для инкубации в течение ночи перед оценкой цитотоксичности. Был вычислен показатель аддитивности (CI), составивший 0,15. В том же анализе оценивали уровень цитотоксического белка гранзима В, который секретируется при активации цитотоксических клеток, с использованием коммерческого набора ELISA для гранзима В. На фиг. 5 продемонстрировано, что антитела против SEACAM1 и антитела против PD-1 способны связывать их соответствующие мишени на лимфоцитах человека, таких как TIL-клетки, и что это связывание повышает секрецию гранзима В и токсичность TIL-клеток человека против злокачественных клеток человека. На фиг. 5 вновь указано, что защита лимфоцитов от иммунодепрессивных сиг-

налов злокачественных клеток-мишеней приводит значительной цитотоксичности в отношении злокачественных клеток-мишеней, и предполагается, что выбор времени мог быть ключевым фактором в комбинированной терапии.

С. Оценивали синергические эффекты антител против CEACAM1 и против PD-L1 на уровне гранзима В и цитотоксичность ТИЛ-клеток человека против клеток меланомы человека, когда антитела против PD-L1 добавляли перед добавлением антител против CEACAM1 (данные не представлены). Клетки меланомы человека (MALME 3М) выращивали в присутствии IFN- α для индукции экспрессии PD-L1. ТИЛ-клетки человека (TIL14) инкубировали со средой отдельно (черный), неспецифическим IgG-антителом (0,8 мкг/мл, белый), различными концентрациями (0,05 мкг/мл, 0,1 мкг/мл, 0,2 мкг/мл, 0,4 мкг/мл, 0,8 мкг/мл) моноклонального антитела к CEACAM1 человека (СМ-24), моноклональным антителом к PD-L1 человека (клон 29E.2A3) или комбинацией обоих антител (0,05 мкг/мл каждого, 0,1 мкг/мл каждого, 0,2 мкг/мл каждого, 0,4 мкг/мл каждого, 0,8 мкг/мл каждого). Антитело против PD-L1 добавляли сначала в течение 30 мин при 37°C, а затем добавляли моноклональное антитело к CEACAM1 человека. Обработанные IFN- α злокачественные клетки меланомы человека добавляли для инкубации в течение ночи перед оценкой цитотоксичности. Был вычислен показатель аддитивности (CI), составивший 0,67. Результаты соответствуют среднему значению % цитотоксичности \pm SE при определении с использованием классического анализа высвобождения LDH в трех экземплярах лунок на обработку. * $P \leq 0,05$, парный Т-критерий по сравнению с антителом против PD-L1 отдельно. В том же анализе оценивали уровни цитотоксического белка гранзима В, который секретируется при активации цитотоксических клеток, посредством коммерческого набора ELISA для гранзима В. Результаты соответствуют среднему уровню гранзима В в трех экземплярах лунок на обработку. Результаты демонстрируют, что антитела против CEACAM1 и антитела против PD-L1 способны связывать их соответствующие мишени на лимфоцитах человека (таких как ТИЛ-клетки) и на злокачественных клетках человека (таких как клетки меланомы), и что это связывание увеличивает секрецию гранзима В и токсичность ТИЛ-клеток человека против злокачественных клеток человека. Кроме того, было продемонстрировано, что блокирование взаимодействий PD-1/PD-L1 и CEACAM1/CEACAM1 может приводить к синергичному эффекту и что защита лимфоцитов от иммуносупрессивного сигнала PD-1^{лимфоцит}/PD-лиганд^{злокачественная клетка} приводит к значительной цитотоксичности в отношении этих злокачественных клеток, независимо от антигена-мишени: PD-1, PD-L1 или PD-L2.

Д. Оценивали синергические эффекты антител против CEACAM1 и против PD-1 на цитотоксичность LAK-клеток человека против клеток меланомы человека, когда антитела против PD-1 добавляли перед добавлением антител против CEACAM1. Клетки меланомы человека (SKMEL28, CEACAM1-положительные, PD-L1-положительные) выращивали в присутствии IFN- α для индукции экспрессии PD-L1. LAK-клетки (лимфокин-активируемые киллерные клетки) человека, полученные путем активации РВМС от здорового донора-человека посредством IL-2 (500 единиц/мл) в течение 7 суток инкубировали со средой отдельно (белый), неспецифическим IgG-антителом (0,8 мкг/мл, черный), различными концентрациями (0,1 мкг/мл, 0,2 мкг/мл, 0,4 мкг/мл, 0,8 мкг/мл) моноклонального антитела к CEACAM1 человека (СМ-24), моноклональным антителом к PD-1 человека (клон E12.2H7) или комбинацией обоих антител (0,1 мкг/мл каждого, 0,2 мкг/мл каждого, 0,4 мкг/мл каждого, 0,8 мкг/мл каждого). Сначала добавляли моноклональное антитело к PD-1 человека в течение 30 мин при 37°C, а затем добавляли моноклональное антитело к CEACAM1 человека. Обработанные IFN- α клетки меланомы человека добавляли для инкубации в течение 24 ч перед оценкой цитотоксичности. На фиг. 6 продемонстрировано, что антитела против CEACAM1 и антитела против PD-1 способны связывать их соответствующие мишени на активированных лимфоцитах человека, таких как LAK-клетки, и что это связывание увеличивает токсичность LAK-клеток человека против злокачественных клеток человека. Был вычислен показатель аддитивности (CI), составивший $< 0,8$. Кроме того, на фиг. 6 продемонстрировано, что связывание этих антител с клетками LAK в некоторой степени взаимосвязано, что обосновывает дальнейшее исследование их механизма связывания, и что этот механизм присутствует в различных активированных лимфоцитах.

Е. Обработка антителами против CEACAM1 повышает экспрессию PD-L1 на злокачественных клетках-мишенях. NK-клетки человека (NK92MI) инкубировали с моноклональным антителом к CEACAM1 человека (10 мкг/мл СМ-24) или без него, а затем добавляли злокачественные клетки меланомы человека (SKMEL28). Клетки инкубировали в течение 24, 48 и 72 ч и уровни PD-L1 измеряли в каждый момент времени с использованием FACS-анализа. Средние уровни соотношения антитела против PD-L1 и соответствующего изотипического контроля для указанных обработок в различные моменты времени показаны на фиг. 7, демонстрируя, что экспрессия CEACAM1 и PD-L1 на злокачественных клетках действительно взаимосвязана. Добавление антител против CEACAM1 приводит к увеличению экспрессии PD-L1 на выживших злокачественных клетках, таким образом, обеспечивая дополнительное подтверждение для комбинированного лечения обоими средствами. Может быть полезным лечение злокачественной опухоли путем введения сначала антител против CEACAM1, а затем дальнейшего введения антител против PD-L1 и/или против PD-L2, поскольку количество белков PD-L1 на злокачественных клетках остается относительно высоким, что делает клетки более чувствительными к обработке антите-

лами против PD-1/PD-L1, что подразумевает, что комбинированная терапия может улучшить клинический исход. Введение различных антител в различные моменты времени, а не одновременно, максимизирует цитотоксический эффект лимфоцитов против злокачественных клеток. Без связи с какой-либо теорией или механизмом, это открытие может быть связано с другим неожиданным открытием по настоящему изобретению, согласно которому обработка антителами против CEACAM1 повышает экспрессию PD-L1 на злокачественных клетках-мишенях. Гипотетически это может служить в поддержку необходимости в множестве антител для достижения увеличенной эффективности цитотоксических лимфоцитов. Можно предусмотреть, что введение антител против PD-1 сначала блокирует молекулы PD-1 на лимфоцитах, последующее введение антител против CEACAM1 блокирует молекулы CEACAM1 на лимфоцитах и/или злокачественных клетках-мишенях и увеличивает экспрессию лигандов PD-1 на злокачественных клетках-мишенях. Однако поскольку молекулы PD-1 на лимфоцитах уже заблокированы, повышенные уровни экспрессии лигандов PD-1 на клетках-мишенях не препятствуют эффективности проявления лимфоцитами их полного цитотоксического потенциала.

Ф. Синергические эффекты антител против CEACAM1 и против PD-1 на прогрессирование опухоли у иммунокомпетентных мышей. Клетки лимфомы мыши (5×10^6 , A20) подвергали аллотрансплантации в область живота мышей Balb/C посредством подкожной инъекции на 1 сутки. На 10 сутки опухоли достигали среднего объема 45 мм^3 , и мышей случайным образом распределяли на 4 отдельных группы (11-12 мышей на группу), и им внутривенно вводили либо PBS, либо CC-1 (антитело мыши против CEACAM1, 6 мг/кг), либо PRM-1 (антитело против PD-1 мыши, 6 мг/кг), либо комбинацию CC-1 и PRM-1 (6 мг/кг каждого). Введение повторяли на 15 и 20 сутки. Наблюдали эффект моноклонального антитела к CEACAM1 человека отдельно, моноклонального антитела к PD-1 человека отдельно и комбинации обоих антител на ингибирование роста опухоли. Для этого эксперимента выбирали иммунокомпетентных мышей Balb/C, чтобы иметь возможность оценки биологической активности антител против CEACAM1 мыши и против PD-1 мыши у мышей с интактной иммунной системой и для оценки реакции всей иммунной системы против злокачественных клеток мыши. В целом, эта модель имитирует способы терапии у человека, при которых пациентам со злокачественной опухолью вводят комбинации антител против CEACAM1 человека и против PD-1/PD-L1/PD-L2 человек. Без связи с какой-либо теорией или механизмом полагают, что комбинация антител против CEACAM1 и против PD-1/PD-L1/PD-L2 может препятствовать ускользанию злокачественных клеток от активации и цитотоксичности иммунной системы пациента, таким образом, вызывая значительный ответ против злокачественной опухоли. На фиг. 8 продемонстрировано, что антитела против CEACAM1 и антитела против PD-1/PD-L1/PD-L2 способны связывать их соответствующие мишени на опухолевых клетках и/или иммунных клетках *in vivo*, и что это комбинированное связывание значительно ослабляет прогрессирование опухоли по сравнению с каждой монотерапией. Этот результат является в высокой степени важным, поскольку он подтверждает эффективность и потенциал применения комбинированных антител против CEACAM1 и против PD-1/PD-L1/PD-L2 даже при развернутых опухолях значительных объемов, которые имитируют клинические условия, когда лечат пациентов с развившимися опухолями.

Пример 4. Комбинированное лечение гуманизированным mAb к CEACAM1 и LAK-клетками.

А. Антитела против CEACAM1 увеличивают цитотоксичность LAK-клеток человека против клеток меланомы человека: клетки PBMC выделяли от здорового донора, а затем проводили активацию посредством IL-2 (500 или 1000 ед./мл) в течение 3 суток с получением популяции LAK-клеток человека. Затем LAK-клетки человека инкубировали с 0,1 мкг/мл, 0,5 мкг/мл, 2,5 мкг/мл, 5 мкг/мл или 10 мкг/мл антитела против CEACAM1 (CM-24) в течение 30 мин при 37°C . Добавляли клетки меланомы человека (SKMEL28) для инкубации в течение 24 ч, после чего определяли цитотоксичность. На фиг. 9 продемонстрировано, что хотя LAK-клетки человека сами по себе являются цитотоксичными для злокачественных клеток меланомы человека (см., например, два левых столбика), добавление антител против CEACAM1 значительно повышает цитотоксичность в отношении этих злокачественных клеток меланомы человека дозозависимым образом.

