

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290987** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2022.06.09

(22) Дата подачи заявки
2020.09.14

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) **АНТИ-СЕАСАМ АНТИТЕЛА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **62/907,224**

(32) **2019.09.27**

(33) **US**

(86) **PCT/IB2020/058523**

(87) **WO 2021/059075 2021.04.01**

(71) Заявитель:
ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

**Блэкуэлл Уэнделл Ламар Б., Дольфи
Дуглас В, Лоуэнстин Кассандра Л.,
Верона Ралука И. (US)**

(74) Представитель:

**Веселицкий М.Б., Веселицкая И.А.,
Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов
Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В.,
Соколов Р.А., Кузнецова Т.В. (RU)**

(57) Предложенное в настоящем документе описание относится к моноспецифическим и мультиспецифическим антителам, которые связываются с СЕАСАМ1, и/или СЕАСАМ5, и/или СЕАСАМ6, а также к способам получения и применения описанных антител.

A1

202290987

202290987

A1

НАЗВАНИЕ: АНТИ-СЕАСАМ АНТИТЕЛА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**5 ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА СМЕЖНЫЕ ЗАЯВКИ**

[0001] Настоящая заявка испрашивает преимущество по предварительной заявке на патент США с серийным номером 62/907,224, поданной 27 сентября 2019 г. Описание упомянутой выше заявки полностью включено в настоящий документ путем ссылки.

**10 ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПОДАННЫЙ В
ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ**

[0002] Данная заявка содержит перечень последовательностей, который подается в электронном виде посредством EFS-Web как перечень последовательностей в формате ASCII с именем файла «JBI6156WOPCT1_sequence_listing.txt», датой создания 29 августа 2020 г. и размером 62 Кб. Перечень последовательностей, представленный
15 посредством EFS-Web, является частью описания и полностью включен в настоящий документ путем ссылки.

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Представленное в настоящем документе описание относится к антителам, специфичным к SEASAM1 и, необязательно, SEASAM5 и/или SEASAM6, а также к
20 способам получения и применения описанных антител.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] Способность иммунной системы контролировать инфекции или опухоли часто нарушается механизмами хозяина, предназначенными для контроля иммунной системы. Эти иммунные контрольные точки могут предотвращать активацию
25 иммунной системы даже при соответствующих обстоятельствах. Поскольку многие иммунные контрольные точки развились для защиты здоровых тканей и клеток, патогены и опухоли приспособились использовать эти механизмы в своих интересах. Блокирование этих иммунных контрольных точек стало успешной стратегией в онкологической терапии и способствовало более глубокому пониманию механизмов
30 иммунного контроля, которые могут помочь опухолям избежать иммунного контроля.

[0005] В терапевтических средствах, нацеленных на CTLA-4 и PD-1, используется это преимущество за счет блокады рецепторов на Т-клетках, ответственных за индукцию гибели опухолевых клеток. Опухоль, экспрессирующая лиганды для PD-1 и CTLA-4, больше не может ингибировать иммунные ответы этих Т-клеток и затем устраняется

5 иммунным ответом. Этот новый механизм ингибирования иммунных контрольных точек привел к существенному улучшению исходов заболевания, но работает только у относительно небольшой доли пациентов.

[0006] Семейство CEACAM представляет собой высококонсервативные гликопротеины суперсемейства Ig, которые нарушают активацию иммунных клеток.

10 Канонический член семейства CEACAM1 сверхэкспрессируется во многих типах рака и активируется Т-клетками после иммунной активации¹². Нарушение передачи сигналов CEACAM1 может повысить активность Т-клеток, высвобождая их для уничтожения опухолевых мишеней. Количество членов семейства CEACAM показывает, что это эволюционно-консервативный механизм иммунной супрессии с

15 более широким воздействием, чем, например, PD-1 или CTLA-4. По этой причине нацеливание на CEACAM может быть более желательным, чем на другие иммунные контрольные точки.

[0007] CEACAM1 может быть лигирован сам по себе, а также с другими членами семейства CEACAM, такими как CEACAM5, CEACAM6 и CEACAM8. Современные

20 технологии, нацеленные только на CEACAM1, могут лишь предотвратить подавление Т-клеток опухолями, сверхэкспрессирующими CEACAM1, но будут менее успешно демаскировать опухоли, экспрессирующие другие члены семейства CEACAM, что может привести к менее активному блокированию иммунной супрессии и, в конечном итоге, к менее эффективной терапии рака.

25 [0008] Следовательно, существует необходимость в разработке дополнительных терапевтических средств, нацеленных на некоторые члены семейства CEACAM.

ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0009] В изобретении предложены антитела, которые связываются с CEACAM1, и/или CEACAM5, и/или CEACAM6, тем самым улучшая опосредованный Т-клетками

30 контроль над ростом опухоли. Антитела изобретения связываются либо с инфицированными, либо с опухолевыми клетками-мишенями, которые в противном случае не подвергались бы клиренсу со стороны иммунного надзора хозяина. Эти

антитела также связываются с иммунными клетками, такими как Т-клетки, НК-клетки или макрофаги, которые активируются в присутствии опухолей или инфицированных клеток. Такое связывание предотвращает инактивацию этих иммунных клеток мишенями, экспрессирующими CEACAM.

5 [0010] Поскольку разнообразные члены семейства CEACAM могут лигироваться в цис- или транс-форме и подавлять иммунные ответы, антитела настоящего изобретения связываются и блокируют множество членов семейства CEACAM. Поскольку эволюция семейства CEACAM привела к появлению избыточных, но генетически и механистически сходных молекул для иммунного контроля, функциональное
10 терапевтическое средство должно перекрестно реагировать с этими многочисленными молекулами. Этот мультиспецифический подход может привести к более активному блокированию иммунной супрессии и более широкому функциональному диапазону, чем существующая технология, связывающая один член семейства CEACAM.

[0011] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному анти-
15 CEACAM антителу (связанной с раково-эмбриональным антигеном молекуле клеточной адгезии) или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11 и 12, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное анти-
20 CEACAM антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 79 и переменную область легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 80.

[0012] В другом варианте осуществления выделенное анти-CEACAM антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 13, 14, 15, 16, 17 и 18,
25 соответственно. В другом варианте осуществления выделенное анти-CEACAM антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH с последовательностью SEQ ID NO: 81 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 82.

[0013] В другом варианте осуществления выделенное анти-CEACAM антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22, 23 и 24,
30 соответственно. В другом варианте осуществления выделенное анти-CEACAM антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 5 содержит VH с последовательностью SEQ ID NO: 83 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 84.

[0014] В другом варианте осуществления выделенное анти-CEACAM антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28, 29 и 30, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное анти-CEACAM антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 7 содержит VH с последовательностью SEQ ID NO: 85 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 86.

[0015] В другом варианте осуществления выделенное анти-CEACAM антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 31, 32, 33, 34, 35 и 36, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное анти-CEACAM антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 9 содержит VH с последовательностью SEQ ID NO: 87 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 88.

[0016] В другом варианте осуществления выделенное анти-CEACAM антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 37, 38, 39, 40, 41 и 42, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное анти-CEACAM антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 11 содержит VH с последовательностью SEQ ID NO: 89 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 90.

[0017] В другом варианте осуществления выделенное анти-CEACAM антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 43, 44, 45, 46, 47 и 48, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное анти-CEACAM антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 13 содержит VH с последовательностью SEQ ID NO: 91 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 92.

[0018] В другом варианте осуществления выделенное анти-CEACAM антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 49, 50, 51, 52, 53 и 54, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное анти-CEACAM антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 15 содержит VH с последовательностью SEQ ID NO: 93 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 94.

[0019] В другом варианте осуществления выделенное анти-CEACAM антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1,

LCDR2 и LCDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 55, 56, 57, 58, 59 и 60, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное анти-СЕАСАМ антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 17 содержит VH с последовательностью SEQ ID NO: 95 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 96.

5 [0020] В другом варианте осуществления выделенное анти-СЕАСАМ антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 61, 62, 63, 64, 65 и 66, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное анти-СЕАСАМ антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 19 содержит VH с
10 последовательностью SEQ ID NO: 97 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 98.

[0021] В другом варианте осуществления выделенное анти-СЕАСАМ антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 67, 68, 69, 70, 71 и 72, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное анти-СЕАСАМ
15 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 21 содержит VH с последовательностью SEQ ID NO: 99 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 100.

[0022] В другом варианте осуществления выделенное анти-СЕАСАМ антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 73, 74, 75, 76, 77 и 78,
20 соответственно. В другом варианте осуществления выделенное анти-СЕАСАМ антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 23 содержит VH с последовательностью SEQ ID NO: 101 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 102.

[0023] В другом варианте осуществления изобретение относится к выделенному анти-СЕАСАМ антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, причем антитело или его
25 антигенсвязывающий фрагмент конкурируют за связывание с СЕАСАМ1 и, необязательно, с СЕАСАМ5 или СЕАСАМ6, с эталонным антителом, содержащим

вариабельную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 79 и вариабельную область легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 80; или

VH с SEQ ID NO: 81 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 82;

30 VH с SEQ ID NO: 83 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 84;

VH с SEQ ID NO: 85 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 86;

VH с SEQ ID NO: 87 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 88;
VH с SEQ ID NO: 89 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 90;
VH с SEQ ID NO: 91 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 92;
VH с SEQ ID NO: 93 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 94;
5 VH с SEQ ID NO: 95 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 96;
VH с SEQ ID NO: 97 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 98;
VH с SEQ ID NO: 99 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 100; или
VH с SEQ ID NO: 101 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 102.

10 [0024] В другом варианте осуществления выделенное анти-СЕАСАМ антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

[0025] В другом варианте осуществления выделенное анти-СЕАСАМ антитело представляет собой мультиспецифическое антитело.

15 [0026] В другом варианте осуществления выделенное анти-СЕАСАМ антитело представляет собой биспецифическое антитело.

[0027] В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит анти-СЕАСАМ антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и фармацевтически приемлемый носитель.

20 [0028] В другом варианте осуществления выделенное анти-СЕАСАМ антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгирован с одной или более гетерологичными молекулами.

[0029] В другом варианте осуществления изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему анти-СЕАСАМ антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

25 [0030] В другом варианте осуществления изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему анти-СЕАСАМ антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и содержащему полинуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 79–102.

- [0031] В другом варианте осуществления изобретение относится к вектору, содержащему полинуклеотид, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 79–102. В другом варианте осуществления изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей вектор.
- [0032] В другом варианте осуществления изобретение относится к способу получения анти-СЕАСАМ антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающему в себя культивирование клетки-хозяина в условиях, в которых экспрессируется антитело, и выделение антитела, продуцируемого клеткой-хозяином.
- [0033] В другом варианте осуществления изобретение относится к способу лечения СЕАСАМ-положительного рака у нуждающегося в этом субъекта, включающему в себя введение терапевтически эффективного количества выделенного анти-СЕАСАМ антитела изобретения или его антигенсвязывающего фрагмента, или фармацевтической композиции изобретения субъекту для лечения СЕАСАМ-положительного рака. В другом варианте осуществления способ, в котором анти-СЕАСАМ антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в комбинации со вторым терапевтическим агентом. В другом варианте осуществления способ заключается в том, что вторым терапевтическим агентом является хирургическое вмешательство, химиотерапия, андроген-депривационная терапия или облучение, или любая их комбинация.
- [0034] В другом варианте осуществления изобретение относится к набору, содержащему антитело изобретения.