В. Антитела против CEACAM1 увеличивают цитотоксичность LAK-клеток человека против различных клеток рака поджелудочной железы и рака легкого человека. Клетки PBMC выделяли от здорового донора, а затем проводили активацию посредством IL-2 (500 ед./мл) в течение 7 суток для получения популяции LAK-клеток человека. Затем LAK-клетки человека инкубировали с от 0,1 до 10 мкг/мл антитела против CEACAM1 (CM-24), как указано, в течение 30 мин при 37°C . Добавляли три различных типа клеток рака поджелудочной железы человека: T3M4, SU8686 и PANC2 и два различных типа рака легкого человека: H358 и H460 для инкубации в течение 24 ч. На фиг. 10 продемонстрировано, что хотя LAK-клетки человека сами по себе являются цитотоксичными для злокачественных клеток поджелудочной железы человека T3M4, добавление антител против CEACAM1 значительно увеличивает цитотоксичность в отношении этих злокачественных клеток человека дозозависимым образом. Сходные результаты получали для других клеток рака поджелудочной железы и рака легкого.

С. Антитела против CEACAM1 усиливают секрецию гранзима В LAK-клетками человека в присутствии клеток рака поджелудочной железы и рака легкого человека. LAK-клетки человека инкубировали с антителом против CEACAM-1 (CM-24) в различных концентрациях в течение 30 мин при 37°C . Затем

добавляли клетки рака поджелудочной железы человека Т3М4 (А) или клетки рака легкого человека H358 (В) для инкубации в течение 24 ч. Секрцию гранзима В измеряли посредством ELISA. Результаты демонстрируют, что хотя LAK-клетки человека сами по себе продуцируют высокие уровни гранзима В, добавление антител против CEACAM1 значительно повышает уровни гранзима В дозозависимым образом.

Д. Антитела против CEACAM1 усиливают секрецию IFN- γ LAK-клетками человека в присутствии злокачественных клеток человека. LAK-клетки человека инкубировали с антителом против CEACAM-1 (СМ-24) в различных концентрациях в течение 30 мин при 37°C. Затем добавляли клетки рака легкого человека H358 или H460 для инкубации в течение 24 ч. Секрцию IFN- γ измеряли посредством ELISA. На фиг. 11 продемонстрировано, что хотя LAK-клетки человека сами по себе продуцируют высокие уровни IFN- γ , добавление антител против CEACAM1 значительно увеличивает уровни IFN- γ дозозависимым образом.

Пример 5. Экспрессия CEACAM1 коррелирует с присутствием мутаций В-Raf в злокачественных клетках.

А. Оценка биоптатов 24 пациентов с меланомой в отношении уровней экспрессии CEACAM1 и в отношении генотипа BRAF показала, что существует статистически значимая корреляция между мутацией V600E В-Raf и экспрессией CEACAM1. Более конкретно в то время как только 50% (3/6) клеток меланомы, имеющих В-Raf дикого типа, т.е. валин в положении 600, экспрессировали поддающиеся обнаружению уровни CEACAM1 (Ст 36 и менее), 100% (18/18) клеток меланомы, имеющих мутантный В-Raf, т.е. глутаминовую кислоту в положении 600, экспрессировали поддающиеся обнаружению уровни CEACAM1 (Ст 36 и менее).

В. Проводили внеклеточное окрашивание на CEACAM1 злокачественных клеток, обработанных ингибиторами В-Raf или MEK. $1,0 \times 10^6$ клеток из образца клеток В-Raf W.T. (076mel) и двух образцов клеток В-Raf V600E (526mel, 624mel) инкубировали с различными концентрациями вемурафениба или селуметиниба (0,1 мкМ или 1 мкМ) в течение 2-48 ч. В каждый момент времени определяли экспрессию CEACAM1 на клетках посредством FACS. В качестве контроля использовали объемные эквиваленты DMSO (носитель). Результаты продемонстрировали, что хотя 0,1 мкМ и 1 мкМ вемурафениба не имели какого-либо эффекта на уровни экспрессии CEACAM1 на клетках, имеющих W.T. В-Raf (076mel), 0,1 мкМ и 1 мкМ вемурафениба имели дозозависимый эффект на уровни экспрессии CEACAM1 на клетках, имеющих мутантный В-Raf (526mel, 624mel). Кроме того, результаты демонстрируют, что селуметиниб имел сходный эффект с вемурафенибом на клетки, имеющие мутантный В-Raf (526mel, 624mel), и что хотя 1 мкМ селуметиниб значительно снижал уровни экспрессии CEACAM1 на клетках, имеющих W.T. В-Raf, но мутантный N-Ras (sk-mel-2), 1 мкМ вемурафениб не имел эффекта на уровни экспрессии CEACAM1. Эти результаты, кроме того, подтверждают регуляцию CEACAM1 через конститутивно активный каскад MAPK, который в этом случае запускается мутантным N-Ras, но не мутантным В-Raf.

С. Устойчивые к ингибитору злокачественные клетки демонстрируют увеличение экспрессии CEACAM1 и восстановление активности каскада MAPK. Два чувствительных к вемурафенибу образца клеток В-Raf V600E (526mel, 624mel) и устойчивые к вемурафенибу клеточные линии, происходящие из них, инкубировали в течение 2 суток с 1 мкМ вемурафенибом. Затем клетки анализировали в отношении экспрессии белка CEACAM1 посредством FACS, как описано выше. Устойчивые к вемурафенибу клеточные линии получали путем постепенного увеличения концентрации ингибитора в культуре вплоть до 0,32 мкМ. Было продемонстрировано, что устойчивые к вемурафенибу клеточные линии экспрессировали более высокие уровни CEACAM1, чем чувствительные к вемурафенибу клеточные линии. Активность MAPK измеряли в образцах чувствительных к вемурафенибу и устойчивых к вемурафенибу клеток В-Raf V600E (624mel) путем иммуноблоттинга в отношении фосфорилированной ERK1/2 (pERK, Thr202/Tyr204), тотальной ERK1/2 и актина после воздействия 160 нМ вемурафениба в течение 24 ч. В чувствительных к вемурафенибу клетках В-Raf V600E вемурафениб практически полностью устраняет фосфорилирование ERK1/2, где активность MAPK практически не прерывалась вемурафенибом в устойчивых к вемурафенибу клетках V600E В-Raf.

Д. Устойчивые к ингибитору злокачественные клетки повышают экспрессию CEACAM1. Клетки меланомы В-Raf V600E 526mel культивировали в присутствии 1 мкМ вемурафениба.

Культивирование проводили в RPMI 1640, дополненной 1 мМ пируватом Na, 1 мМ Pen-Strep, 1 мМ L-глутамином, 1 мМ неосновными аминокислотами и 10% инактивированной нагреванием эмбриональной телячьей сывороткой. Первоначальная концентрация вемурафениба составляла 0,01 от определенной IC₅₀ (0,64 нМ). Каждую неделю концентрацию удваивали вплоть до 5-кратной IC₅₀ (320 нМ), получая устойчивые к вемурафенибу клетки меланомы. Затем клетки исследовали в отношении экспрессии CEACAM1 с использованием MRG1 (антитело мыши к CEACAM1 человека) в проточной цитометрии, как описано выше. Тотальную РНК экстрагировали TRIZOL и кДНК получали с использованием обратной транскриптазы в соответствии со стандартными протоколами. Хотя вемурафениб подавляет экспрессию CEACAM1 в клетках меланомы В-Raf V600E, уровни экспрессии CEACAM1 в этих клетках повы-

шаются, когда они приобретают устойчивость к вемурафенибу. Важно отметить, что уровни SEACAM1 в клетках меланомы B-Raf V600E после приобретения устойчивости к вемурафенибу являются более высокими, чем уровни SEACAM1 в необработанных (наивных по вемурафенибу) клетках меланомы B-Raf V600E.

Е. Устойчивые к ингибитору злокачественные клетки повышают экспрессию обоих типов SEACAM1. Чувствительные к вемурафенибу и устойчивые к вемурафенибу клетки меланомы B-Raf V600E 526mel, упомянутые выше, исследовали в отношении типа SEACAM1, сверхэкспрессируемого при приобретении устойчивости к вемурафенибу, способом qPCR. Данные, представленные на фиг. 12А и 12В, демонстрируют, что экспрессия обоих типов SEACAM1: SEACAM1-длинного (12А) и SEACAM1-короткого (12В) приблизительно в три раза повышена в устойчивых к вемурафенибу клетках по сравнению с чувствительными к вемурафенибу клетками.

Ф. Ингибиторы B-Raf/MEK увеличивают индуцируемую Т-клетками цитотоксичность. Два образца чувствительных к вемурафенибу клеток B-Raf V600E (526mel, 624mel) исследовали в отношении жизнеспособности в присутствии цитотоксических Т-клеток с 1 мкМ вемурафенибом или без него. Клетки меланомы преинкубировали с 1 мкМ вемурафенибом, а затем совместно инкубировали в течение ночи с совпадающими по HLA-A2 совпадающими по антигену Т-клетками в соотношении эффектор:мишень 5:1. Уничтожение клеток определяли по высвобождению LDH. Было продемонстрировано, что вемурафениб значительно повышает чувствительность клеток меланомы к цитотоксическим Т-клеткам. Ингибиторы B-Raf/MEK и антитела к SEACAM1 повышают индуцируемую Т-клетками цитотоксичность к злокачественным клеткам *in vitro*.

Пример 6. Эффект SM-24 против злокачественных клеток при различных дозах *in vivo*.

Мышам SCID-NOD трансплантировали в/в 5×10^6 клеток меланомы (клеточная линия MEL526), и их лечили в течение 44 суток в соответствии с группами введения, указанными на фиг. 13. Антитела вводили два раза в неделю посредством в/в инъекции и 10×10^6 TIL вводили в/в каждые 10 суток. На 49 сутки мышей умерщвляли и легкие извлекали, фотографировали (фиг. 13А), взвешивали (фиг. 13В) и очаги повреждения подсчитывали (фиг. 13С). Фиг. 13А - цифровые фотографии легких мышей непосредственно после сбора. Фиг. 13В - массу опухоли вычисляли путем вычитания массы легкого из средней массы легкого различных групп введения. Результаты соответствуют среднему значению массы опухоли \pm SE для 7-8 мышей на группу введения. Фиг. 13С - количество очагов повреждения легких у отдельных мышей в различных группах; черные линии соответствуют средним значениям для групп; легкие с не поддающимися подсчету очагами повреждения оценивали как 100. Для вычисления статистической значимости между группами использовали парный Т-критерий, *P<0,05, **P<0,025.

Лечение SM-24 в присутствии TIL приводило к устойчивому ингибированию роста опухоли, что можно было оценить по морфологии легких (фиг. 13А), массе опухоли (фиг. 13В) и количеству очагов повреждения в легких (фиг. 13С), в то время как мыши, которым вводили контрольный IgG, продемонстрировали массивную опухолевую нагрузку и многочисленные очаги меланомы в легком. В группе, в которой вводили реактивные Т-клетки человека против меланомы с контрольным антителом (TIL + IgG), наблюдали только умеренное ингибирование роста опухоли (TGI 47%), однако когда добавляли SM-24, была продемонстрирована значительная и зависящая от дозы активность против злокачественной опухоли при всех дозах (TGI 84%, 87%, 90% и 93% в дозах 1,3, 6 и 10 мг/кг соответственно) со статистической значимостью в дозах 6 и 10 мг/кг (фиг. 13В). Цифровые фотографии легких в день завершения анализа (фиг. 13А) продемонстрировали практически нормальную морфологию легких у мышей, которых лечили SM-24 в присутствии TIL, таким образом, указывая на то, что SM-24 в присутствии TIL практически полностью устраняет злокачественные клетки.

В группе, в которой вводили TIL и IgG-контроль, также наблюдали некоторый противоопухолевый эффект, как и ожидалось. Однако при сравнении эффекта с мышами, которых лечили SM-24, в значениях TGI, количества очагов повреждения легких и морфологии легких, наблюдали значительные различия.

Оценка количества очагов повреждения в легких выявила очень низкие количества очагов повреждения в легких у всех мышей, которых лечили TIL и различными дозами SM-24, и ни в одном из этих легких не было обнаружено более 10 очагов повреждения. С другой стороны, в группах IgG или TIL + IgG несколько животных продемонстрировали высокие количества очагов повреждения (>100) и средние значения для группы были значительно более высокими, чем у мышей, которых лечили SM-24 (фиг. 13С) (100 и 45 в группах IgG и TIL + IgG по сравнению с 5, 6, 3 и 2 в группах лечения SM-24; P<0,025).

Эти эффекты наблюдали при концентрациях только 1 мг/мл, однако они были статистически значимыми в значениях массы легкого при концентрациях SM-24 6 и 10 мг/кг.

Особые примечания: 1 мышшь из группы IgG продемонстрировала тяжелые клинические проявления, в том числе паралич конечностей, и она была умерщвлена на 33 сутки (была обнаружена массивная опухолевая нагрузка в легком); 1 мышшь из группы TIL+ IgG продемонстрировала признаки болезненности и погибла на 49 сутки, в день завершения анализа (было обнаружено несколько очагов повреждения); 1 мышшь из группы TIL+ SM-24 продемонстрировала тяжелые клинические проявления и сниженную массу тела и была умерщвлена на 39 сутки (не было обнаружено признаков очагов повреждения); 3 мышши из

группы PBS продемонстрировали тяжелые клинические проявления в ходе эксперимента и были умерщвлены на 42 сутки, и другие две мыши были умерщвлены на 48 сутки (у всех мышей была обнаружена массивная опухолевая нагрузка, включающая высокое количество очагов повреждения в легком).

В день завершения исследования использовали проточно-цитометрический анализ в комбинации с набором QuantiBrite KIT для определения занятости рецептора CEACAM1 посредством CM-24 в TIL человека, выделенных из легких подвергнутых лечению мышей. Величины занятости рецепторов (RO) у мышей, которых лечили различными дозами CM-24, продемонстрировали (фиг. 14), что RO 50% могла быть приписана концентрациям 1 мг/кг (сывороточный уровень CM-24 в крови), и >90% RO была продемонстрирована при дозах 3, 6 и 10 мг/кг (сывороточные уровни CM-24 0,3, 48,5 и 111 мкг/мл соответственно). Исследование величин RO для CEACAM1 проводили с использованием проточно-цитометрического анализа с использованием конъюгированного с PE антитела CM-24 и набора QuantiBrite Kit (BD). Результаты соответствуют среднему значению \pm SE для величин RO на TIL, выделенных из легкого 8-9 мышей на группу лечения. Данные анализировали с использованием программного обеспечения Kaluza.

Из представленных выше данных очевидно, что значительное ингибирование роста опухоли наблюдали у мышей, которых лечили CM-24 в присутствии TIL, что приводило практически к полному устранению злокачественных клеток. Хотя все дозы CM-24 продемонстрировали эффективные ответы против злокачественной опухоли, возрастающие дозы продемонстрировали корреляцию с более высокими величинами ингибирования роста опухоли (TGI 84, 87, 90 и 93, соответствующий дозам 1, 3, 6 и 10 мг/кг соответственно), которые были также статистически значимыми. Результаты RO *ex vivo* демонстрируют RO >90% в дозах 3, 6 и 10 мг/кг (сывороточные уровни CM-24 0,3, 48,5 и 111 мкг/мл соответственно), в то время как в дозе 1 мг/кг была выявлена RO 50%. При оценке данных RO для мышей, которых лечили CM-24 в дозе 1 мг/кг, хотя сывороточные концентрации CM-24 являются очень низкими, данные RO демонстрируют, что CM-24 все еще связывается с TIL в легких, подразумевая, что CM-24 может опосредовать длительный эффект в опухолевом микроокружении *in vivo*.

Эти результаты подтверждают действие CM-24 в качестве усилителя цитотоксической активности эффекторных клеток против злокачественных клеток и демонстрируют, что CM-24 является эффективным средством против злокачественной опухоли.

Пример 7. Обобщение доклинических данных.

CM-24 представляет собой гуманизированное моноклональное IgG4-антитело против CEACAM1 человека, которое связывает N-концевой домен CEACAM1 и блокирует внутриклеточное взаимодействие через CEACAM1 между активированными лимфоцитами и опухолевыми клетками; таким образом, блокада взаимодействий CEACAM1 посредством CM-24 предложена для усиления активности уничтожения лимфоцитами и является перспективным направлением иммунотерапии злокачественной опухоли.

CM-24 демонстрирует высокую аффинность и селективное связывание с CEACAM1 человека, который экспрессируется активированными лимфоцитами или опухолевыми клетками. Данные в иммуномодулирующих моделях *in vitro* продемонстрировали, что CM-24 является мощным блокатором внутриклеточных взаимодействий CEACAM1-CEACAM1 и может усиливать цитотоксическое уничтожение различных положительных по CEACAM1 человека опухолевых клеток положительными по CEACAM1 NK и лимфокин-активируемыми киллерными (LAK) клетками и инфильтрирующими опухоль лимфоцитами (TIL). Усиленная активность уничтожения, индуцируемая CM-24, может опосредоваться гранзимом В и секрецией IFN γ , как продемонстрировано в различных моделях.

CM-24 усиливает цитотоксическую активность эффекторных клеток в присутствии положительных по CEACAM1 опухолевых клеток и в контексте специфической реакции ограниченных по лейкоцитарному антигену человека (HLA) Т-клеток. CM-24 не усиливает цитотоксическую активность эффекторных лимфоцитов против положительных по CEACAM1 не являющихся мишенями клеток (нормальные клетки человека). Кроме того, данные показывают, что CM-24 не имеет лигандподобных агонистических эффектов, связанных с Fc эффекторных функций или прямых эффектов. Связывание CM-24 с CEACAM1 не индуцирует агонистическую активность, и в отсутствие клеток-мишеней нельзя было наблюдать эффекта CM-24 на эффекторные клетки, как продемонстрировано в функциональных анализах *in vitro*. Также ожидается, что CM-24 не индуцирует антителозависимую клеточно-опосредуемую цитотоксичность (ADCC) или комплементзависимую цитотоксичность (CDC), поскольку оно представляет собой IgG4, который неспособен связывать компонент комплемента C1q и медиатор ADCC Fc γ -RIIIa и не имеет прямого эффекта на скорость пролиферации или жизнеспособность положительных по CEACAM1 первичных клеток (лимфоциты, эпителиальные и эндотелиальные клетки).

Различные модели с ксенотрансплантатом опухоли *in vivo* демонстрируют, что CM-24 имеет отчетливую активность против злокачественной опухоли, которая сопровождается увеличением иммунологической активности Т-клеток в опухоли.

Блокада CEACAM1 может смягчать опосредуемое CEACAM1 ингибирование положительных по CEACAM1 инфильтрирующих опухоль лимфоцитов, встречающих положительные по CEACAM1 злокачественные клетки, в микроокружении опухоли. Ожидается, что иммунологическим эффектом будет

усиление локального иммунного ответа против опухолевых клеток, которое, как ожидается, приведет к их устранению и последующей клинической регрессии.

Доклиническая оценка безопасности CM-24 включала оценку эффекта CM-24 на пролиферацию Т-клеток и секрецию провоспалительных цитокинов. Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) человека и цельную кровь от 10 здоровых доноров оценивали, и антитела предоставляли как в растворимой, так и в иммобилизованной форме. Отсутствовала заметная индуцируемая CM-24 пролиферация и отсутствовала значительная секреция провоспалительных цитокинов в формате стимуляции растворимым или иммобилизованным путем покрытия сухим антителом.

Исследование с повторяющейся дозой в течение 6 недель проводили у макаков-резус для оценки токсичности и токсикокинетики CM-24. CM-24 вводили посредством внутривенной (в/в) инфузии (предполагаемый клинический путь введения) раз в две недели на протяжении всего 4 доз (имитирующих предполагаемый курс лечения у пациентов с онкологическими заболеваниями) в дозах, соответствующих 2,5X (25 мг/кг) и 10X (100 мг/кг) расчетной максимальной дозе у человека (10 мг/кг). Не наблюдали явных обусловленных введением неблагоприятных реакций, макроскопических или микроскопических патологических данных и смертности. Офтальмоскопия и электрокардиография показали отсутствие данных, связанных с введением. Кроме того, было выявлено, что все тесты крови и мочи макаков-резус находились в нормальных диапазонах. В совокупности, базовое исследование токсикологии с повторяющейся дозой GLP у макаков-резус продемонстрировало отсутствие обусловленной введением токсичности при любом уровне дозы, и уровень без наблюдаемых побочных эффектов (NOEL) был определен как 100 мг/кг. Оценка токсикокинетики продемонстрировала пропорциональное дозе увеличение экспозиции CM-24 (C_{max}, AUC) при введении посредством в/в инфузии. Небольшое увеличение C_{max} и AUC на 42 сутки по сравнению с 0 сутками может указывать на потенциал к некоторому накоплению CM-24 при введении mAb посредством этого ROA и режима дозирования при этих уровнях доз. Только одно животное в группе 2 (25 мг/кг) продемонстрировало положительный ответ антитела против CM-24, что указывает на то, что ответ ADA, наиболее вероятно, не имел эффекта ни на исследование фармакокинетики, ни на исследование токсичности. Этот результат не соответствует выраженному иммуногенному ответу на повторяющееся дозирование CM-24.

Безопасная клиническая начальная доза для CM-24 на основе MABEL, определенная в экспериментах *in vivo* в моделях с ксенотрансплантатами опухолей на мышах, находится в диапазоне 0,2-1 мг/кг, включая 10-кратный коэффициент безопасности. Базовое токсикологическое исследование с повторяющейся дозой GLP у макаков-резус показало отсутствие связанной с введением токсичности на любом уровне дозой, и уровень без наблюдаемых побочных эффектов (NOEL) был определен как 100 мг/кг (эквивалентная доза для человека (HED) 100 мг/кг в расчете по весу), что отчетливо подтверждает диапазон, определенный посредством оценки MABEL. Результаты анализа пролиферации PBMC и продукции ими провоспалительных цитокинов *in vitro/ex vivo* продемонстрировали отсутствие значительной обусловленной CM-24 индукции пролиферации Т-клеток и продукции провоспалительных цитокинов.

Пример 8. Открытое многоцентровое многодозовое исследование фазы 1 с увеличением дозы CM-24 у субъектов с отдельными развернутыми или рецидивирующими злокачественными опухолями.

Для данного исследования было выбрано шесть типов опухолей: меланома, немелкоклеточная аденокарцинома легкого, рак желудка, рак ободочной и прямой кишки, рак мочевого пузыря и рак яичника, поскольку они являются репрезентативными опухолями, для которых существует высокая медицинская потребность в новых способах лечения; опухолями, для которых существует прецедент клинических ответов на другие способы иммунотерапии; и опухолями, для которых существуют подтверждающие корреляционные патологические данные, указывающие на то, что каскад CEACAM1 является важным для прогрессирования опухоли.

Исследование включает 2 фазы: часть с увеличением дозы и часть с расширением выборки. Часть с увеличением дозы длится по меньшей мере 12 недель, начиная с 4 инфузий (курс 1) для каждого индивидуума. Индивидуумов без ограничивающей дозу токсичности (DLT) и демонстрирующих признаки клинической пользы (полный ответ - CR, частичный ответ - PR, стабильное заболевание - SD), а также индивидуумы с прогрессирующим заболеванием - PRD) при визуализирующей оценке, которые в остальном являются клинически стабильными, лечат в течение вплоть до всего 5 дополнительных курсов (продолженный период лечения), которые длятся вплоть до дополнительных 38 недель лечения и по меньшей мере 25 недель наблюдения (всего 75 недель/приблизительно 15 месяцев). Часть с расширением длится вплоть до 46 недель лечения и по меньшей мере 25 недель наблюдения (всего 71 неделя/приблизительно 14 месяцев) у индивидуумов с кожной меланомой.

Первичные задачи.