ОПИСАНИЕ ФИГУР

- [0035] **Фигура 1** иллюстрирует репрезентативный график проточной цитометрии; черная линия показывает экспрессию СЕАСАМ1 на активированных анти-CD3 Т-клетках, серая линия показывает исходную экспрессию СЕАСАМ на покоящихся Т-клетках до активации.
- [0036] **Фигура 2** иллюстрирует связывание антител к СЕАСАМ с рекомбинантным СЕАСАМ1.
- [0037] **Фигура 3** иллюстрирует репрезентативный график проточной цитометрии; черная линия показывает клетки НЕК293Т, трансфицированные для сверхэкспрессии

СЕАСАМ1, серая линия показывает родительские клетки НЕК293Т, которые не экспрессировали СЕАСАМ1.

[0038] **Фигура 4** показывает кривые связывания анти-СЕАСАМ1 антител с клетками НЕК293Т, сверхэкспрессирующими СЕАСАМ1, с помощью проточной цитометрии.

5 [0039] **Фигура 5a** иллюстрирует связывание анти-СЕАСАМ1 антител с иммобилизованным рекомбинантным СЕАСАМ5 с помощью ИФА.

[0040] **Фигура 5b** иллюстрирует связывание анти-СЕАСАМ1 антител с иммобилизованным рекомбинантным СЕАСАМ6 с помощью ИФА.

[0041] **Фигура 6a** иллюстрирует репрезентативный график проточной цитометрии; 10 черная линия показывает клетки НЕК293Т, сверхэкспрессирующие СЕАСАМ5, серая линия показывает клетки, которые не экспрессировали СЕАСАМ5.

[0042] **Фигура 6b** иллюстрирует репрезентативный график проточной цитометрии; 15 черная линия показывает клетки НЕК293Т, сверхэкспрессирующие СЕАСАМ6, серая линия показывает родительские клетки НЕК293Т, которые не экспрессировали СЕАСАМ6.

[0043] **Фигура 7a** иллюстрирует связывание анти-СЕАСАМ1 антител с клетками НЕК293Т, сверхэкспрессирующими СЕАСАМ5.

[0044] **Фигура 7b** иллюстрирует связывание анти-СЕАСАМ1 антител с клетками НЕК293Т, сверхэкспрессирующими СЕАСАМ6.

20 [0045] **Фигура 8** показывает процент PD-1-положительных Т-клеток (либо CD4+, либо CD8+) при стимуляции либо анти-CD3 антителом (темно-серый), либо комбинацией анти-CD3 антитела и анти-СЕАСАМ антитела ССМВ18 (черный), либо комбинацией анти-CD3 антитела и анти-СЕАСАМ антитела ССМВ61 (светло-серый).

[0046] **Фигура 9** иллюстрирует процент Т-клеток (либо CD4+, либо CD8+), не 25 обнаруженных с помощью Cell Trace Violet, при стимуляции либо анти-CD3 антителом (темно-серый), либо комбинацией анти-CD3 антитела и анти-СЕАСАМ антитела ССМВ18 (черный), либо комбинацией анти-CD3 антитела и анти-СЕАСАМ антитела ССМВ61 (светло-серый).

[0047] **Фигура 10a** показывает секрецию гамма-интерферона (IFN) из Т-клеток, 30 стимулированных анти-CD3 антителом в присутствии или отсутствии связывающих анти-СЕАСАМ антител (ССМВ18 или ССМВ61).

[0048] **Фигура 10b** иллюстрирует секрецию фактора некроза опухоли (TNF) альфа из Т-клеток, стимулированных анти-CD3 антителом в присутствии или отсутствии связывающих анти-СЕАСАМ антител (ССМВ18 или ССМВ61).

5

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0049] Все публикации, включая, без ограничений, патенты и заявки на патенты, цитируемые в данном описании, включены в настоящий документ путем ссылки, как если бы они были полностью изложены в настоящем документе.

[0050] Раскрытый предмет изобретения может быть более понятным со ссылкой на приведенное ниже подробное описание в сочетании с прилагаемыми рисунками, которые составляют часть настоящего описания. Следует понимать, что раскрытый предмет изобретения не ограничивается описанным и/или показанным в настоящем документе и что терминология, применяемая в настоящем документе, имеет своей целью описание конкретных вариантов осуществления исключительно в качестве примера и не призвана носить ограничивающий характер в отношении заявленного предмета.

[0051] Если конкретно не указано иное, любое описание, относящееся к возможному механизму, или способу действия, или причине улучшения, понимают лишь как иллюстративное, и не предусмотрено ограничение раскрываемого предмета корректностью или некорректностью любого такого предполагаемого механизма, или способа действия, или причины улучшения.

[0052] Когда выражается диапазон значений, другой вариант осуществления включает в себя интервал от одного конкретного значения и/или до другого конкретного значения. Кроме того, ссылка на значения, указанные в диапазонах, включает все и каждое значение внутри этого диапазона. Все диапазоны являются инклюзивными и могут быть комбинированы. Когда значения указаны как приблизительные с использованием предшествующего слова «около», следует понимать, что конкретное значение образует другой вариант осуществления. Ссылка на то или иное конкретное численное значение включает по меньшей мере это конкретное значение, если только контекстом четко не предусмотрено иное.

30

[0053] Следует понимать, что некоторые отличительные признаки раскрытого предмета изобретения, которые для ясности описаны в настоящем документе в контексте отдельных вариантов осуществления, могут также быть представлены в комбинации в одном варианте осуществления. И наоборот, различные отличительные признаки раскрытого предмета изобретения, которые для краткости описаны в контексте одного варианта осуществления, могут также быть представлены по отдельности или в любой субкомбинации.

Определения

[0054] Используемые в настоящем документе формы единственного числа включают в себя и множественное число.

[0055] В настоящем описании и формуле изобретения используют различные термины, относящиеся к аспектам настоящего описания. Такие термины должны иметь обычное для них значение в данной области техники, если не указано иное. Другие конкретно определенные термины следует толковать согласно приведенным в настоящем документе определениям.

[0056] Термин «около», используемый в отношении числовых диапазонов, пороговых или конкретных значений, используется для обозначения того, что перечисленные значения могут варьировать вплоть до 10% от указанного значения. Таким образом, термин «около» используется для охвата вариаций $\pm 10\%$ или меньше, вариаций $\pm 5\%$ или меньше, вариаций $\pm 1\%$ или меньше, вариаций $\pm 0,5\%$ или меньше или вариаций $\pm 0,1\%$ или меньше от указанного значения.

[0057] Термин «антитела» подразумевается в широком значении и включает в себя молекулы иммуноглобулинов, включая моноклональные антитела, в том числе мышинные, человеческие, гуманизированные и химерные моноклональные антитела, антигенсвязывающие фрагменты, мультиспецифические антитела, такие как биспецифические, триспецифические, тетраспецифические, и т.д., димерные, тетрамерные или мультимерные антитела, одноцепочечные антитела, доменные антитела и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая содержит антигенсвязывающий сайт требуемой специфичности. «Полноразмерные антитела» состоят из двух тяжелых цепей (НС) и двух легких цепей (LC), соединенных между собой дисульфидными связями, а также из их мультимеров (например, IgM). Каждая тяжелая цепь состоит из переменной

области тяжелой цепи (VH) и константной области тяжелой цепи (состоящей из доменов CH1, шарнирной области, CH2 и CH3). Каждая легкая цепь состоит из переменной области (VL) легкой цепи и константной области (CL) легкой цепи.

Области VH и VL можно дополнительно подразделять на области

- 5 гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), между которыми расположены каркасные области (FR). Каждая из VH и VL состоит из трех CDR и четырех сегментов FR, расположенных в направлении от аминок- к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4.

- [0058] «Определяющие комплементарность области (CDR)» представляют собой
10 области антитела, которые связывают антиген. CDR могут быть определены с помощью различных систем разграничения, таких как система Кабата (Wu et al. (1970) *J Exp Med* 132: 211-50) (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991), Chothia (Chothia et al. (1987) *J Mol Biol* 196: 901-17), IMGT (Lefranc et al. (2003) *Dev Comp*
15 *Immunol* 27: 55-77) и AbM (Martin and Thornton (1996) *J Biol Biol* 263: 800-15).
Описано соответствие между различными схемами и нумерациями переменных областей (см., например, Lefranc et al. (2003) *Dev Comp Immunol* 27: 55-77; Honegger and Pluckthun, (2001) *J Mol Biol* 309:657-70; база данных International ImMunoGeneTics (IMGT); веб-ресурсы, http://www_imgt_org). Для разметки CDR можно использовать
20 доступные программы, такие как abYsis от UCL Business PLC. Используемые в настоящем документе термины «CDR», «HCDR1», «HCDR2», «HCDR3», «LCDR1», «LCDR2» и «LCDR3» включают в себя CDR, определенные любым из способов, описанных выше, по Кабату, Чотиа, IMGT или AbM, если в описании явным образом не указано иное.

- 25 [0059] Иммуноглобулины могут относиться к пяти основным классам (IgA, IgD, IgE, IgG и IgM) в зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи. IgA и IgG дополнительно подразделяются на изоотипы IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Легкие цепи антител любых видов позвоночных можно относить в зависимости от аминокислотных последовательностей их константных доменов к
30 одному из двух четко отличающихся типов, а именно каппа (κ) и лямбда (λ).

[0060] Термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к части молекулы иммуноглобулина, которая связывает антиген. Антигенсвязывающие фрагменты могут представлять собой синтетические, ферментативно получаемые или

модифицированные методами генной инженерии полипептиды, и они включают VH, VL, VH и VL, фрагменты Fab, F(ab')₂, Fd и Fv, доменные антитела (dAb), состоящие из одного домена VH или одного домена VL, переменные домены IgNAR акулы, адаптированные к верблюду VH-домены, минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, имитирующих CDR-области антитела, например участки FR3-CDR3-FR4, HCDR1, HCDR2 и/или HCDR3, а также LCDR1, LCDR2 и/или LCDR3. Домены VH и VL могут быть связаны вместе посредством синтетического линкера с образованием различных типов конфигураций одноцепочечных антител, в которых домены VH/VL можно объединять в пару внутримолекулярно или межмолекулярно в тех случаях, когда домены VH и VL экспрессируются отдельными одноцепочечными конструктами антител с образованием моновалентного антигенсвязывающего сайта, такими как одноцепочечный Fv (scFv) или диатело; они описаны, например, в международных патентных публикациях №№ WO1998/44001, WO1988/01649, WO1994/13804 и WO1992/01047.

[0061] Переменная область антитела состоит из «каркасной» области, разделенной тремя «антигенсвязывающими сайтами». Антигенсвязывающие сайты определены с помощью различных терминов: (i) определяющие комплементарность области (CDR), три в VH (HCDR1, HCDR2, HCDR3) и три в VL (LCDR1, LCDR2, LCDR3), на основании изменчивости последовательностей (Wu and Kabat, *J Exp Med* 132:211–50, 1970; Kabat *et al* *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991). (ii) «гиперпеременные области», HVR или HV, три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3), относятся к областям переменных доменов антитела, являющимся по своей структуре гиперпеременными, согласно определению Chothia и Lesk (Chothia and Lesk, *Mol. Biol* 196:901–17, 1987). Другие термины включают в себя «IMGT-CDR» (Lefranc *et al.*, *Dev Comparat Immunol* 27:55–77, 2003) и «использование остатков, определяющих специфичность» (SDRU) (Almagro *Mol Recognit* 17:132–43, 2004). В международной базе данных ImMunoGeneTics (IMGT) (http://www_imgt_org) представлены стандартизированная нумерация и определение антигенсвязывающих сайтов.

Соответствие между разграничениями CDR, HV и IMGT описано в Lefranc *et al.*, *Dev Comparat Immunol* 27:55–77, 2003.