1) Оценить безопасность и переносимость возрастающих многократных доз CM-24 (вводимого внутривенно) и

2) определить рекомендованную дозу CM-24 фазы 2 у субъектов с развернутыми или рецидивирующими злокачественными опухолями, включая меланому, немелкоклеточную аденокарциному легкого, рак желудка, рак ободочной и прямой кишки, рак мочевого пузыря и рак яичника.

Вторичные задачи включают:

- 1) характеристика фармакокинетического профиля многократных доз СМ-24,
- 2) характеристика иммуногенности СМ-24,
- 3) оценка предварительной эффективности, исходя из объективного ответа опухоли и длительности ответа у субъектов, которых подвергали лечению СМ-24.

Задачи исследования включают:

- 1) исследование потенциального прогностического биомаркера, ассоциированного с клинической активностью СМ-24, исходя из уровней экспрессии SEACAM1 в образцах опухоли перед лечением,
- 2) исследование иммуномодулирующей активности СМ-24 на отдельных популяциях иммунных клеток и растворимых факторах в опухолях и периферической крови,
- 3) оценка общей выживаемости у индивидуумов, которых лечили СМ-24.

Часть с увеличением дозы: дозирование исследуемого лекарственного средства планируют проводить пошаговым путем, начиная с 0,01 мг/кг и продолжая до 0,03 мг/кг, 0,1 мг/кг, 0,3 мг/кг, 1 мг/кг, 3 мг/кг и 10 мг/кг. Индивидуумам будут присваивать уровень дозы для начала исследования. Для первых двух уровней доз (0,01 мг/кг и 0,03 мг/кг) 1 пациента в каждой группе включают по ускоренной схеме, согласно которой единичная обусловленная лекарственным средством токсичность степени 2 приводит к расширению до схемы 3 + 3 при этой дозе и всех последующих дозах. Для индивидуумов в двух группах более низкой дозы (0,01 мг/кг и 0,03 мг/кг) увеличение дозы от первой группы низкой дозы с одним пациентом (0,01 мг/кг) до следующей группы (0,03 мг/кг), и от второй группы с однократной дозой (0,03 мг/кг) до следующей группы (0,1 мг/кг) начинается после окна DLT в течение 6 недель, если не происходит токсичности степени 2 или более. Для уровней доз 0,1 мг/кг и выше по меньшей мере 3 пациентов на группу включают в стандартную схему 3+3, если не происходит DLT, в случае которой группу расширяют до 6 пациентов. Расширение до следующей группы начинается только после окна DLT в течение 8 недель, начиная с первого введения исследуемого лекарственного средства первого индивидуума каждой группы.

Период дозирования включает три периода: скрининг, дозирование и наблюдение: 1) 4 повторяющихся дозы, которые включают первый курс, за которым следует период наблюдения в течение 6 недель), 2) продолжающийся период лечения (курсы 2-6) и 3) период наблюдения, включающий оценку общей выживаемости. Каждый курс лечения включает введение 4 доз исследуемого лекарственного средства каждые 2 недели. По меньшей мере 3 индивидуума на группу включают в стандартную схему 3+3. Минимальное планируемое количество индивидуумов, включенных в эту часть, составляет 17, однако оно может возрасти, если возникнет ограничивающая дозу токсичность (DLT). Если DLT возникает при данном уровне дозы, этот уровень дозы расширяют до 6 индивидуумов, таким образом, максимальное количество индивидуумов в части с увеличением дозы составляет 42.

Включенным индивидуумам проводят 4 введения, по одному каждые 2 недели (курс 1), а затем следует период наблюдения в течение 6 недель; после чего индивидуумы входят в период продолжающегося лечения, в ходе которого им проводят дополнительные курсы (2-6). В период продолжающегося лечения индивидуумам проводят клиническую и лабораторную оценку, в том числе физикальное обследование (масса тела, основные показатели жизнедеятельности и насыщаемость кислородом), оценку фармакокинетики и фармакодинамики, лабораторное тестирование набора цитокинов, а также безопасности, и анализы иммунной безопасности, и регистрируют ЭКГ. Всем индивидуумам проводят оценку ответа через одну неделю и пять недель после курса 1 посредством визуализации и клинической оценки. После включения в продолжение исследования проводят дополнительную оценку ответа непосредственно перед началом следующего курса. После последнего курса продолжающегося лечения у индивидуумов проводят наблюдение безопасности, эффективности и выживаемости.

Часть с расширением: вплоть до 20 индивидуумов с метастазирующей кожной меланомой включают и лечат при рекомендованной дозе 2 фазы (RP2D). Она включает 3 периода: скрининг, дозирование и наблюдение. Период дозирования состоит из 6 курсов из 4 введений, которые проводят каждые 2 недели. Период наблюдения включает оценку общей выживаемости.

Включенным индивидуумам вводят рекомендованную дозу 2 фазы каждые 2 недели в каждом курсе. Проводят четыре введения и индивидуумы продолжают лечение вплоть до 6 курсов. В ходе периода дозирования индивидуумам проводят клиническую и лабораторную оценку, как подробно описано выше.

Индивидуумы должны иметь период "вымывания" из по меньшей мере 4 недель перед первым введением исследуемого лекарственного средства и после предшествующей химиотерапии и экспериментальных средств, за исключением иммуномодуляторов (например, но не ограничиваясь ими: антитела против CTLA4, против PD-L1, против PD-1, IL-2), которые должны иметь период "вымывания" по меньшей мере 6 недель перед первым введением исследуемого лекарственного средства, и все неблагоприятные явления должны либо возвратиться к исходному уровню, либо стабилизироваться на уровне 1 степени или менее.

Индивидуумы с меланомой, положительной по мутации V600E или V600K B-Raf, должны иметь прогрессирование или должны иметь непереносимость к предшествующей терапии ингибитором B-Raf и/или MEK.

Часть с увеличением дозы.

Курс 1 состоит из периода повторяющегося дозирования в течение 6 недель (4 дозы, каждая с интервалом 2 недели) и периода наблюдения в течение 6 недель.

Минимум 1 неделя должна пройти между первым введением какому-либо индивидууму в группе введения дозы и первым введением другому индивидууму в этой группе введения дозы.

За индивидуумами тщательно наблюдают в ходе первоначального периода исследования в течение 12 недель. Всем индивидуумам проводят оценку ответа через одну неделю и пять недель после окончания 1 курса для документирования и подтверждения клинической пользы, определяемой как стабильное заболевание (SD), частичный ответ (PR) или полный ответ (CR) к 12 неделе. Индивидуумы с признаками прогрессирующего заболевания (PRD) при визуализации либо на 7 неделе, либо на 11 неделе, после повторного согласия в форме информированного согласия (ICF) могут продолжить участие в исследовании и продолжить лечение CM-24, если исследователь сочтет это клинически оправданным в соответствии с Правилами остановки Раздела клинического ухудшения, с дальнейшей оценкой на 15 неделе. Если визуализация для наблюдения на 15 неделе подтверждает PRD, индивидуум не продолжает лечение вследствие подтвержденного прогрессирующего заболевания.

Всем индивидуумам с DLT, в том числе индивидуумам с отсроченными DLT, прекратят дальнейшее дозирование CM-24, но они не будут исключены из исследования.

Индивидуумы, которых исключили из исследования до завершения первых 3 введений исследуемого лекарственного средства в первоначальный период исследования (курс 1), заменяют. Индивидуумы, которых исключают по какой-либо другой причине, отличной от отзыва согласия, наблюдают на протяжении 4 посещений для наблюдения в течение шести месяцев.

Курсы 2-6 называют периодом продолжающегося лечения. После первоначального периода исследования индивидуумы с признаками клинической пользы, определяемой как SD, PR или CR в соответствии с модифицированными критериями RECIST 1.1 и без признаков ограничивающей дозу токсичности (DLT) к 12 неделе могут продолжать лечение CM-24 на том же уровне дозы, который вводили в ходе первоначального периода исследования, в течение 5 дополнительных курсов лечения. Индивидуумы с PRD, который подтвержден, но не является ухудшением и с в остальном стабильным или улучшенным клиническим статусом должны продолжать лечение исследуемым лекарственным средством до дальнейшего прогрессирования или клинического ухудшения.

Каждый полный курс лечения в период продолжающегося лечения включает 4 дозы исследуемого лекарственного средства с интервалом 2 недели, на 1, 15, 29 и 43 сутки. Оценка ответа проводят между 52 и 56 сутками каждого курса лечения. Оценка ответа должна быть завершена до введения первой дозы следующего курса.

В период продолжающегося лечения индивидуумы с PRD, которое подтверждено, но не является ухудшением и с в остальном стабильным или улучшенным клиническим статусом, должны продолжать лечение исследуемым лекарственным средством до дальнейшего прогрессирования или клинического ухудшения.

После последнего введения CM-24 в период продолжающегося лечения каждого индивидуума наблюдают на протяжении 4 посещений для наблюдения в течение шести месяцев.

Всем индивидуумам с DLT, включая отсроченные DLT, прекращают дальнейшее дозирование CM-24, но их не исключают из исследования.

Всех индивидуумов наблюдают в течение неопределенного срока в отношении выживаемости.

Расширение группы.

Для первых двух уровней доз (0,01 мг/кг и 0,03 мг/кг) 1 пациента в каждой группе включают по ускоренной схеме, согласно которой единичная обусловленная лекарственным средством токсичность степени 2 приводит к расширению до схемы 3+3 при этой дозе и всех последующих дозах. Для индивидуумов в двух группах более низкой дозы (0,01 мг/кг и 0,03 мг/кг) увеличение дозы от первой группы низкой дозы с одним пациентом (0,01 мг/кг) до следующей группы (0,03 мг/кг), и от второй группы с однократной дозой (0,03 мг/кг) до следующей группы (0,1 мг/кг) начинается после окна DLT в течение 6 недель, если не происходит токсичности степени 2 или более. Для уровней доз 0,1 мг/кг и выше по меньшей мере 3 пациентов на группу включают в стандартную схему 3+3, если не происходит DLT, в случае которой группу расширяют до 6 пациентов. Расширение до следующей группы начинается только после окна DLT в течение 8 недель, начинаясь с первого введения исследуемого лекарственного средства первого индивидуума каждой группы.

Если никакой дополнительный индивидуум в группе из 6 индивидуумов не имеет DLT, тогда после изучения данных безопасности для всех индивидуумов Комитетом по безопасности может происходить увеличение дозы.

Если у 2 или более индивидуумов в группе введения дозы из 3 или 6 индивидуумов развивается DLT, увеличение дозы прекращают, и

если группа предшествующего уровня дозы еще не расширена до 6 индивидуумов, ее расширяют до 6 индивидуумов,

если группа предшествующего уровня дозы уже расширена до 6 индивидуумов, Комитет по безо-

пасности после изучения данных по безопасности на текущую дату может определить (предшествующий) уровень дозы как рекомендованную дозу 2 фазы (RP2D), или рекомендовать оценку новой группы при промежуточной дозе.

Рекомендованную дозу 2 фазы (RP2D) определяют как наиболее высокий уровень дозы, при которой не более чем 1 из 6 индивидуумов испытывают DLT.

Увеличение дозы.

Если DLT не возникает в период наблюдения DLT в течение 6 недель для групп с более низкой дозой и для остальных групп в период наблюдения DLT в течение 8 недель, тогда начинают следующую группу и повторяют ту же схему. Между включением индивидуумов в группу каждого уровня дозы существует период ожидания в течение одной недели. Перед увеличением дозы доступные данные по безопасности для всех индивидуумов, которых лечили в исследовании на текущую дату, включая текущую группу, оцениваются Комитетом по безопасности.

Введение (1 курс) в группе следующей дозы начинают только после завершения повторяющегося дозирования (1 курс) для всех индивидуумов в группе предшествующей дозы. Момент времени исследования Комитетом по безопасности основан на данных, указывающих на то, что irAE у пациентов, которых лечат другими иммуномодуляторами, возникают в течение 5-10 недель после введения. Если возникает DLT, требующий расширения группы введения дозы до шести индивидуумов, период DLT расширяют, чтобы он охватывал полное повторяющееся дозирование (курс 1) для всех шести индивидуумов.

Если после увеличения дозы при наличии 2 или более отсроченных DLT при более низкой дозе и если этот АЕ может быть возможным отсроченным DLT, связанным с CM-24, увеличение дозы временно останавливают и уведомляют Комитет по безопасности в течение 24 ч. Комитет по безопасности быстро оценит явление и соответствующую информацию, в том числе данные PK, и внесет какое-либо необходимое корректирование дозы и/или схемы увеличения дозы. Те же шаги будут предприняты, если 2 или более отсроченных DLT возникнут в ранее исследованной расширенной группе из 6 индивидуумов.

Отсроченные DLT будут рассматриваться Комитетом по безопасности согласно руководствам и решения будут приниматься для каждого случая отдельно. Такие действия могут включать использование стандартных правил увеличения при DLT, возвращение к более низкой или промежуточной дозе или отказ от каких-либо действий, если исследуемое связанной с дозой явление не является достаточно серьезным для остановки увеличения дозы и текущее дозирование не считается имеющим риск для индивидуумов.

Часть расширения.

Часть расширения в этом исследовании позволяет включение вплоть до 20 индивидуумов с развернутой кожной меланомой. Могут быть открыты другие группы расширения из вплоть до 20 индивидуумов, при условии изменения протокола, при показаниях, ранее исследованных в части увеличения дозы испытания, если ранние признаки эффективности служат основанием для этого. Включенных индивидуумов лечат RP2D в течение вплоть до шести курсов, причем введение проводят на 1, 15, 29 и 43 сутки. Оценку ответа проводят между 52 и 56 сутками. Оценка ответа должна быть завершена до введения первой дозы следующего курса.

Включение в часть с расширением может быть остановлено, если частота DLT составляет $\geq 33\%$. Индивидуумы, для которых исследуемое лекарственное средство является переносимым, не исключаются автоматически из продолжающегося дозирования до изучения Комитетом по безопасности, и они допускаются к продолжающемуся дозированию до тех пор, пока оно не перестанет быть переносимым, если не будет указано обратное в результате изучения безопасности. После анализа безопасности принимают решение, возобновить ли включение и продолжить ли дозирование при текущей дозе или продолжить ли включение дополнительных индивидуумов в группу более низкой дозы. В случае DLT включение останавливают и/или начинают вновь после изучения Комитетом по безопасности.

Руководство по принятию решения о лечении.

Ответ опухоли оценивают с использованием критериев оценки ответа при солидных опухолях (RECIST 1.1). Оценку ответа опухоли в конце курса для всех индивидуумов проводят на 52-56 сутки каждого курса лечения (результаты оценки должны быть изучены и документированы перед первой дозой следующего курса). После каждого (продолжающегося или с расширением) курса лечения решение лечить индивидуума дополнительным курсом CM-24 основано на оценке опухоли, если у индивидуума не развивается неблагоприятное явление степени ≥ 3 (CTCAE) или другое неблагоприятное явление, связанное с CM-24, которое исключает дальнейшее лечение. Индивидуумов лечат до подтвержденного полного ответа (CR) или прогрессирующего заболевания (PRD), оба из которых являются подтвержденными, а затем действуют далее, как описано ниже. Индивидуумы с PRD, которое является подтвержденным, но не является ухудшением и с в остальном стабильным или улучшенным клиническим статусом (т.е. без снижения функционального статуса ECOG) должны продолжить лечение исследуемым лекарственным средством до дальнейшего прогрессирования или клинического ухудшения, как далее указано ниже.

Индивидуумы с наилучшим общим ответом (BOR) CR, PR или SD продолжают получать лечение

СМ-24 до первого возникновения любого из

достижения подтвержденного CR;

клинического ухудшения, указывающего на то, что дальнейшая польза лечения не является вероятной;

удовлетворения критериям прекращения исследуемой терапии (DLT) или иной непереносимости терапии или

достижения максимального количества курсов.

Период наблюдения.

Индивидуумов наблюдают в течение периода по меньшей мере шести месяцев, начиная с последней инфузии при лечении. 1-е посещение для наблюдения происходит в течение 7 суток после последнего визуализирующего сканирования. Посещения для наблюдения 2-4 происходят с интервалами 56 суток. Кроме того, статус выживаемости оценивают приблизительно каждые 3 месяца, в течение неопределенного срока, либо посредством телефонного звонка, либо при личном контакте после завершения или прекращения лечения и наблюдения в исследовании. Для любых индивидуумов, которые умерли, сообщают даты смерти. Оценку общей выживаемости проводят до завершения исследования или остановки исследования спонсором. В ходе этих звонков или посещений не получают никаких других данных (например, последующее лечение, функциональный статус и т.д.), отличных от выживаемости.

Когда индивидуум прекращает лечение исследуемым лекарственным средством, дата и причина прекращения лечения исследуемым лекарственным средством должны быть документированы в исходных документах, и индивидуум должен войти в период для наблюдения. Когда индивидуум отказывается от исследования (в период лечения или наблюдения), следует предпринять все усилия, чтобы убедиться, что все оценки, связанные с этим посещением в исследовании, были проведены, и дата и причина прекращения исследования были документированы в исходных документах.

После завершения периодов лечения и наблюдения всех выживших индивидуумов наблюдают в отношении статуса выживаемости каждые 3 месяца в течение неопределенного срока.

Физическое описание исследуемого лекарственного средства СМ-24 предоставляется в одноразовом флаконе объемом 10 мл. Каждый флакон содержит концентрированный раствор с эквивалентом 100 мг СМ-24 (10 мг/мл).

СМ-24 вводят в качестве внутривенной инфузии с встроенным в линию 0,2-микронным фильтром в определяемых протоколом дозах.

Инструкции по приготовлению различных доз.

Для индивидуумов, которым вводят дозы 0,1 мг/кг, 0,3 мг/кг и 1,0 мг/кг, для приготовления используют мешок для в/в вливания с 50 мл 0,9% хлорида натрия. Инфузию следует проводить со скоростью 1,0 мл/мин. Округление при получении дозы следует проводить, только когда это абсолютно необходимо, и его следует проводить только так, чтобы позволить поддержание минимальной концентрации 0,25 мг/мл.

Для индивидуумов, которым вводят дозу 3 мг/кг, для приготовления используют мешок для в/в вливания со 100 мл 0,9% хлорида натрия. Инфузию следует проводить со скоростью 2,0 мл/мин. Округление в процессе приготовления дозы следует проводить, только когда это абсолютно необходимо.

Для индивидуумов, которым вводят дозу 10 мг/кг, для приготовления используют мешок для в/в вливания с 250 мл 0,9% хлорида натрия. Инфузию следует проводить со скоростью 3,0 мл/мин. Округление в процессе приготовления дозы следует проводить, только когда это абсолютно необходимо.

Фармакодинамические (PD) маркеры.

Проводят взятие образцов крови и их исследуют в иммунных анализах и посредством других способов оценки в следующие моменты времени: до введения дозы при 1-м введении исследуемого лекарственного средства, через 48 ч после введения 1-й и 4-й дозы исследуемого лекарственного средства курса 1 и до введения 4-й (последней) дозы каждого полного курса (курсы 2-6 увеличения дозы и все курсы группы расширения), посещения для наблюдения 2-4, и они включают

подтипы лимфоцитов (CD4, CD8 и CD56) в комбинации с маркерами активации (CD69, CD107a и HLA-DR), регуляторные Т-клетки посредством сортировки флуоресцентно-активируемых клеток (FACS)

экспрессия CEACAM1 в подтипах лимфоцитов,

растворимый CEACAM1 и гранзим В в сыворотке,

процентная занятость рецептора CEACAM1 посредством СМ-24,

супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSCs) (CD14+, HLADR-низкий, CD11b+),

белки иммунной точки контроля, например PD-1, TIM-3, LAG, Vista.

Фармакокинетика (PK).

Фармакокинетику первоначально исследуют в части с увеличением дозы в процессе первой инфузии (первая доза 1 курса) и в процессе четвертой инфузии (последняя доза 1 курса). Также перед каждым введением в 1 курсе определяют уровни доз введения дозы. Дополнительных индивидуумов с расширением дозы (вплоть до 6) можно исследовать для оценки PK при предварительном RP2D, если более надежная характеристика PK СМ-24 считается обоснованной.

Профиль PK СМ-24 оценивают в плазме вплоть до 15 суток после первой дозы и 36 суток после

инфузии четвертой дозы. Следующие параметры РК устанавливают из профилей концентрации в плазме против времени: C_{max} , $t_{1/2}$, T_{max} , AUC_{0-t} и $AUC_{0-\infty}$.

Образцы получают при первой и четвертой инфузии в следующие моменты времени: до инфузии (исходный уровень); в конце инфузии и через 1, 4, 8, 24 ч после инфузии. Только для 1-й и 4-й доз: на 3, 5, 8, 15 сутки (или до дозы следующего введения) и для 4-й дозы также на 22 и 36 сутки после инфузии. Уровни до введения дозы будут определять перед каждым введением 1-го курса. Для дальнейшей информации по сбору образцов и транспортировке образцов см. Schedule of Events and the Laboratory Manual.

Свежие биоптаты опухоли.

Размеры опухоли оценивают по следующим показателям: CD4, CD8, CD56, FOXP3, CEACAM1, гранзим В, CM-24, % занятости рецептора CEACAM1 посредством CM-24.

Часть с увеличением дозы: индивидуумов просят предоставить необязательно свежий образец биоптата ткани (или сохраненный, если он взят в пределах последних шести месяцев) на исходном уровне и через одну неделю после второго введения 1-го курса.

Часть с расширением: получают два свежих образца опухоли, при скрининге и через одну неделю после 2-го дозирования 1-го курса. Кроме того, индивидуумов просят, но не требуют, предоставить один дополнительный биоптат через одну неделю после четвертого введения 1-го курса.

Результаты эффективности.

Следующие результаты используют для оценки предварительной эффективности, и они взяты из модифицированных критериев RECIST 1.1:

частота объективных ответов (ORR),
длительность ответа (DOR),
статус ответа опухоли,
частота контроля заболевания (DCR),
продолжительность ответа (DR),
наилучший общий ответ (BOR) - полный ответ (CR), частичный ответ (PR), стабильное заболевание (SD) и прогрессирующее заболевание (PRD),
выживаемость без прогрессирования (PFS),
время до ответа (TTR),
общая выживаемость (OS),
процентное изменение опухолевой нагрузки (PCTV), оцениваемое посредством СТ или MRI.

Перечисленные выше результаты эффективности будут оценивать в

группах увеличения дозы:

7 неделя, через одну неделю после введения четвертой дозы первого курса,
11 неделя, через пять недель после введения четвертой дозы первого курса,
18-19 неделя, 26-27 неделя, 34-35 неделя, 42-43 неделя, 48-49 неделя и 50-51 неделя после пяти дополнительных курсов плюс посещения для наблюдения 2-4.

Группа расширения дозы:

7-8 неделя, 14-15 неделя, 22-23 неделя, 30-31 неделя, 38-39 неделя, 46-47 неделя, плюс посещения для наблюдения 2-4.

Связанные с иммунной системой результаты эффективности. Дополнительная оценка эффективности в исследовании может включать использование критериев обусловленных иммунитетом критериев ответа (igRC) на основе модификаций RECIST 1.1 (обозначаемые как igRECIST), и они включают следующие результаты.

Связанный с иммунитетом наилучший общий ответ (igBOR) с категориями ответа igCR, igPR, igSD, igPD;

связанная с иммунитетом частота объективных ответов (igORR) на протяжении всего периода исследования;

продолжительность ответов ig (DOigR) для индивидуумов с ig-ответами.

Также можно определять исходы igORR на основе igBOR при любом количестве курсов.