[0062] Термин «фрагменты антитела» относится к части молекулы иммуноглобулина, которая сохраняет антигенсвязывающий участок тяжелой цепи и/или легкой цепи,

такой как определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) 1, 2 и 3, определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) 1, 2 и 3, переменная область тяжелой цепи (VH) или переменная область легкой цепи (VL). Фрагменты антител включают хорошо известные фрагменты Fab, F(ab')₂, Fd и Fv, а также доменные антитела (dAb), содержащие один домен VH. Домены VH и VL могут быть связаны вместе посредством синтетического линкера с образованием различных типов конфигураций одноцепочечных антител, в которых домены VH/VL соединяются в пару внутримолекулярно или межмолекулярно в тех случаях, когда домены VH и VL экспрессируются отдельными одноцепочечными конструктами антител с образованием

5 одновалентного антигенсвязывающего сайта, таких как одноцепочечный Fv (scFv) или диатело; они описаны, например, в международной патентной публикации № WO1998/44001, международной патентной публикации № WO1988/01649; между публ. пат. № WO1994/13804; между публ. пат. № WO1992/01047.

[0063] Термин «моноклональное антитело» относится к антителу, полученному из по

15 существующей гомогенной популяции молекул антител, т. е. индивидуальных антител, составляющих популяцию, идентичных за исключением возможных хорошо известных изменений, таких как удаление С-концевого лизина из тяжелой цепи антитела или посттрансляционные модификации, такие как изомеризация или деамидирование аминокислот, окисление метионина или аспарагина или деамидирование глутамина.

20 Моноклональные антитела обычно связывают один антигенный эпитоп.

Биспецифические моноклональные антитела связываются с двумя разными антигенными эпитопами. В пределах популяции антител моноклональные антитела могут иметь гетерогенное гликозилирование. Моноклональное антитело может быть моноспецифическим или мультиспецифическим, например биспецифическим,

25 моновалентным, двухвалентным или мультивалентным.

[0064] «Химерные антитела» представляют собой молекулы, различные части которых получены от разных видов животных, такие как антитела, имеющие переменную область, полученную из мышиных mAb, и константную область иммуноглобулина человека. Антитела, имеющие каркасные остатки переменной области, по существу, полученные из человеческого антитела (называемого

30 акцепторным антителом) и определяющие комплементарность области, по существу, полученные из мышиного антитела (называемого донорским антителом), также называются гуманизированными антителами. Химерные антитела в основном

применяют для снижения иммуногенности при их использовании и увеличения выхода продукции, например, когда мышинные мАт имеют более высокий выход из гибридом, но более высокую иммуногенность у людей, в результате чего применяют химерные мАт человека/мыши. Химерные антитела и способы их получения известны в данной области (например, заявки на патенты PCT WO 86/01533, WO 97/02671 и WO 90/07861, а также патенты США №№ 5,693,762, 5,693,761 и 5,225,539). Кроме того, пересадка CDR может быть выполнена для изменения некоторых свойств молекулы антитела, включая аффинность или специфичность. Неограничивающий пример пересадки CDR описан в патенте США № 5,225,539.

10 [0065] Термин «гуманизированное антитело» относится к антителу, в котором по меньшей мере один CDR получен из биологического вида, отличного от человека, а по меньшей мере один каркас получен из последовательностей человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело может включать замены в каркасных областях, в результате чего каркасы могут не быть точной копией экспрессированного человеческого иммуноглобулина или человеческих генных последовательностей зародышевой линии.

[0066] Термин «человеческое антитело» относится к антителу, которое оптимизировано для обеспечения минимального иммунного ответа при введении человеческому индивиду. Вариабельные области человеческого антитела получают из последовательностей иммуноглобулинов человека. Если антитело содержит константную область или часть константной области, константную область также получают из последовательностей иммуноглобулинов человека. Человеческое антитело содержит вариабельные области тяжелой и легкой цепи, которые «получены из» последовательностей человеческого происхождения, если вариабельные области человеческие антитела получены из системы, в которой используют иммуноглобулин зародышевой линии человека или перестроенные гены иммуноглобулина. Такими примерами систем являются библиотеки генов человеческих иммуноглобулинов, отображаемые на фаге, и трансгенные животные, отличные от человека, такие как мыши или крысы, несущие локусы человеческих иммуноглобулинов. «Человеческое антитело», как правило, содержит аминокислотные отличия по сравнению с иммуноглобулинами, экспрессируемыми у людей, из-за различий между системами, используемыми для получения человеческих антител и локусов человеческих иммуноглобулинов, внедрения соматических мутаций, намеренного введения замен в

каркасные участки и/или CDR, или и то и другое. Как правило, «человеческое антитело» по аминокислотной последовательности на по меньшей мере около 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентично аминокислотной последовательности, кодируемой генами иммуноглобулина зародышевой линии человека или перестроенными генами иммуноглобулина. В некоторых случаях «человеческое антитело» может содержать консенсусные каркасные последовательности, полученные в результате анализов каркасных последовательностей человека, например, как описано в Knappik et al., (2000) J Mol Biol 296:57–86, или синтетическую HCDR3, включенную в библиотеки генов иммуноглобулинов человека, отображаемых на фаге, например, как описано в публикации Shi et al., (2010) J Mol Biol 397:385–96 и межд. патентной публ. № WO2009/085462.

[0067] Термин «биспецифический» относится к антителу, которое специфически связывает два разных антигена или два разных эпитопа в пределах одного антигена. Биспецифическое антитело может иметь перекрестную реактивность с другими родственными антигенами, например таким же антигеном от других видов (гомологов), таких как человек или обезьяна, например *Macaca cynomolgus* (яванский макак, крабодед) или *Pan troglodytes*, или может связывать эпитоп, который имеется в двух или более разных антигенах.

[0068] Термин «мультиспецифический» относится к антителу, которое специфически связывает два или более разных антигенов или два или более разных эпитопов в пределах одного антигена. Мультиспецифическое антитело может иметь перекрестную реактивность с другими родственными антигенами, например, таким же антигеном от других видов (гомологов), таких как человек или обезьяна, например, *Macaca fascicularis* (яванский макак, крабодед) или *Pan troglodytes* или может связывать эпитоп, который имеется в двух или более разных антигенах.

[0069] Термин «эпитоп» означает часть антигена, с которым специфично связывается антитело. Как правило, эпитопы состоят из химически активных (таких как полярные, неполярные или гидрофобные) поверхностных группировок фрагментов, таких как боковые цепи аминокислот или полисахаридов, и могут иметь конкретные характеристики трехмерной структуры, а также конкретные характеристики заряда. Эпитоп может быть образован из непрерывных и/или прерывающихся аминокислот, формирующих конформационное пространственное звено. В случае прерывающегося

эпитопа аминокислоты из разных частей линейной последовательности антигена подходят близко друг к другу в 3-мерном пространстве посредством сворачивания молекулы белка.

5 [0070] Термин «эффективное количество» относится к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого результата. Эффективное количество может варьироваться в зависимости от таких факторов, как состояние болезни, возраст, пол и масса тела индивидуума, и от способности антитела вызывать желаемый ответ у индивидуума. Эффективное количество также представляет собой такое количество, при котором любые
10 токсические или вредные эффекты агента перевешиваются благоприятными эффектами.

[0071] «Образец выделенной клетки или ткани» — это набор клеток, полученных из ткани субъекта или индивидуума. Источником образца ткани или клеток может быть
15 твердая ткань из свежего, замороженного и/или консервированного органа, образец ткани, биоптат и/или аспират; кровь или любые компоненты крови, такие как плазма; жидкости организма, такие как спинномозговая жидкость, амниотическая жидкость, перитонеальная жидкость или интерстициальная жидкость; клетки субъекта в любой период гестации или развития. Образец клеток или ткани также может быть первичным или представлять собой культивируемые клетки или клеточные линии. Необязательно,
20 что образец ткани или фрагменты ткани получают от пораженных заболеванием ткани/органа. Образец ткани может содержать соединения, которые в естественных условиях не смешиваются с тканями, такие как консерванты, антикоагулянты, буферы, фиксирующие средства, питательные вещества, антибиотики и т. п.

[0072] Термин «выделенный» относится к однородной популяции молекул (таких как
25 синтетические полинуклеотиды или белок, такой как антитело), которые были по существу отделены и/или очищены от других компонентов той системы, в которой данные молекулы формировались, такой как рекомбинантная клетка, а также к белку, который был подвергнут по меньшей мере одной стадии очистки или выделения. Термин «выделенное антитело» относится к антителу, которое по существу не
30 содержит иных клеточных материалов и/или химических веществ, и охватывает антитела, которые выделены с более высокой чистотой, такой как 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% чистотой.

[0073] Термин «рекомбинантный» относится к ДНК, антителам и другим белкам, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными способами, когда сегменты из разных источников соединены с получением рекомбинантной ДНК, антител или белков.

5 [0074] В контексте настоящего документа антитело, которое «специфически связывается», или «антиген-специфично», или «специфично в отношении» антигена-мишени, или является «иммунореактивным» с антигеном, относится к антителу или полипептидному связывающему агенту изобретения, который связывает антиген с большей аффинностью, чем другие антигены с аналогичной последовательностью. В
10 одном аспекте полипептидные связывающие агенты изобретения или их фрагменты, варианты или производные будут связываться с большей аффинностью с человеческим антигеном по сравнению с их связывающей аффинностью с аналогичными антигенами других, т.е. нечеловеческих, видов, но полипептидные связывающие агенты, которые распознают и связывают ортологи мишени, входят в объем изобретения.

15 [0075] Термин «субъект» означает человека и не относящихся к человеку животных, включая всех позвоночных, например млекопитающих и немлекопитающих, таких как нечеловекообразные приматы, мыши, кролики, овцы, собаки, кошки, лошади, коровы, цыплята, амфибии и рептилии. Во многих вариантах осуществления описанного предмета изобретения субъект представляет собой человека.

20 [0076] Термин «лечить» или «лечение» относится к любому успеху или признакам успеха в ослаблении или облегчении симптомов повреждения, патологии или состояния, включая любые объективные или субъективные параметры, такие как смягчение, ремиссия, ослабление симптомов или перевод состояния в более терпимую для пациента форму, замедление скорости развития дегенеративных изменений или
25 угасания функции, перевод конечной точки дегенеративных изменений в менее угнетающую пациента форму, улучшение общего физического или умственного здоровья субъекта или продление выживаемости. Лечение можно оценивать по объективным или субъективным параметрам, включая результаты физикального осмотра, неврологического обследования или психиатрических освидетельствований.

30 [0077] Термин «вариант» относится к полипептиду или полинуклеотиду, который отличается от эталонного полипептида или эталонного полинуклеотида одной или более модификациями, например одной или более заменами, вставками или делециями.

[0078] Термин «вектор» относится к полинуклеотиду, который способен к удвоению внутри биологической системы, или может быть перемещен между такими системами. Векторные полинуклеотиды обычно содержат некоторые функциональные элементы, такие как точки начала репликации, сигналы полиаденилирования или селективные маркеры, служащие для облегчения дупликации или поддержания данных полинуклеотидов в биологической системе, такой как клетка, вирус, животное, растение, а также в реконструированных биологических системах, использующих биологические компоненты, способные к дупликации вектора. Векторный полинуклеотид может представлять собой молекулу ДНК или РНК или их гибрид, одноцепочечную или двухцепочечную молекулу.

[0079] Термин «экспрессионный вектор» относится к вектору, который можно использовать в биологической системе или реконструированной биологической системе для управления трансляцией полипептида, кодируемого полинуклеотидной последовательностью, присутствующей в экспрессионном векторе.

[0080] Термин «полинуклеотид» относится к синтетической молекуле, содержащей цепь нуклеотидов, ковалентно связанных через сахарофосфатную основную цепь или другую эквивалентную ковалентную химическую структуру. кДНК является примером синтетического полинуклеотида.

[0081] Термин «полипептид» или «белок» относится к молекуле, которая содержит по меньшей мере два аминокислотных остатка, связанных пептидной связью с образованием полипептида. Малые полипептиды, содержащие менее 50 аминокислотных остатков, могут называться «пептидами».