Фармакокинетические (ПК) результаты.

Фармакокинетику исследуют в части увеличения дозы в следующие моменты времени РК: образцы получают при первой и четвертой инфузиях в следующие моменты времени: до инфузии (исходный уровень); в конце инфузии и через 1, 4, 8, 24 ч после инфузии. Для 1-ой и 4-ой доз: на 3, 5, 8, 15 сутки (до следующего введения дозы) и для 4-й дозы также через 22 и 36 суток после инфузии. Уровни до введения доз получают до каждого введения 1-го курса.

Дополнительных индивидуумов расширения дозы (вплоть до 6) можно исследовать для оценки РК при предварительном режиме RP2D, если более надежная охарактеризация РК CM-24 считается обоснованной.

Пример 7. Состав.

Иллюстративный состав гуманизированного mAb в соответствии с настоящим изобретением со-

держит следующие компоненты:

Концентрация (мг/мл)	Ингредиент
10,00	Лекарственное вещество СМ-24
4,65	L-гистидин
82,00	Сахароза
0,20	Полисорбат 20

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гуманизированное моноклональное антитело (mAb) или его фрагмент, которое специфически распознает CEACAM1 человека, содержащее:

(i) аминокислотную последовательность варибельной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 и SEQ ID NO: 32; и

(ii) аминокислотную последовательность варибельной области легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 и SEQ ID NO: 35.

2. Гуманизированное mAb по п.1, содержащее варибельную область тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 32.

3. Гуманизированное mAb по п.1, содержащее варибельную область легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 34.

4. Гуманизированное mAb по п.1, содержащее варибельную область тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 32 и варибельную область тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 34.

5. Гуманизированное mAb по п.1, содержащее тяжелую цепь, выбранную из группы, состоящей из изоформа IgG4 и изоформа IgG1.

6. Гуманизированное mAb по п.1, содержащее легкую цепь изоформа к.

7. Гуманизированное mAb по п.1, содержащее легкую цепь изоформа к и тяжелую цепь, выбранную из группы, состоящей из изоформа IgG4 и изоформа IgG1.

8. Гуманизированное mAb по п.6, содержащее легкую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 52.

9. Гуманизированное mAb по п.5, содержащее тяжелую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 53 и с последовательностью SEQ ID NO: 59.

10. Гуманизированное mAb по п.1, содержащее легкую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 52 и тяжелую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 53.

11. Гуманизированное mAb по п.1, содержащее легкую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 52 и тяжелую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 59.

12. Выделенный полинуклеотид, кодирующий гуманизированное mAb или его фрагмент по любому из пп.1-11.

13. Выделенная полинуклеотидная последовательность по п.12, содержащая любую последовательность ДНК с SEQ ID NO: 44-51, или ее аналоги с последовательностями, которые по крайней мере на 90% идентичны последовательностям SEQ ID NO: 44-51.

14. Выделенная полинуклеотидная последовательность по п.12, содержащая любую последовательность ДНК с SEQ ID NO: 54 или SEQ ID NO: 55, кодирующую тяжелую цепь гуманизированного mAb, или последовательность ДНК с SEQ ID NO: 56, кодирующую легкую цепь гуманизированного mAb.

15. Плазмида, содержащая выделенный полинуклеотид по п.12.

16. Фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество гуманизированного mAb по любому из пп.1-11 или его фрагмента, которое специфически распознает CEACAM1 человека, и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

17. Фармацевтическая композиция по п.16 для лечения заболевания или расстройства, связанного с экспрессией, активацией или функцией белка CEACAM.

18. Фармацевтическая композиция по п.16, где заболевание или расстройство представляет собой клеточно-пролиферативное заболевание или нарушение.

19. Фармацевтическая композиция по п.18, где клеточно-пролиферативное заболевание или нарушение представляет собой злокачественную опухоль, выбранную из группы, состоящей из меланомы, колоректального рака, рака мочевого пузыря, легкого, немелкоклеточной карциномы легкого (NSCLC), немелкоклеточной аденокарциномы легкого (NSCLA), желудочно-кишечного рака, рака поджелудочной железы, молочной железы, предстательной железы, щитовидной железы, желудка, яичника, меланомы и рака тела матки.

20. Фармацевтическая композиция по п.16, содержащая:

(i) 1-10 мг/мл основной аминокислоты;

(ii) 10/100 мг/мл сахара;

- (iii) 0,01-1 мг/мл поверхностно-активного вещества;
- (iv) 1-50 мг/мл гуманизированного mAb к CEACAM1, 4-6 мг/мл основной аминокислоты, 70-100 мг/мл сахара и 0,1-1 мг/мл неанионного поверхностно-активного вещества или
- (v) 10 мг/мл гуманизированного mAb к CEACAM1, 4,65 мг/мл L-гистидина, 82 мг/мл сахарозы и 0,20 мг/мл полисорбата 20.

21. Фармацевтическая композиция по п.16, дополнительно содержащая по меньшей мере один дополнительный иммуномодулятор.

22. Фармацевтическая композиция по п.21, где дополнительный иммуномодулятор выбран из группы, состоящей из антитела против белка запрограммированной клеточной смерти 1 (PD-1), анти-PD-L1 человека и анти-PD-L2 человека, активированной цитотоксической лимфоцитарной клетки, активирующего лимфоциты средства и ингибитора каскада RAF/MEK.

23. Применение фармацевтической композиции, содержащей гуманизированное mAb по любому из пп.1-21 или его фрагмент, которое специфически распознает CEACAM1 человека, для лечения заболевания или нарушения, связанного с экспрессией, активацией или функцией белка CEACAM1.

24. Применение по п.23, где фармацевтическая композиция содержит дополнительный иммуномодулятор.

25. Применение по п.23, где дополнительный иммуномодулятор выбран из группы, состоящей из антитела против белка запрограммированной клеточной смерти 1 (PD-1), анти-PD-L1 человека и анти-PD-L2 человека, активированной цитотоксической лимфоцитарной клетки, активирующего лимфоциты средства и ингибитора каскада RAF/MEK.

26. Композиция для диагностики заболевания или расстройства, связанного с экспрессией, активацией или функцией белка CEACAM1, содержащая по меньшей мере один гуманизированный mAb или его фрагмент по любому из пп.1-11.

27. Способ профилактики, ослабления или лечения заболевания или нарушения, связанного с экспрессией, активацией или функцией белка CEACAM1, включающий введение индивиду терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по п.16 или 22.

28. Способ по п.27, где заболевание или нарушение представляет собой инфекцию.

29. Способ по п.27, где заболевание или нарушение представляет собой злокачественную опухоль.

30. Способ по п.29, где злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из меланомы, колоректального рака, рака мочевого пузыря, легкого, немелкоклеточной карциномы легкого (NSCLC), немелкоклеточной аденокарциномы легкого (NSCLA), желудочно-кишечного рака, рака поджелудочной железы, молочной железы, предстательной железы, щитовидной железы, желудка, яичника, меланомы и рака тела матки.

31. Способ по п.27, дополнительно включающий введение индивиду лимфоцитарных клеток, активирующего лимфоциты средства или дополнительной композиции против злокачественной опухоли.

32. Способ по п.27, включающий введение индивиду по меньшей мере одной дозы гуманизированного mAb к CEACAM1 в диапазоне от 0,01 до 10 мг/кг массы тела.

33. Способ по п.27, включающий введение индивидууму по меньшей мере одной дозы гуманизированного mAb против CEACAM1 в диапазоне от 10 до 50 мг/кг массы тела.

34. Способ по п.27, включающий введение

(i) множества идентичных или различных доз гуманизированного mAb;

(ii) множества возрастающих доз или

(iii) фармацевтической композиции

один раз в неделю, один раз в 2 недели, один раз в 3 недели, один раз в 4 недели или один раз в 5 недель.

35. Способ по п.33, включающий 1-10 курсов введения, где каждый курс включает 2-5 инфузий каждые 1-4 недели гуманизированного mAb, а затем 2-8 недель между курсами.

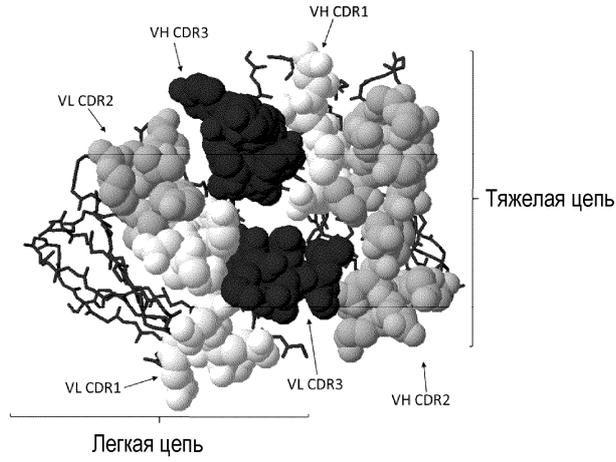
36. Способ иммуномодулирования, где способ включает приведение экспрессирующего CEACAM1 лимфоцита в контакт с антителом или его фрагментом, которое специфически распознает CEACAM1 человека, по любому из пп.1-11.

37. Способ ингибирования гомотипического или гетеротипического белок-белкового взаимодействия CEACAM1, где способ включает приведение экспрессирующего CEACAM1 лимфоцита в контакт с антителом или его фрагментом, которое специфически распознает CEACAM1 человека, по любому из пп.1-11, тем самым ингибируя гомотипическое или гетеротипическое белок-белковое взаимодействие CEACAM1.

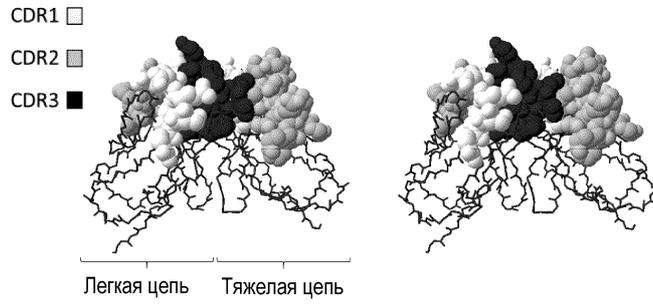
38. Способ диагностики заболевания или нарушения, связанного с экспрессией, активацией или функцией белка CEACAM1 у индивида, где способ включает приведение биологического образца, происходящего или полученного от указанного индивида, в контакт с диагностической композицией по п.26, где образование комплекса за пределами заданного порога указывает на злокачественную опухоль у указанного индивидуума.

39. Способ определения экспрессии CEACAM1, где способ включает приведение в контакт биологического образца с антителом или его фрагментом, которое специфически распознает CEACAM1 чело-

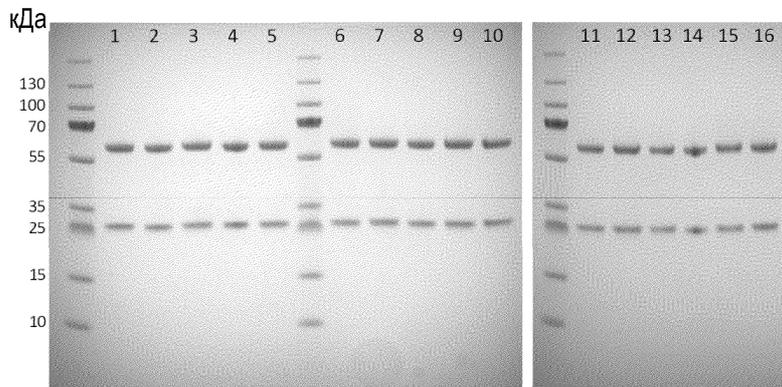
века, по любому из пп.1-11 и измерение уровня образования иммунного комплекса.