[0082] «СЕАСАМ1» (связанная с раково-эмбриональным антигеном молекула клеточной адгезии 1) относится к белковому продукту гена СЕАСАМ1, например NP—001020083.1, NP—001703.2. Аминокислотная последовательность полноразмерного человеческого СЕАСАМ1 приведена в SEQ ID NO: 1. Внеклеточный домен СЕАСАМ1 приведен в SEQ ID NO: 2 и охватывает остатки 35–428 полноразмерного СЕАСАМ1. У человека известно 11 различных вариантов сплайсинга СЕАСАМ1. Индивидуальные изоформы СЕАСАМ1 различаются по количеству внеклеточных иммуноглобулинподобных доменов или прикреплению к мембране и/или длине их цитоплазматического хвоста. Все варианты, в том числе эти варианты сплайсинга, включены в термин «СЕАСАМ1».

[0083] SEQ ID NO: 1 (полноразмерный человеческий CEACAM1):

MGHLSAPLHRVRVPWQGLLLTASLLTFWNPPTTAQLTTESMPFNVAEGKEVLLL VH
 NLPQQLFGYSWYKGERVDGNRQIVGYAIGTQQATPGPANSGRETIYPNASLLIQNVT
 QNDTGFYTLQVIKSDLVNEEATGQFHVYPELPKPSISSNNSNPVEDKDAVAFTCEPET
 5 QDTTYLWWINNQSLPVSRLQLSNGNRTLTLSSVTRNDTGPYECEIQNPVSANRSDPV
 TLNVTYGPDTPTISPSDTYYRPGANLSLSCYAASNPPAQYSWLINGTFQQSTQELFIPNI
 TVNNSGSYTCHANN SVTGCNRTTVKTIIVTELSPVVAKPQIKASKTTVTGDKDSVNL T
 CSTNDTGISIRWFFKNQSLPSSERMKLSQGNTTLSINPVKREDAGTYWCEVFNPI SKN
 QSDPIMLNVNYNALPQENGLSPGAIAGIVIGVVALVALIAVALACFLHFGKTGRASDQ
 10 RDLTEHKPSVSNHTQDHSNDPPNKMNEVTYSTLNFEAQOPTQPTSASPSLTATEIYSE
 VKKQ

[0084] SEQ ID NO: 2 (внеклеточный домен человеческого CEACAM1):

QLTTESMPFNVAEGKEVLLL VHNLPQQLFGYSWYKGERVDGNRQIVGYAIGTQQAT
 PGPANSGRETIYPNASLLIQNVTQNDTGFYTLQVIKSDLVNEEATGQFHVYPELPKPSI
 15 SSNNSNPVEDKDAVAFTCEPETQDTTYLWWINNQSLPVSRLQLSNGNRTLTLSSV T
 RNDTGPYECEIQNPVSANRSDPVTLNVTYGPDTPTISPSDTYYRPGANLSLSCYAASN
 PPAQYSWLINGTFQQSTQELFIPNITVNNSGSYTCHANN SVTGCNRTTVKTIIVTELSP
 VVAKPQIKASKTTVTGDKDSVNLTCSTNDTGISIRWFFKNQSLPSSERMKLSQGNTT L
 SINPVKREDAGTYWCEVFNPI SKNQSDPIMLNVNYNALPQENGLSPG

20 [0085] «Анти-CEACAM1 антитело», «антитело, которое распознает CEACAM1»,
 «антитело против CEACAM1» или «антитело к CEACAM1» представляют собой
 антитело, которое связывается с белком CEACAM1 с достаточной аффинностью и
 специфичностью. Как правило, антитело, в соответствии с настоящими сведениями,
 способно связывать CEACAM1 с минимальной аффинностью, составляющей около 10^{-8}
 25 или 10^{-9} М или более.

[0086] «CEACAM5» (связанная с раково-эмбриональным антигеном молекула
 клеточной адгезии 5) относится к белковому продукту гена CEACAM5.

Аминокислотная последовательность полноразмерного человеческого CEACAM5
 приведена в SEQ ID NO: 3. На сегодняшний день у человека описаны две изоформы,
 30 продуцируемые альтернативным сплайсингом. Все изоформы, в том числе эти
 варианты сплайсинга, включены в термин «CEACAM5».

[0087] SEQ ID NO: 3 (полноразмерный человеческий CEACAM5)

MESPSAPPHRWCIPWQRLLLTASLLTFWNPPTAKLTIESTPFNVAEGKEVLLLVHNL
 PQHLFGYSWYKGERVDGNRQIIGYVIGTQQATPGPAYSGREIYPNASLLIQNIQNDT
 GFYTLHVIKSDLVNEEATGQFRVYPELPKPSISSNNSKPVEDKDAVAFTCEPETQDAT
 YLWWWVNNQSLPVPSPRLQLSNGNRTLTLFNVTRNDTASYKCETQNPVSARRSDSVILN
 5 VLYGPDAPTISPLNTSYRSGENLNLSCHAASNPPAQYSWFVNGTFQQSTQELFIPNITV
 NNSGSYTCQAHNSDTGLNRTTVTTITVYAEPKPFITSNNSNPVEDEDAVALTCEPEIQ
 NTTYLWWWVNNQSLPVPSPRLQLSNDNRTLTLSSVTRNDVGPYECGIQNKLSVDHSDPV
 ILNVLYGPDDPTISPSYTYRPGVNLSSLCHAASNPPAQYSWLIDGNIQQHTQELFISNI
 TEKNSGLYTCQANNSASGHSRTTVKTITVSAELPKPSISSNNSKPVEDKDAVAFTCEPE
 10 AQNTTYLWWWVNGQSLPVPSPRLQLSNGNRTLTLFNVTRNDARAYVCGIQNSVSANRS
 DPVTLVDVLYGPDTPHSPDSSYLSGANLNLSCHSASNPSQYSWRINGIPQQHTQVLF
 AKITPNNNGTYACFVSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAGATVGIMIGVLVGV
 LI

[0088] «CEACAM6» (связанная с раково-эмбриональным антигеном молекула
 15 клеточной адгезии 6) относится к белковому продукту гена CEACAM6.
 Аминокислотная последовательность полноразмерного человеческого CEACAM6
 приведена в SEQ ID NO: 4.

[0089] SEQ ID NO: 4 (полноразмерный человеческий CEACAM6)

MGPPSAPPCRLHVPWKEVLLTASLLTFWNPPTAKLTIESTPFNVAEGKEVLLLAHNL
 20 PQNRIGYSWYKGERVDGNSLIVGYVIGTQQATPGPAYSGRETIYPNASLLIQNVQND
 TGFYTLQVIKSDLVNEEATGQFHVYPELPKPSISSNNSNPVEDKDAVAFTCEPEVQNT
 TYLWWWVNGQSLPVPSPRLQLSNGNMTLTLSSVKRNDAGSYECEIQNPASANRSDPVT
 NVLYGPDGPTISPSKANYRPGENLNLSCHAASNPPAQYSWFINGTFQQSTQELFIPNIT
 VNNSGSYMCQAHNSATGLNRTTVTMITVSGSAPVLSAVATVGITIGVLARVALI

25 [0090] «Анти-CEACAM антитело» представляет собой антитело, которое может
 связываться по меньшей мере с белками CEACAM1, CEACAM5 и CEACAM6 и,
 необязательно, с любым другим белком семейства CEACAM.

[0091] Термин CD3 относится к антигену, который экспрессируется на Т-клетках в
 составе мультимолекулярного комплекса Т-клеточного рецептора (TCR) и который
 30 состоит из гомодимера или гетеродимера, образованного в результате ассоциации двух
 или четырех цепей рецептора: CD3-эпсилон, CD3-дельта, CD3-дзета и CD3-гамма.
 CD3-эпсилон человека содержит аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 5.

Все ссылки на белки, полипептиды и фрагменты белка в данном документе предназначены для обозначения человеческой версии соответствующего белка, полипептида или фрагмента белка, если явно не указано, что они принадлежат к отличным от человека видам. Таким образом, «CD3» означает человеческий CD3, если не указано, что он получен от видов, отличных от человека, например, «мышинный CD3», «обезьяний CD3» и т. д.

[0092] SEQ ID NO: 5 (CD3-эпсилон человека):

MQSGTHWRVLGLCLLSVGVWGQDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEI
LWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYL
10 RARVCENCMEMDVMSVATIVIVDICITGGLLLLVEYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGG
RQRGQNKERPPPVPNPDYEPYRKGQRDLVSGLNQRRRI

[0093] Термины «биспецифическое антитело против CEACAM1/CD3», «антитело к CEACAM1/CD3», «антитело к CEACAM1xCD3» и т. п. относятся к антителу, которое связывается с CEACAM1 и CD3.

15 [0094] «Биспецифическое анти-CEACAM/анти-CD3 антитело», антитело CEACAM/CD3, антитело CEACAMxCD3 и т. п. относятся к антителу, которое может связываться с CD3 и по меньшей мере с белками CEACAM1, CEACAM5 и CEACAM6 и, необязательно, с любым другим белком семейства CEACAM.

20 [0095] Термин «в комбинации с» означает, что два или более терапевтических средства вместе вводят субъекту в смеси, одновременно в виде отдельных агентов или последовательно в виде отдельных агентов в любом порядке.

[0096] «CEACAM-положительный рак» относится к раковой ткани или раковой клетке, которые демонстрируют измеримый уровень CEACAM1 и/или CEACAM5, и/или CEACAM6, и/или любого другого белка семейства CEACAM. Уровень белка
25 может быть измерен с помощью хорошо известных анализов с применением, например, ИФА, иммунофлуоресценции, проточной цитометрии или радиоиммуноанализа на живых или лизированных клетках. В одном варианте осуществления CEACAM-положительный рак относится к раковой ткани или раковой клетке, которая демонстрирует измеримый уровень CEACAM1. В другом варианте осуществления
30 CEACAM-положительный рак относится к раковой ткани или раковой клетке, которая демонстрирует измеримый уровень CEACAM5. В другом варианте осуществления

СЕАСАМ-положительный рак относится к раковой ткани или раковой клетке, которая демонстрирует измеримый уровень СЕАСАМ6.

[0097] Термин «раковая клетка» или «опухолевая клетка» относится к раковой, предраковой или трансформированной клетке, либо *in vivo*, *ex vivo*, либо в культуре тканей, которая имеет спонтанные или индуцированные фенотипические изменения. Эти изменения не обязательно затрагивают поступление нового генетического материала. Хотя трансформация может быть вызвана инфицированием трансформирующим вирусом и встраиванием новой геномной нуклеиновой кислоты или поглощением экзогенной нуклеиновой кислоты, она также может возникнуть спонтанно или после воздействия канцерогена, в результате чего происходит мутация эндогенного гена. Преобразование/злокачественное новообразование проявляется в морфологических изменениях, иммортализации клеток, нарушении контроля роста, образовании очагов, пролиферации, злокачественности, уровнях маркера, специфических для опухоли, инвазивности, росте опухоли у подходящих животных-хозяев, таких как бестимусные мыши и т. п., *in vitro*, *in vivo* и *ex vivo* (Freshney, Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique (3rd ed. 1994)).

[0098] Термины «лечить» или «лечение» обозначают как терапевтическое лечение, так и профилактические или превентивные меры, причем целью является предотвращение или замедление (уменьшение) нежелательного физиологического изменения или расстройства. Преимущественные или желательные клинические результаты включают в себя ослабление симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизацию (т. е. отсутствие ухудшения) течения заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, облегчение или временное улучшение болезненного состояния и ремиссию (частичную или полную), как обнаруживаемые, так и не обнаруживаемые. Термин «лечение» может также означать увеличение выживаемости по сравнению с ожидаемым, если субъект не получал лечения. Требуемые лечения пациенты включают тех, которые уже имеют состояние или расстройство, а также тех, которые имеют предрасположенность к развитию состояния или расстройства, или тех, у которых такое состояние или расстройство необходимо предотвратить.

[0099]

Генерация антител

[0100]

Химерные и гуманизированные антитела

[0101] В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, представляет собой химерное антитело. Некоторые химерные антитела описаны, например, в патенте США № 4,816,567; и Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). В одном примере химерное антитело включает в себя переменную область нечеловеческого происхождения (например, переменную область, полученную от мыши, крысы, хомяка, кролика или нечеловекообразного примата, такого как обезьяна) и константную область человека. В другом примере химерное антитело представляет собой антитело с «переключением классов», в котором класс или подкласс изменен по сравнению с классом или подклассом исходного антитела. Химерные антитела включают в себя их антигенсвязывающие фрагменты.

[0102] В некоторых вариантах осуществления химерное антитело представляет собой гуманизированное антитело. Как правило, нечеловеческое антитело гуманизируют для снижения иммуногенности для человека, сохраняя при этом специфичность и аффинность исходного нечеловеческого антитела. Обычно гуманизированное антитело содержит один или более переменных доменов, в которых HVR, например, CDR (или их части) получены из антитела нечеловеческого происхождения, а FR (или их части) получены из последовательностей антитела человека. Гуманизированное антитело необязательно также будет содержать по меньшей мере часть константной области человека. В некоторых вариантах осуществления некоторые остатки FR в гуманизированном антителе заменены соответствующими остатками антитела нечеловеческого происхождения (например, антитела, из которого получены остатки HVR), например, для восстановления или улучшения специфичности или аффинности антитела.

[0103] Гуманизированные антитела и способы их получения рассмотрены, например, в Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008), и дополнительно описаны, например, в Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); Queen et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); патент США №№ 5,821,337, 7,527,791, 6,982,321 и 7,087,409; Kashmiri et al., *Methods* 36:25-34 (2005) (описание пересадки области,

определяющей специфичность (SDR)); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (описание «перекладки»); Dall'Acqua et al., *Methods* 36:43-60 (2005) (описание «перетасовки FR»); и Osbourn et al., *Methods* 36:61-68 (2005) и Klimka et al., *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (описание подхода «управляемого выбора» к перетасовке FR).

[0104] Каркасные области человека, которые можно применять для гуманизации, включают в себя, среди прочего: каркасные области, выбранные с помощью способа «наилучшего соответствия» (см., например, Sims et al. *J. Immunol.* 151:2296 (1993)); каркасные области, полученные из консенсусной последовательности антител человека конкретной подгруппы вариабельных областей легкой или тяжелой цепи (см., например, Carter et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); и Presta et al. *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); зрелые (соматически мутированные) каркасные области человека или каркасные области зародышевой линии человека (см., например, Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); и каркасные области, полученные в результате скрининга библиотек FR (см., например, Vaca et al., *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) и Rosok et al., *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)).

Антитела человека

[0105] В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, представляет собой антитело человека. Человеческие антитела могут быть получены с помощью различных методик, известных специалистам в данной области техники. Человеческие антитела в целом описаны в van Dijk и van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 (2001) и Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008).

[0106] Человеческие антитела могут быть получены путем введения иммуногена трансгенному животному, которое было модифицировано для получения интактных человеческих антител или интактных антител с вариабельными областями человека в ответ на антигенную стимуляцию. Такие животные обычно содержат все или часть локусов иммуноглобулинов человека, которые заменяют эндогенные локусы иммуноглобулинов или которые присутствуют внехромосомно или случайно интегрированы в хромосомы животного. У таких трансгенных мышей локусы эндогенного иммуноглобулина обычно оказываются инактивированными. Обзор способов получения антител человека от трансгенных животных см. в Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005). См. также, например, патенты США №№. 6,075,181 и 6,150,584, описывающие технологию XENOMOUSE™; патент США

№ 5,770,429 с описанием технологии HUMAB®; патент США № 7,041,870, описывающий технологию K-M MOUSE®, и публикацию заявки на патент США № US 2007/0061900, описывающую технологию VELOCIMOUSE®). Варибельные области человека из интактных антител, созданные с помощью таких животных, могут быть
5 дополнительно модифицированы, например, путем комбинирования с другой константной областью человека.

[0107] Человеческие антитела также могут быть получены гибридными способами. Были описаны линии клеток миеломы человека и гетеромиеломы мыши-человека для получения человеческих моноклональных антител. (См., например, Kozbor *J. Immunol.*,
10 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); а также Voerner et al., *J. Immunol.*, 147: 86 (1991).) Также описаны антитела человека, созданные посредством технологии гибридомы с В-клетками человека, в Li et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,
15 103:3557-3562 (2006). Дополнительные способы включают в себя описанные, например, в патенте США № 7,189,826 (описывающем получение моноклональных человеческих антител IgM из линий гибридных клеток) и в Ni, *Xiandai Mianyixue*,
26(4):265-268 (2006) (описывающем гибридомы типа «человек-человек»). Технология гибридомы человека (технология Trioma) также описана в Vollmers and
20 Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005), а также Vollmers and Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005).

[0108] Антитела человека также могут быть созданы путем выделения последовательностей варибельных доменов клона Fv, выбранных из библиотек фагового отображения, полученных от человека. Такие последовательности
25 варибельных доменов затем можно комбинировать с желаемым константным доменом человека. Ниже описаны методики для отбора антител человека из библиотек антител.

Антитела, полученные из библиотек

[0109] Антитела изобретения могут быть выделены путем скрининга комбинаторных библиотек по антителам с желаемой активностью или активностями. Например, в
30 данной области известен ряд способов создания библиотек фагового отображения и скрининга таких библиотек на наличие антител, обладающих желаемыми характеристиками связывания. Такие способы рассмотрены, например, в Hoogenboom et al. in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa,

N.J., 2001) и дополнительно описаны, например, в McCafferty et al., *Nature* 348:552-554; Clackson et al., *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Marks and Bradbury, в *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, N.J., 2003); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); а также Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004).

[0110] В некоторых способах фагового отображения репертуары генов VH и VL отдельно клонируют с помощью полимеразной цепной реакции (PCR) и произвольно рекомбинируют в фаговых библиотеках, которые затем могут быть подвергнуты скринингу на наличие антиген-связывающего фага, как описано в Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Фаг, как правило, отображает фрагменты антител либо как одноцепочечные фрагменты Fv (scFv), либо как фрагменты Fab. Библиотеки из иммунизированных источников обеспечивают антитела с высокой аффинностью к иммуногену без потребности в конструировании гибридом. В качестве альтернативы наивный репертуар может быть клонирован (например, от человека) для обеспечения одного источника антител против широкого диапазона не своих, а также своих антигенов без какой-либо иммунизации, как описано в Griffiths et al., *EMBO J*, 12: 725-734 (1993). Наконец, наивные библиотеки также могут быть получены синтетически путем клонирования нерearанжированных сегментов V-гена от стволовых клеток и с применением PCR-праймеров, содержащих произвольную последовательность, для кодирования высоковариабельных участков CDR3 и для выполнения реаранжировки *in vitro*, как описано в Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). Патентные публикации, описывающие фаговые библиотеки антител человека, включают в себя, например: патент США № 5,750,373 и патентные публикации США №№ 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 и 2009/0002360.

[0111] Антителами или фрагментами антител, выделенными из библиотек антител человека, в настоящем документе считаются антитела человека или фрагменты антител человека.

30 **Мультиспецифические антитела**

[0112] В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в настоящем документе, представляет собой мультиспецифичное антитело, например биспецифичное антитело. Мультиспецифичные антитела представляют собой

моноклональные антитела, обладающие специфичностью связывания по меньшей мере для двух различных сайтов. В некоторых вариантах осуществления одна из специфичностей связывания относится к SEACAM1, а другая — к любому другому антигену. В некоторых вариантах осуществления одна из специфичностей связывания относится к SEACAM5, а другая — к любому другому антигену. В некоторых вариантах осуществления одна из специфичностей связывания относится к SEACAM6, а другая — к любому другому антигену. В некоторых вариантах осуществления биспецифичные антитела могут связываться с двумя различными эпитопами SEACAM1, или SEACAM5, или SEACAM6. Биспецифичные антитела также можно применять для локализации цитотоксических агентов на клетках, которые экспрессируют SEACAM1, или SEACAM5, или SEACAM6. Биспецифичные антитела могут быть получены как полноразмерные антитела или фрагменты антител.

Варианты антител

[0113] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе рассматриваются варианты аминокислотной последовательности антител. Например, может быть желательным улучшение аффинности связывания и/или других биологических свойств антитела. Варианты аминокислотной последовательности антитела могут быть получены путем внесения соответствующих модификаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, или путем пептидного синтеза. Такие модификации включают в себя, например, делеции и/или вставки, и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антитела. Любая комбинация делеции, вставки и замены может быть сделана для достижения конечной конструкции при условии, что конечная конструкция обладает желаемыми характеристиками, например связыванием антигена.

[0114] В некоторых вариантах осуществления представленное в настоящем документе антитело изменено для повышения или понижения степени, с которой антитело гликозилируется. Добавление или делеция сайтов гликозилирования в антителе может быть удобно осуществлено путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, чтобы создать или удалить один или более сайтов гликозилирования.

[0115] В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных модификаций могут быть введены в Fc-участок представленного в настоящем документе антитела, тем самым создавая вариант Fc-участка. Вариант Fc-участка может содержать последовательность человеческого Fc-участка (например, Fc-участка

человеческого IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), содержащую аминокислотную модификацию (например, замену) в одной или более аминокислотных позициях.

[0116] В некоторых вариантах осуществления изобретение предусматривает вариант антитела, который обладает некоторыми, но не всеми эффекторными функциями, что делает его желаемым кандидатом для применений, при которых важно время полужизни антитела *in vivo*, а некоторые эффекторные функции (такие как комплемент и ADCC) являются ненужными или вредными. Могут быть выполнены анализы цитотоксичности *in vitro* и/или *in vivo* для подтверждения снижения/истощения активностей CDC и/или ADCC. Например, можно провести анализы связывания с Fc-рецептором (FcR), чтобы убедиться, что антитело не способно связываться с Fc γ R (следовательно, вероятно, не обладает активностью ADCC), но сохраняет способность связываться с FcRn. Первичные клетки для опосредования ADCC, NK-клетки, экспрессируют только Fc γ RIII, тогда как моноциты экспрессируют Fc γ RI, Fc γ RII и Fc γ RIII. Сводные данные по экспрессии FcR на гематопозитических клетках приведены в таблице 3 на странице 464 Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991). Неограничивающие примеры *in vitro* анализов для оценки активности ADCC представляющей интерес молекулы описаны в патенте США № 5,500,362 (см., например, Hellstrom, I. et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)) и Hellstrom, I et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); патент США № 5,821,337 (см. Bruggemann, M. et al., *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)). В качестве альтернативы могут быть использованы способы нерадиоактивных анализов (см., например, нерадиоактивный анализ цитотоксичности АСТП™ для проточной цитометрии (CellTechnology, Inc. Mountain View, Calif.; и нерадиоактивный анализ цитотоксичности CytoTox 96® (Promega, Madison, Wis.). Применимые для таких анализов эффекторные клетки включают в себя мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и натуральные клетки-киллеры (NK). В качестве альтернативы или дополнительно активность ADCC представляющей интерес молекулы может быть оценена *in vivo*, например на животной модели, такой как описанная в Clynes et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998). Также могут быть выполнены анализы связывания C1q для подтверждения того, что антитело не способно связываться с C1q и, следовательно, не обладает активностью CDC. См., например, ИФА связывания C1q и C3c в WO 2006/029879 и WO 2005/100402. Для оценки активации комплемента может быть выполнен анализ CDC (см., например, Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol.*

Methods 202:163 (1996); Cragg, M. S. et al., *Blood* 101:1045-1052 (2003); а также Cragg, M. S, and M. J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004)). Определение связывания FcRn и клиренса/времени полужизни *in vivo* также может быть выполнено с помощью способов, известных в данной области техники (см., например, Petkova, S. B. et al., *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006)).