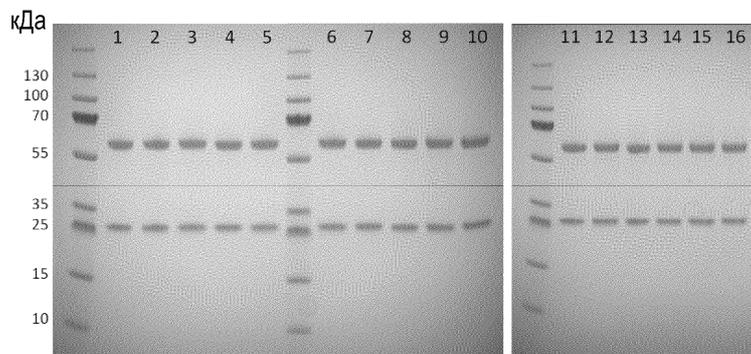
Фиг. 1А



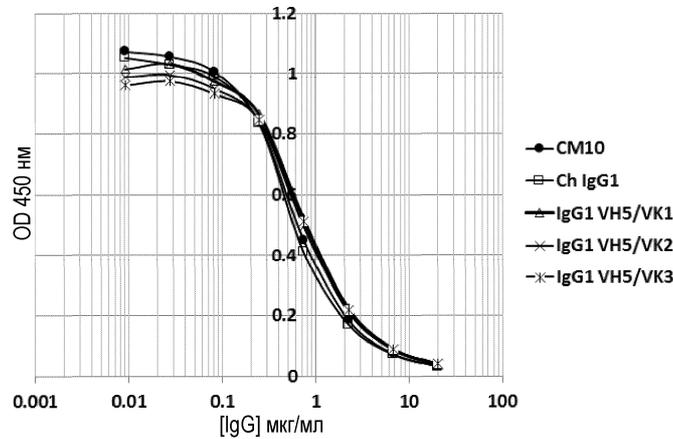
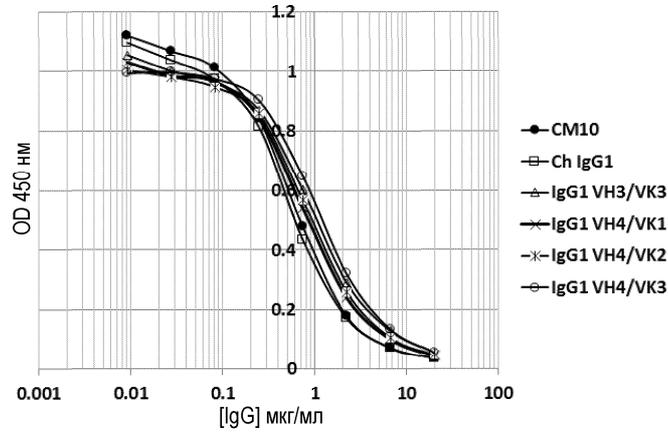
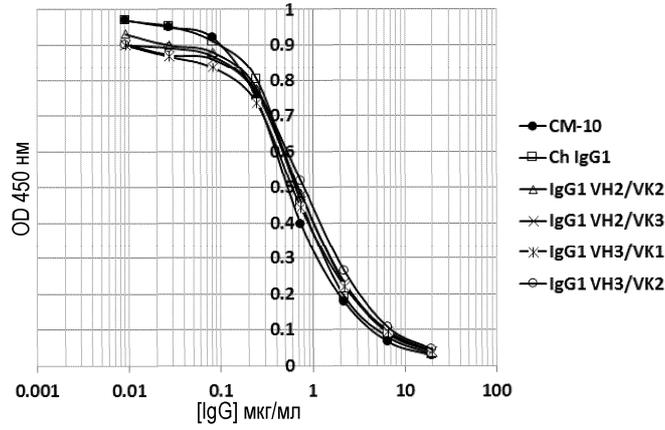
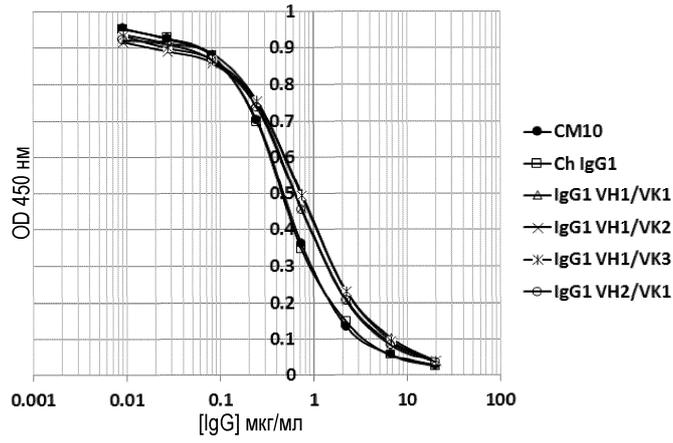
Фиг. 1В



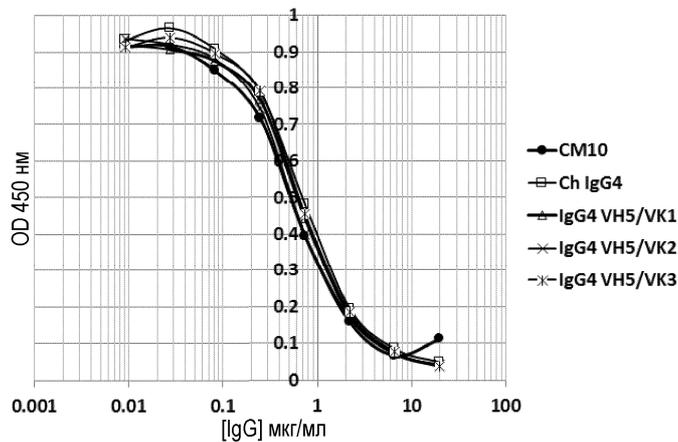
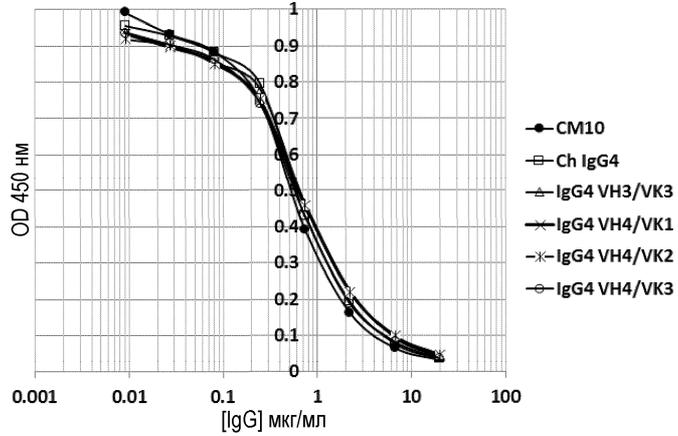
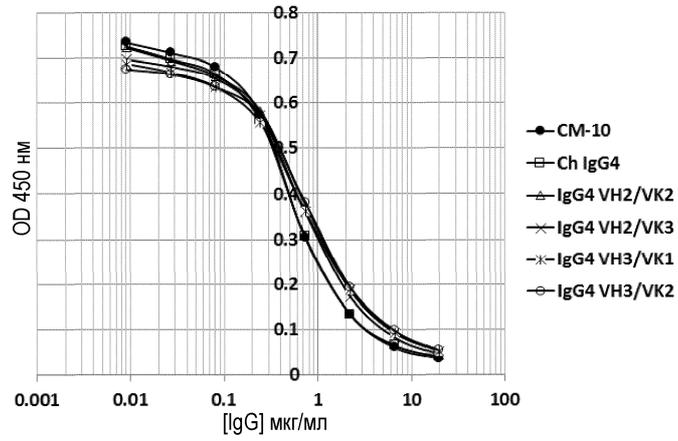
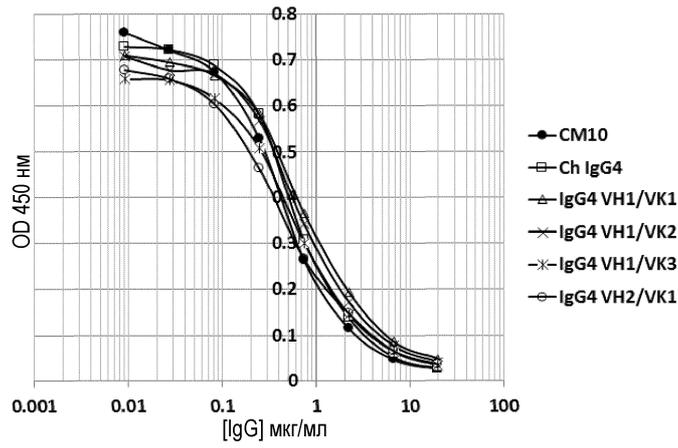
Фиг. 2А