[0117] Антитела с пониженной эффекторной функцией включают в себя таковые с заменой одного или более остатков Fc-участка 238, 265, 269, 270, 297, 327 и 329 (патент США № 6,737,056). Такие мутанты Fc включают в себя мутантов Fc с заменами в двух или более аминокислотных позициях 265, 269, 270, 297 и 327, в том числе так называемый мутант Fc «DANA» с заменой остатков 265 и 297 на аланин (патент США № 7,332,581).

[0118] Описаны некоторые варианты антитела с улучшенным или пониженным связыванием с FcR. (см., например, патент США № 6,737,056; WO 2004/056312, и Shields et al., *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001)).

[0119] В некоторых вариантах осуществления вариант антитела содержит Fc-участок с одной или более аминокислотными заменами, которые улучшают ADCC, например, с заменами в позициях 298, 333 и/или 334 Fc-участка (нумерация остатков по EC).

[0120] В некоторых вариантах осуществления изменения внесены в Fc-участок, что приводит к изменению (т.е. улучшению или снижению) связывания с C1q и/или комплементзависимой цитотоксичности (CDC), например, как описано в патенте США № 6,194,551, WO 99/51642, а также Idusogie et al. *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

[0121] Антитела с увеличенным временем полужизни и улучшенным связыванием с неонатальным Fc-рецептором (FcRn), который отвечает за перенос материнских IgG плоду (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) и Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)), описаны в US2005/0014934A1 (Hinton et al.). Эти антитела содержат Fc-участок с одной или более заменами в нем, что улучшает связывание Fc-участка с FcRn. Такие варианты Fc включают в себя таковые с заменами в одном или более остатках Fc-участка: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 или 434, например, с заменой остатка 434 Fc-участка (патент США № 7,371,826).

[0122] В некоторых вариантах осуществления может быть желательным создание конструированных с цистеином антител, например «thioMAb», в которых один или более остатков антитела замещены цистеиновыми остатками. В конкретных вариантах

осуществления замещенные остатки встречаются в неэкранированных сайтах антитела. Путем замещения таких остатков цистеином реакционноспособные тиоловые группы тем самым размещаются в неэкранированных сайтах антитела и могут быть использованы для конъюгации антитела с другими фрагментами, такими как фрагменты лекарственного средства или фрагменты линкер-лекарственного средства для создания иммуноконъюгата, как описано далее в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления любой один или более из следующих остатков могут быть замещены цистеином: V205 (нумерация по Кабату) легкой цепи; A118 (нумерация по ЕС) тяжелой цепи; и S400 (нумерация по ЕС) Fc-участка тяжелой цепи. Конструированные с цистеином антитела могут быть образованы, как описано, например, в патенте США № 7,521,541.

Рекомбинантные способы и композиции

[0123] Антитела можно получить с помощью рекомбинантных способов и композиций, например, как описано в патенте США № 4,816,567. В одном варианте осуществления предложена выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая анти-CD122 антитело, описанное в настоящем документе. Такая нуклеиновая кислота может кодировать аминокислотную последовательность, содержащую VL антитела, и/или аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела (например, легкую и/или тяжелую цепи антитела). В дополнительном варианте осуществления предложены один или более векторов (например, векторов экспрессии), содержащих такую нуклеиновую кислоту. В дополнительном варианте осуществления предложена клетка-хозяин, содержащая такую нуклеиновую кислоту. В одном из таких вариантов осуществления клетка-хозяин содержит (например, была трансформирована): (1) вектор, включающий в себя нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VL антитела, и аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела, или (2) первый вектор, включающий в себя нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VL антитела, и второй вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела. В одном варианте осуществления клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку, например клетку яичника китайского хомячка (CHO) или лимфоидную клетку (например, клетку Y0, NS0, Sp20). В одном варианте осуществления предложен способ получения анти-CD122 антитела, причем способ включает в себя культивирование

клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, которая кодирует антитело, как указано выше, в условиях, подходящих для экспрессии антитела, и, необязательно, извлечение антитела из клетки-хозяина (или среды для культивирования клеток-хозяина).

5 [0124] Для рекомбинантного получения анти-CD122 антитела нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, например, как описано выше, выделяют и встраивают в один или более векторов для дальнейшего клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяина. Такую нуклеиновую кислоту можно легко выделить и секвенировать с помощью стандартных методов (например, с помощью олигонуклеотидных зондов, которые
10 способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антител).

[0125] Клетки-хозяева, подходящие для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих антитела, включают в себя прокариотические или эукариотические клетки, описанные в настоящем документе. Например, антитела могут быть получены в
15 бактериях, в частности, когда не требуется гликозилирование и эффекторная функция Fc. Экспрессия фрагментов антител и полипептидов в бактериях описана, например, в патенте США №№ 5,648,237, 5,789,199 и 5,840,523. (См. также Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (В. К. С. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), стр. 245-254, описывающих экспрессию фрагментов антител в *E. coli*.) После экспрессии
20 антитело может быть выделено из пасты бактериальных клеток в виде растворимой фракции и подвергнуто дальнейшей очистке.

[0126] Помимо прокариот, подходящими хозяевами для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих антитела, являются эукариотические микробы, такие как мицелиальные грибы или дрожжи, в том числе штаммы грибов и дрожжей, чьи пути
25 гликозилирования были «гуманизированы», что привело к получению антитела с частично или полностью человеческим профилем гликозилирования. См. Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004), а также Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006).

[0127] Клетки-хозяева, подходящие для экспрессии гликозилированного антитела,
30 также получают из многоклеточных организмов (беспозвоночных и позвоночных). Примеры клеток беспозвоночных включают в себя клетки растений и насекомых. Были идентифицированы многочисленные бакуловирусные штаммы, которые можно

применять в сочетании с клетками насекомых, в частности для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*.

[0128] Культуры клеток растений также могут быть применены в качестве хозяев. См., например, патенты США №№ 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978 и 6,417,429 (описывающие технологию PLANTIBODIES™ для получения антител в трансгенных растениях).

[0129] Клетки позвоночных также могут быть применены в качестве хозяев.

Например, можно использовать клеточные линии млекопитающих, адаптированные для роста в суспензии. Другими примерами пригодных линий клеток-хозяев

млекопитающих являются: линия CV1 почки обезьяны, трансформированная SV40 (COS-7); линия эмбриональной почки человека (клетки 293 или 293, как описано, например, в Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); клетки почек детенышей хомяка (ВНК); мышинные клетки Сертоли (клетки ТМ4, как описано, например, в Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); клетки почки обезьяны (CV1); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76); клетки карциномы шейки матки человека (HELA); клетки почек собак (MDCK; клетки печени крысы линии Buffalo (BRL 3A); клетки легкого человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); опухоль молочной железы мыши (ММТ 060562); клетки TRI, как описано, например, в Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982); клетки MRC 5; и клетки FS4. Другие пригодные линии клеток-хозяев млекопитающих включают в себя клетки яичника китайского хомяка (CHO), в том числе клетки DHFR⁻ CHO (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); а также линии клеток миеломы, такие как Y0, NS0 и Sp2/0. Обзор некоторых линий клеток-хозяев млекопитающих, подходящих для производства антител, см., например, в Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology, Vol. 248* (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J.), стр. 255-268 (2003).

Модификация антител

[0130] Антитела изобретения могут быть подвергнуты одной или более

модификациям, известным в данной области, которые могут быть полезны для

управления стабильностью при хранении, фармакокинетикой и/или любым аспектом биологической активности пептида, такими как, например, активность, селективность и лекарственное взаимодействие. Химическая модификация, которой могут быть

- подвергнуты пептиды, включает в себя, например, конъюгацию с пептидом одного или более полиэтиленгликолей (ПЭГ), монометоксиполиэтиленгликолей, декстранов, поли-(N-винилпирролидон) полиэтиленгликолей, гомополимеров пропиленгликолей, сополимеров полипропиленоксида/этиленоксида, полипропиленгликолей,
- 5 полиоксиэтилированных полиолов (например, глицерина) и поливинилового спирта, коломиновых кислот или других полимеров на основе углеводов, полимеров аминокислот и производных биотина. Конъюгация ПЭГ с белками по остаткам Cys описана, например, в Goodson, R. J. & Katre, N. V. (1990) *Bio/Technology* 8, 343, а также T. P. (1992) *Synthetic Comm.* 22, 2417.
- 10 [0131] Другие полезные модификации включают в себя, помимо прочего, ацилирование с применением способов и композиций, таких как описано, например, в патенте США № 6,251, 856 и WO 00/55119.

Терапевтическое введение

- 15 [0132] Антитела настоящего изобретения можно вводить отдельно или в комбинации с другими фармакологически активными агентами. Следует понимать, что такая комбинированная терапия охватывает различные терапевтические схемы, включающие в себя, помимо прочего, введение нескольких агентов вместе в однократной дозированной форме или в отдельных дозированных формах. Если агенты
- 20 присутствуют в различных дозированных формах, то введение может быть одновременным или почти одновременным или может следовать любой заранее определенной схеме, которая включает в себя введение различных агентов.

- [0133] Например, при лечении рака антитела изобретения можно преимущественно вводить в комбинированной схеме лечения с одним или более агентами, в том числе
- 25 иммунотерапевтическими агентами.

Способы введения

- [0134] Антитела данного изобретения можно вводить в виде фармацевтических композиций, содержащих стандартные носители, известные в данной области, для
- 30 доставки белков и пептидов, а также с помощью генной терапии. Предпочтительно фармацевтическая композиция включает в себя в качестве смеси фармацевтически (т.е.

физиологически) приемлемый носитель, эксципиент или разбавитель и одну или более молекул, нацеленных на SEACAM1, или SEACAM5, или SEACAM6 в качестве активного ингредиента. В одном варианте осуществления молекула, нацеленная на SEACAM1, представляет собой антитело, которое специфически связывается с SEACAM1. В другом варианте осуществления молекула, нацеленная на SEACAM5, представляет собой антитело, которое специфически связывается с SEACAM5. В одном варианте осуществления молекула, нацеленная на SEACAM6, представляет собой антитело, которое специфически связывается с SEACAM6. Приготовление фармацевтических композиций, содержащих пептиды в качестве активных ингредиентов, хорошо известно в данной области. Обычно такие композиции готовят в виде инъекционных препаратов, либо в виде жидких растворов, либо в виде суспензий, однако также можно приготовить твердые формы, подходящие для растворения или суспендирования в жидкости перед инъекцией. Препарат также можно эмульгировать. Активный терапевтический ингредиент часто смешивают с эксципиентами, которые являются фармацевтически (т. е. физиологически) приемлемыми и совместимыми с активным ингредиентом. Подходящими эксципиентами являются, например, вода, физиологический раствор, декстроза, глицерин, этанол и т. п. и их комбинации. Кроме того, при необходимости композиция может содержать незначительные количества вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, pH-буферные агенты, которые усиливают эффективность активного компонента.

[0135] Молекула, нацеленная на SEACAM, может быть включена в фармацевтическую композицию в виде нейтрализованных физиологически приемлемых солевых форм. В одном варианте осуществления молекула, нацеленная на SEACAM, представляет собой антитело, которое специфически связывается с SEACAM. Подходящие соли включают в себя кислотно-аддитивные соли (т. е. образованные из свободных аминогрупп молекулы пептида), и соли, которые образуются из неорганических кислот, таких как, например, соляная или фосфорная кислоты, или таких органических кислот, как уксусная, щавелевая, винная, миндальная кислоты и т. п. Соли, образованные из свободных карбоксильных групп, также могут быть получены из неорганических оснований, таких как, например, гидроксиды натрия, калия, аммония, кальция или железа, и таких органических оснований, как изопропиламин, триметиламин, 2-этиламиноэтанол, гистидин, прокаин и т. п.

[0136] Фармацевтические композиции можно вводить системно пероральным или парентеральным путем. Неограничивающие парентеральные способы введения включают в себя подкожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, чрескожный, ингаляционный, интраназальный, внутриартериальный, интратекальный, энтеральный, подъязычный или ректальный способы введения. Из-за лабильной природы аминокислотных последовательностей предпочтительным является парентеральное введение. Предпочтительные способы введения включают в себя аэрозоли для назального или бронхиального всасывания; суспензии для внутривенного, внутримышечного, интратерального или подкожного введения; и соединения для перорального введения.

[0137] Внутривенное введение, например, можно осуществлять путем инъекции единичной дозы. Термин «единичная доза» при применении его в отношении фармацевтической композиции настоящего изобретения относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единой дозы для человека, причем каждая единица содержит заранее определенное количество активного вещества, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта, в сочетании с необходимым разбавителем, т. е. жидкостью, применяемой для разбавления концентрированного или чистого вещества (жидкого или твердого), что придает этому веществу правильную (разбавленную) концентрацию для применения. Для инъекционного введения композиция находится в стерильном растворе или суспензии или может быть эмульгирована в фармацевтически или физиологически приемлемых водных или масляных носителях, которые могут содержать консерванты, стабилизаторы и материал для придания раствору или суспензии изотоничности с жидкостями организма (т. е. кровью) реципиента.

[0138] Эксципиенты, подходящие для применения, представляют собой воду, фосфатно-солевой буфер, рН 7,4, 0,15 М водный раствор хлорида натрия, декстрозу, глицерин, разбавленный этанол и т. п., а также их смеси. Примерами стабилизаторов являются полиэтиленгликоль, белки, сахариды, аминокислоты, неорганические кислоты и органические кислоты, которые можно применять либо по отдельности, либо в виде смеси. Применяемые количества или объемы, а также способы введения определяются на индивидуальной основе и соответствуют количествам, применяемым в аналогичных видах применения или показаниях, известных специалистам в данной области.

[0139] Фармацевтические композиции вводят способом, совместимым с лекарственной формой, и в терапевтически эффективном количестве. Вводимый объем зависит от субъекта, подлежащего лечению, и способности иммунной системы субъекта утилизировать активный ингредиент. Точные количества активного ингредиента, необходимые для введения, зависят от суждения практикующего врача и являются конкретными для каждого человека.

[0140] Дополнительные рекомендации по приготовлению фармацевтических составов можно найти, например, в Gilman et al. (eds), 1990, Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8th ed., Pergamon Press; а также Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., 1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa.; Avis et al. (eds), 1993, Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Dekker, New York; Lieberman et al. (eds), 1990, Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Dekker, New York.

[0141] В настоящем изобретении также рассматриваются композиции, содержащие пептидный IR-агонист или IR-антагонист и физиологически приемлемый носитель, эксципиент или разбавитель, как подробно описано в настоящем документе.

[0142] Иллюстрацией настоящего изобретения являются представленные ниже примеры. Эти примеры не следует рассматривать как ограничивающие объем данного изобретения. Примеры включены в целях иллюстрации, а данное изобретение ограничено только формулой изобретения.

Пример 1. Создание анти-СЕАСАМ мАт

[0143] 1.1. Создание анти-СЕАСАМ мАт с применением OmniRats®

[0144] Крысы OmniRat® имеют химерный человеческий/крысиный локус IgH (содержащий 22 человеческих сегмента V_H, все человеческие сегменты D и J_H в естественной конфигурации, связанные с крысиным локусом C_H), а также полностью человеческие локусы IgL (12 V_κs, связанных с J_κ-C_κ, и 16 V_λs, связанных с J_λ-C_λ). (см. например, Osborn, et al. (2013) J Immunol 190(4): 1481-1490). Соответственно, крысы демонстрируют сниженную экспрессию крысиного иммуноглобулина, и в ответ на иммунизацию внедренные человеческие трансгены тяжелой и легкой цепей переключаются на экспрессию другого класса и подвергаются соматической мутации с образованием высокоаффинных химерных человеческих/крысиных моноклональных

антител IgG с полностью человеческими вариabельными областями. Получение и применение OmniRat® и геномные модификации в таких крысах описаны в WO14/093908.

[0145] OmniRats иммунизировали внеклеточным доменом CEACAM1 человека, слитым с меткой 10-His (R&D Systems, #2244-CM, SEQ ID NO: 6) и стимулировали тем же антигеном каждые три-четыре дня двусторонними инъекциями в основание хвоста, сухожилие скакательного сустава, подмышечную область и ухо. После 48-дневного режима иммунизации лимфатические узлы крыс собирались и использовались для получения гибридом, а супернатанты гибридом подвергали скринингу, как описано ниже.

SEQ ID NO: 6

qlttesmpfnvaegkevlhvnlpqqlfgyswykgervdgnrqivgyaigtqqatpgpansgretiyfnaslliqnvtqndtgfyt
lqviksdlnveeatgqfhvypelpkpsissnnsnpvedkdavafcepetqdttylwwinnqslpvsprlqslsngnrllsvtrndt
gpyeceiqnpvsanrdsdpvtlnvtygpdtpispsdtyyrganlsclscyaasnpaqsylngtffqstqelfipnitvnnsgsyt
channsvtgcnrtrvtktiivtelspvvakpqikaskttvtgdkdsvnlctstndtgisirwffknqslpssermklsqgnttllsinpvkr
edagtywcevfnpisknqsdpimlnvnynalpqenglspghhhhhhhhh

[0146] **1.2. Создание анти-CEACAM мАт с применением библиотек фагового отображения**

[0147] Fab, связывающие CEACAM1, были выбраны стандартными методами из двух наборов библиотек фагового дисплея *de novo* рIX, как описано в Shi *et al.*, J Mol Biol 397:385-96, 2010 и WO2009/085462). Вкратце, два набора библиотек, называемые V3.0 и V5.0, создавали путем диверсификации человеческих каркасов, в которых гены VH зародышевой линии IGHV1-69*01, IGHV3-23*01 и IGHV5-51*01 рекомбинировали с человеческим минигеном IGHJ-4 посредством петли H3 (миниген IGHJ-6 также использовался в V5.0), а человеческие гены VL-каппа зародышевой линии O12 (IGKV1-39*01), L6 (IGKV3-11*01), A27 (IGKV3-20*01) и B3 (IGKV4-1*01) рекомбинировали с минигеном IGKJ-1 для сборки полных доменов VH и VL. Для диверсификации были выбраны положения в вариabельных областях тяжелой и легкой цепей вокруг петель H1, H2, L1, L2 и L3, которые часто контактируют с белковыми и пептидными антигенами. Диверсификация последовательности в выбранных положениях ограничивалась остатками, встречающимися в каждом положении в семействах генов зародышевой линии IGHV или IGLV для соответствующих

генов IGHV или IGLV. Диверсификацию в петле H3 создавали с использованием синтетических петель коротких или средних размеров длиной 7–14 аминокислот для библиотек V3.0 и длиной 6–19 аминокислот для библиотек V5.0. Распределение аминокислот в H3 выполняли аналогично наблюдаемой вариации аминокислот в человеческих антителах. Каркасы, использованные для создания библиотек, получали название в соответствии с их происхождением от человеческого гена зародышевой линии VH и VL. В обоих наборах V3.0 и V5.0 каждую из трех библиотек тяжелых цепей объединяли с четырьмя легкими цепями зародышевой линии или библиотеками легких цепей зародышевой линии для создания 12 уникальных комбинаций VH:VL для каждого набора библиотек, используемых в экспериментах по отбору.

[0148] **Клонирование V-области.** Общую РНК из лизатов клеток гибридомы фага очищали с использованием набора RNeasy 96 (Qiagen) в соответствии с протоколом производителя. Полученную РНК количественно определяли с использованием Drop Sense и либо хранили при -80 °С, либо использовали для синтеза кДНК с использованием системы синтеза First-Strand методом ОТ-ПЦР (Invitrogen). Синтез первой цепи кДНК проводили с использованием ген-специфических праймеров, отожженных с константными областями тяжелых, каппа-и лямбда-цепей, соответственно. Реакционную смесь для ОТ-ПЦР, содержащую до 3 мкг очищенной РНК, ген-специфического праймера, смеси дНТФ, реакционного буфера, 25 мМ MgCl₂, DTT, RNaseOUT™ (40 Ед/мкл, Invitrogen) и SuperScript™ III RT (200 Ед/мкл, Invitrogen, кат. № 18080-051), инкубировали при 50 °С в течение 50 минут и при 85 °С в течение 5 минут. Полученную одноцепочечную кДНК хранили при -20 °С или использовали непосредственно для ПЦР-амплификации. Реакцию ПЦР проводили с использованием полимеразы Platinum Pfx (Invitrogen). Фрагменты v-области амплифицировали путем отжига прямого и обратного праймеров с лидерными последовательностями и константными областями тяжелой, каппа-и лямбда-цепей, соответственно, с использованием оптимизированных условий ПЦР. Полученные ПЦР-фрагменты секвенировали, аминокислотные последовательности выделенных v-областей оптимизировали по кодонам и клонировали в вектор экспрессии на основе pUnder, несущий константную область IgG2 Sigma с каппа-мутациями F405L.

[0149] **Трансфекция и очистка Expi293 в малых масштабах.** Выбранные антитела, идентифицированные в ходе операций иммунизации или фагового отображения, клонировали и экспрессировали как IgG2 Sigma и очищали в небольшом объеме 2 мл.

Клетки Expi293™ (ThermoFisher Scientific) высевали с плотностью $1,25 \times 10^5$ - $2,25 \times 10^5$ жизнеспособных клеток/мл в среде экспрессии Expi293™ и культивировали в встряхиваемых колбах объемом 125 мл – 2 л при 37 °С, 7 % CO₂. Клетки пересевали, когда плотность достигала логарифмической фазы роста при 3×10^6 – 5×10^6 жизнеспособных клеток/мл с 98-99 % жизнеспособности.

[0150] В день трансфекции определяли плотность жизнеспособных клеток и процент жизнеспособности. Клетки трансфицировали с плотностью 3×10^6 жизнеспособных клеток/мл в соответствии с протоколом трансфекции производителя (ThermoFisher, публикация № MAN0007814). Культуру собирали на 6 сутки после трансфекции путем центрифугирования при 850xG в течение 15 минут перед очисткой. Антитела очищали из осветленных супернатантов с использованием смолы mAb Select Sure (GE Healthcare) и диализовали в PBS. Концентрации белка определяли путем измерения при длине волны A280 на фильтрате с помощью прибора DropSense (Trinean).

15 **Пример 2. Характеристика связывания анти-СЕАСАМ мАт с СЕАСАМ1**

[0151] **2.1. Связывание с рекомбинантным СЕАСАМ1.** Супернатанты гибридом и полученные из фагового отображения антитела подвергали скринингу с помощью ИФА на предмет связывания с рекомбинантным белком СЕАСАМ1 (R&D Systems, Minneapolis, MN).