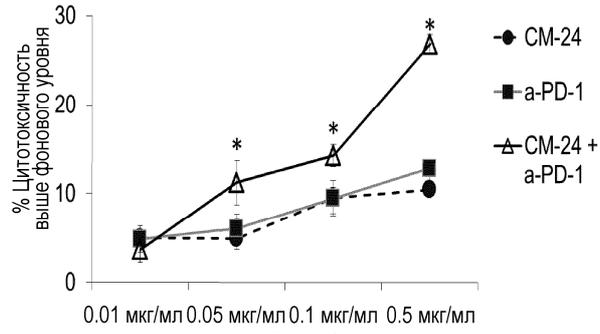
Фиг. 2В



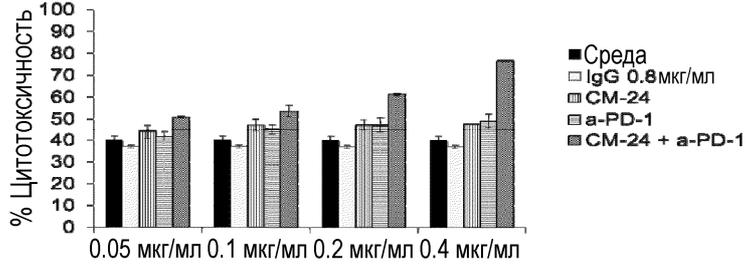
Фиг. 3А



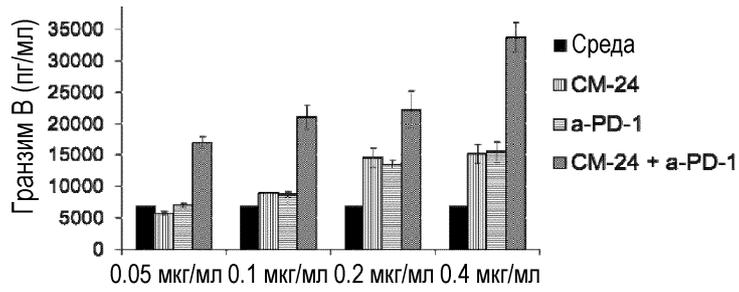
Фиг. 3В



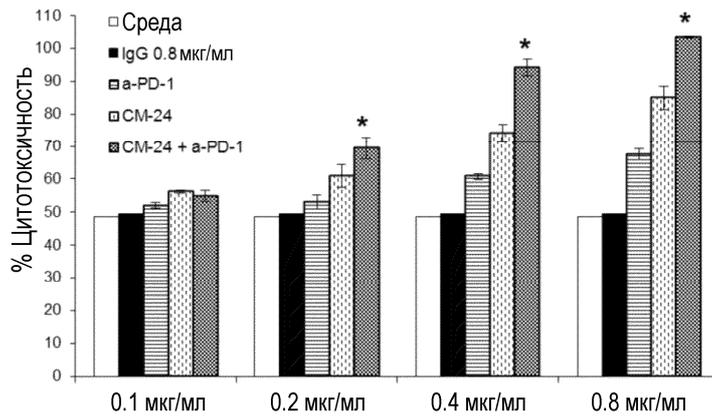
Фиг. 4



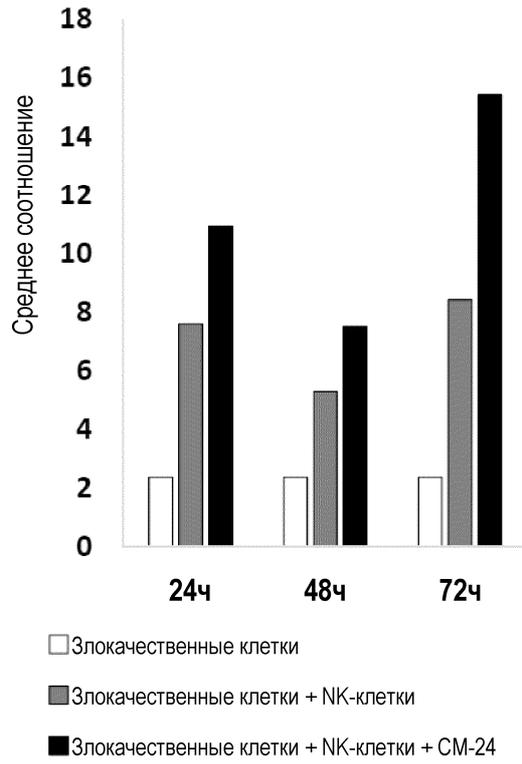
Фиг. 5А



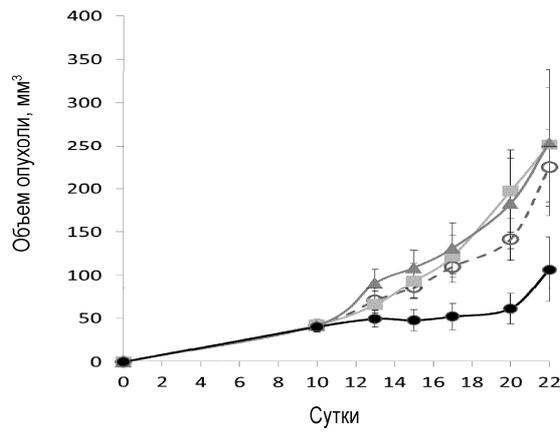
Фиг. 5В



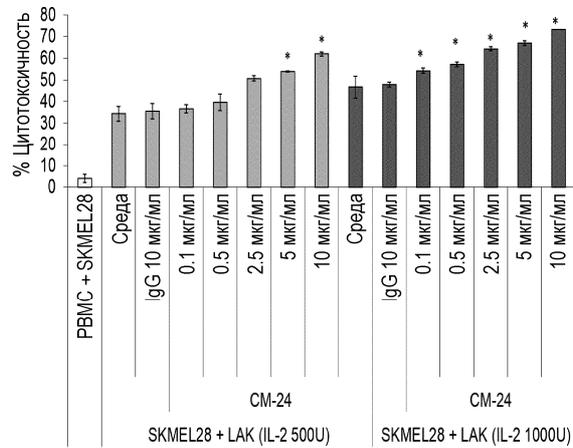
Фиг. 6



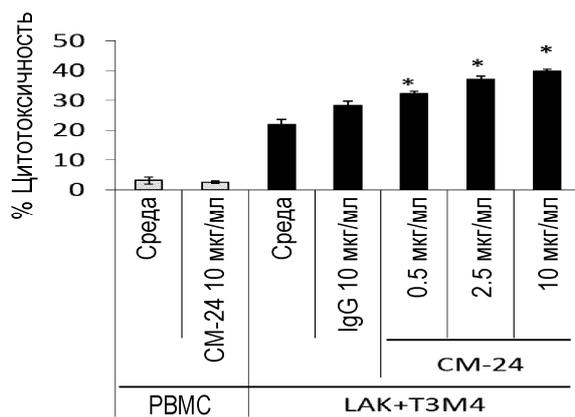
Фиг. 7



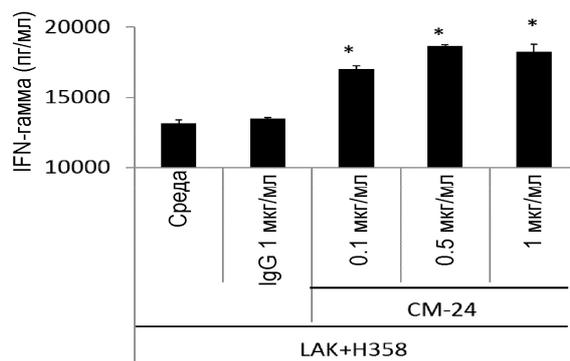
Фиг. 8



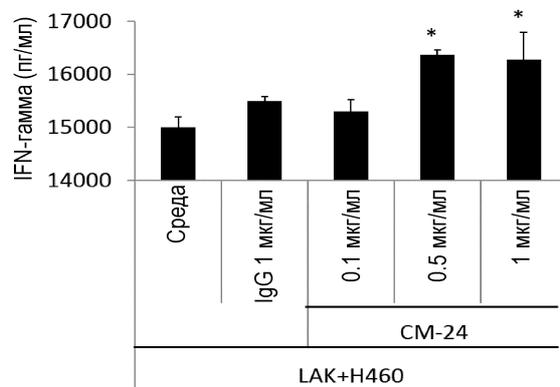
Фиг. 9



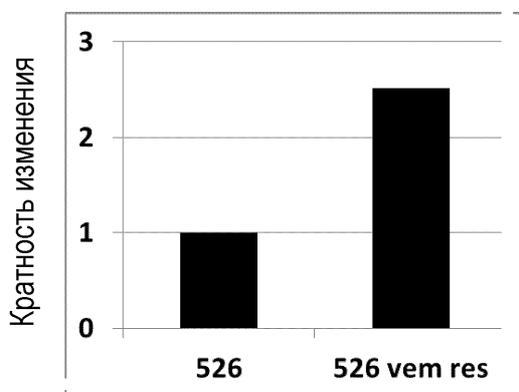
Фиг. 10



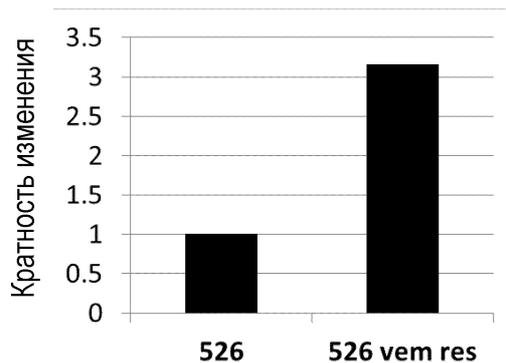
Фиг. 11А



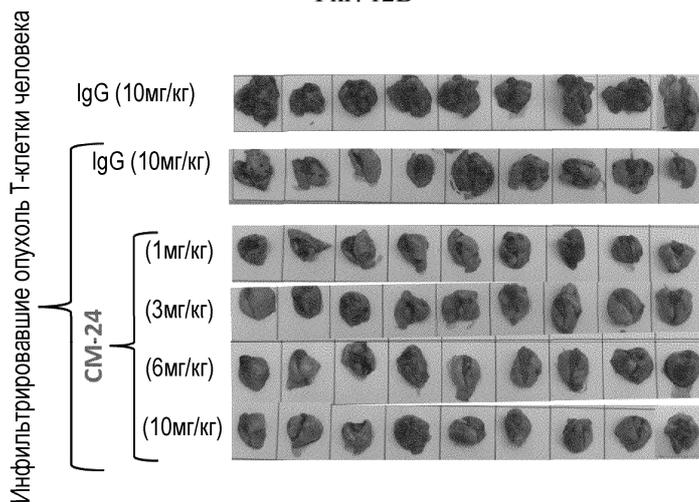
Фиг. 11В



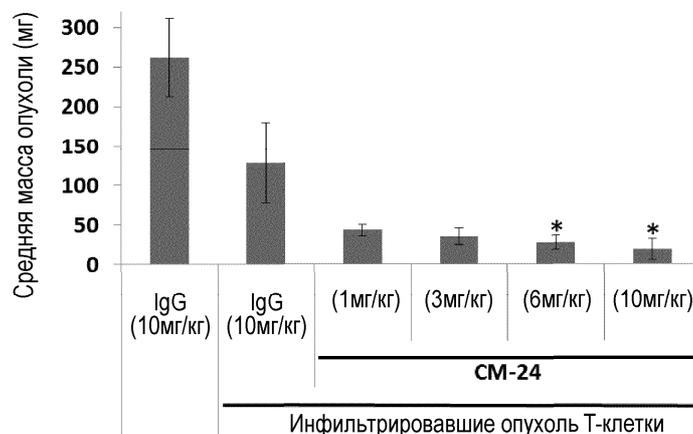
Фиг. 12А



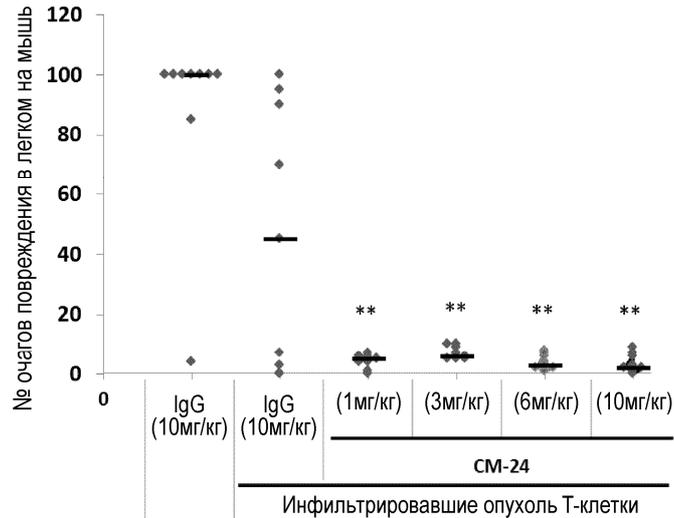
Фиг. 12В



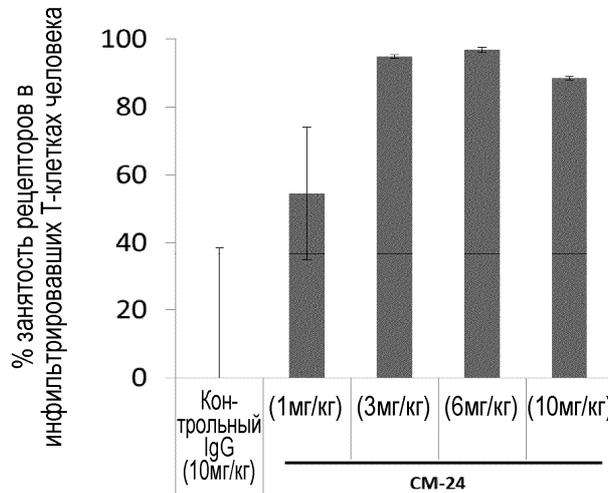
Фиг. 13А



Фиг. 13В



Фиг. 13С



Фиг. 14

```

1   DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRTSQDIG NYLNWYQQKP GKAVKLLIYY
51  TSRLHSGVPS RFGSGSGTD YTLTISSLQP EDIATYFCQQ GKSLPRTFGG
101 GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
151 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSLSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
201 LSSPVTKSFN RGEC

```

Фиг. 15А

```

1   QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYAFT NNLIEWVRQA PGQGLEWIGV
51  INPGSGDTNY NEKFKGRVTM TADKSIStay MELSRLSDD TAVYYCARGD
101 YGGFAVDYW GQGTTVTVSS ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK
151 DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT
201 YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT
251 LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY
301 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT
351 LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS
401 DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSLGK

```

Фиг. 15В

1 QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYAFT>NNLIEWVRQA PGQGLEWIGV
51 INPGSGDTNY NEKFKGRVTM TADKSISTAY MELSRLRSDD TAVYYCARGD
101 YGGGFAVDYW GQGTTVTVSS **ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK**
151 **DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT**
201 **YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP**
251 **KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN**
301 **STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ**
351 **VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV**
401 **LDSGDGFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK**

Фиг. 15С