[0152] Планшеты покрывали 50 мкл 1 мкг/мл СЕАСАМ1 (#2244-СМ, R&D Systems) и оставляли на ночь при температуре 4 °С. На следующий день через 16 часов планшеты блокировали 200 мкл 0,4% альбумина бычьей сыворотки (БСА) (Sigma, A9647) в PBS на 1 час при комнатной температуре. Планшеты однократно промывали 300 мкл 0,02% Tween-20 в PBS на устройстве для промывки планшетов Biotek. 1/2 логарифмического разбавления мАт СЕАСАМ, начиная с 10 мкг/мл до 0,0001 мкг/мл в 0,4% BSA или только в PBS, высевали для каждого антитела. В планшеты с покрытием добавляли по 50 мкл каждого разбавления. Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение примерно 30 мин. Затем планшеты промывали 3 раза 300 мкл 0,02% Tween-20 в PBS с применением устройства для промывки планшетов Biotek. 50 мкл 1:10 000 козьего анти-huFc'2-HRP (Jackson ImmunoResearch, № по каталогу 109-036-098) добавляли в планшеты. Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение примерно 30 мин. Затем планшеты промывали 3 раза 300 мкл PBS/0,02% Tween-20 на

устройстве для промывки планшетов Biotek. Добавляли 50 мкл 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМВ, Sigma T0440), оставляли для проявления окраски, после чего добавляли 50 мкл 4N H₂SO₄. Планшеты анализировали при 450 нм с применением считывающего устройства для микропланшетов EnVision (PerkinElmer). Изотипический контроль (антитело CNTO8939, специфичное к вирусу RSV, имеющее сигма-скелет IgG2 человека) высевали на последние 3 планшета в концентрации 10 мкг/мл. Поглощение при 450 нм (рис. 2) анализировали с применением графиков рассеяния XY. После логарифмического преобразования строили нелинейные аппроксимирующие кривые, а значения EC50 рассчитывали с применением GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Для нескольких антител EC50 нельзя было произвести расчет с помощью GraphPad Prism из-за плохого соответствия кривой; в этих случаях значения EC50 оценивали визуально в средней точке имеющейся кривой. Значения EC50 для связывания с рекомбинантным CEACAM1 представлены в таблице 1.

Таблица 1. Значения EC50 для анти-CEACAM1 мАт, связывающихся с рекомбинантным CEACAM1, как определено с помощью ИФА.

Идент. № мАт	CEACAM1 EC50, мкг/мл
ССМВ02.004	17,06
ССМВ03.004	19,91
ССМВ04.004	11,19
ССМВ07.004	12,19
ССМВ09.004	7,296
ССМВ18.004	6,907
ССМВ20.004	18,62
ССМВ23.004	45,47
ССМВ35.004	55,64
ССМВ42.004	6,201
ССМВ61.004	26,62
ССМВ66.004	6,706

[0153] **2.2. Связывание анти-CEACAM мАт с клетками, сверхэкспрессирующими CEACAM1.**

[0154] Оценивали связывание анти-CEACAM мАт с клетками НЕК293К, сверхэкспрессирующими CEACAM1.

[0155] **Получение клеток НЕК293Т, сверхэкспрессирующих CEACAM1.**

[0156] Клетки НЕК293Т (ATCC, Manassas, VA), сверхэкспрессирующие полноразмерный CEACAM1, были получены с применением лентивирусных векторов, кодирующих CEACAM1 (SEQ ID NO: 1) и метку GFP (LPP-U0045-Lv105-200, Genecoreoia). Клетки промывали свежей средой, а затем суспендировали в Opti-MEM (Thermo), содержащем 8 мкг/мл полибрена при 2×10^6 клеток/мл. В 12-луночный планшет для тканевых культур добавляли по 0,5 мл клеточной суспензии (1 $\times 10^6$ клеток) на лунку. Вирусные частицы добавляли при 0,3, 1,0, 3,0 и 5,0 единицах множественности заражения (MOI). Планшеты осторожно перемешивали и инкубировали в течение 20 мин в вытяжном шкафу при комнатной температуре.

10 Планшеты центрифугировали в течение 90 минут при 1500 g при температуре 37 °C. К клеткам добавляли 0,5 мл свежей среды Opti-MEM. Планшеты инкубировали при 37 °C в течение 48–72 часов. Клетки проверяли на наличие сигнала GFP под действием УФ-света. При 80–90% конфлюентности клетки переносили в большую чашку диаметром 100 мм или в T-75, а среду заменяли селективной средой, содержащей 0,5 мкг/мл

15 пуромицина. За клетками наблюдали и выдерживали их на селективной среде (Opti-MEM с добавлением 0,5 мкг/мл пуромицина) в течение следующих нескольких дней или недель до тех пор, пока большинство клеток не становилось жизнеспособными в селективной среде. Клетки окрашивали на экспрессируемый белок с использованием меченых антител и готовили для анализа FACS. Когда были достигнуты достаточные

20 уровни экспрессии, стабильные клетки замораживали или сортировали на клетки с высокой/средней или низкой экспрессией. Селекцию проводили в течение 1 недели с применением 0,5 мкг/мл пуромицина.

[0157] Проточная цитометрия

[0158] Для подтверждения поверхностной экспрессии CEACAM-1 применяли проточную цитометрию. Для окрашивания в проточной цитометрии клетки блокировали в буфере для окрашивания FACS, содержащем блок Fc человека (Miltenyi Biotech, 1:20), и набор LIVE/DEAD™ Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit (Invitrogen, 1:500) в течение 15 минут при комнатной температуре. Затем клетки окрашивали

25 одним из следующих античеловеческих антител в течение 30 минут при 4 °C в 50 мкл буфера для окрашивания FACS на лунку: анти-CEACAM-1 антитело, конъюгированное с фикоэритрином (PE) (R&D Systems, кат. № FAB2244P), 1:50), изотипический контроль мышиного IgG2b, конъюгированный с фикоэритрином (Biolegend), и немеченое анти-CEACAM-1 антитело (специфичное в отношении CD66a) (Millipore,

30

кат. № МАВТ65, 1:50). Антитело и изотип мышиноного IgG1 определяли с помощью вторичного антимышиного антитела PE (Jackson ImmunoResearch, 1:200).

[0159]

[0160] Затем клетки со сверхэкспрессией СЕАСАМ1 субклонировали и сортировали на очищенные популяции СЕАСАМ1-положительных клеток с применением стандартных методов (**рис. 3**). Затем эти клетки применили для создания кривых связывания с помощью проточной цитометрии (**рис. 4**). Антитела СЕАСАМ, связывающиеся с поверхностью сверхэкспрессирующих клеток, обнаруживали с применением козьего антитела против человеческого Fc (Jackson ImmunoResearch, № по каталогу 109-606-098). Большинство антител очень хорошо связывались с клетками НЕК293Т, экспрессирующими СЕАСАМ-1, и не титровались, что означает, что концентрация, при которой связывание было неопределяемым, не была достигнута (**таблица 2**).

Таблица 2. Расчеты EC50 для анти-СЕАСАМ-1 антител, которые связываются с клетками НЕК293Т, экспрессирующими СЕАСАМ-1.

Идент. № мАт	СЕАСАМ1 EC50, (нг/мл)
ССМВ02.004	Сильный связующий агент, не титрировался
ССМВ03.004	Сильный связующий агент, не титрировался
ССМВ04.004	Сильный связующий агент, не титрировался
ССМВ07.004	Сильный связующий агент, не титрировался
ССМВ09.004	Сильный связующий агент, не титрировался
ССМВ18.004	Сильный связующий агент, не титрировался
ССМВ20.004	Сильный связующий агент, не титрировался
ССМВ23.004	4,194
ССМВ35.004	27,5
ССМВ42.004	Сильный связующий агент, не титрировался
ССМВ61.004	35,34
ССМВ66.004	Сильный связующий агент, не титрировался

[0161]

Пример 3. Характеристика связывания анти-СЕАСАМ мАт с СЕАСАМ5 и СЕАСАМ6

[0162] 3.1. Связывание с рекомбинантными СЕАСАМ5 и СЕАСАМ6.

- 5 Перекрестный скрининг на специфичность очищенных фаговых и гибридных антител к рекомбинантным СЕАСАМ5 (R&D Systems #4128-СМ) и СЕАСАМ6 (R&D Systems #3934-СМ) проводили с применением ИФА в соответствии с протоколом, описанным в примере 2. Кривые связывания мАт с СЕАСАМ5 показаны на **рис. 5а**, а с СЕАСАМ6 — на **рис. 5б**. Антитела СЕАСАМ1 имели переменное связывание с
- 10 белками СЕАСАМ5 и СЕАСАМ6, демонстрируя некоторую перекрестную реактивность (**таблица 3**).

Таблица 3. Значения ЕС50 для анти-СЕАСАМ1 мАт, связывающихся с рекомбинантным СЕАСАМ5 или СЕАСАМ6, как определено с помощью ИФА.

Идент. № мАт	СЕАСАМ5 ЕС50 (мкг/мл)	СЕАСАМ6 ЕС50 (мкг/мл)
ССМВ02.004	50	> 10 000
ССМВ03.004	16,44	5
ССМВ04.004	6,463	5,571
ССМВ07.004	9,773	> 10 000
ССМВ09.004	4,461	5,131
ССМВ18.004	4,32	6,054
ССМВ20.004	4,268	> 10 000
ССМВ23.004	> 10 000	> 10 000
ССМВ35.004	> 10 000	> 10 000
ССМВ42.004	1,141	> 10 000
ССМВ61.004	> 10 000	1243
ССМВ66.004	1688	> 10 000

- 15 [0163] 3.2. Связывание с клетками, сверхэкспрессирующими СЕАСАМ5 и СЕАСАМ6. Клетки НЕК293Т, сверхэкспрессирующие СЕАСАМ5 и СЕАСАМ6, были созданы с применением трансдукции лентивирусными векторами, кодирующими СЕАСАМ5 (LPP-G0056-Lv105-100, Genescoreoia) и СЕАСАМ6 (LPP-G0304-Lv105-100, Genescoreoia) в соответствии с протоколом, описанным в примере 2. Проточную
- 20 цитометрию применяли для подтверждения экспрессии СЕАСАМ5 или СЕАСАМ6 на поверхности клеток (рис. 6а и 6б) в соответствии с процедурой, описанной в примере 2. Стабильные пулы СЕАСАМ-5 сортировали с применением FACS Aria для исключения

экспрессоров с низким содержанием белка. Для клеточных линий CEACAM5 и CEACAM6 применяли изотипический контроль (Biolegend) анти-CEACAM-1,5,6, конъюгированного с PE (Biolegend, кат. № 342358, 1:50), и IgG2b мыши, конъюгированного с PE. Кривые связывания мАТ с клетками, сверхэкспрессирующими CEACAM5, показаны на **рис. 7а**, а с клетками, сверхэкспрессирующими CEACAM6, — на **рис. 7б**. Результаты показали, что некоторые антитела CEACAM1 обладали значительной перекрестной реактивностью и связывались с клетками, экспрессирующими CEACAM5 или CEACAM6, но другие антитела CEACAM1 практически не связывались с этими клетками (**таблица 4**).

10 Таблица 4. Значения EC50 для анти-CEACAM1 мАТ, связывающихся с клетками HEK293T, экспрессирующими CEACAM5 или CEACAM6, как определено с помощью проточной цитометрии.

Идент. № мАТ	CEACAM5 EC50, (нг/мл)	CEACAM6 EC50, (нг/мл)
ССМВ02.004	Сильный связующий агент, не титрировался	Нет связывания
ССМВ03.004	Сильный связующий агент, не титрировался	5,153
ССМВ04.004	Сильный связующий агент, не титрировался	10,91
ССМВ07.004	Сильный связующий агент, не титрировался	Нет связывания
ССМВ09.004	Сильный связующий агент, не титрировался	15,78
ССМВ18.004	Сильный связующий агент, не титрировался	11,82
ССМВ20.004	Сильный связующий агент, не титрировался	Нет связывания
ССМВ23.004	Нет связывания	Нет связывания
ССМВ35.004	Нет связывания	Нет связывания
ССМВ42.004	Сильный связующий агент, не титрировался	Нет связывания
ССМВ61.004	Нет связывания	Нет связывания
ССМВ66.004	Нет связывания	Нет связывания

Пример 4. Структурная характеристика анти-CEACAM мАТ.

15 [0164] Последовательности кДНК и трансляции аминокислот антител получали с использованием стандартных методик. После определения последовательности полипептидов некоторые кДНК антител, кодирующие переменные области или

полноразмерные антитела, были оптимизированы по кодонам с помощью стандартных способов экспрессии в увеличенном количестве.

[0165] В таблице 5 приведены аминокислотные последовательности CDR тяжелой цепи выбранных анти-СЕАСАМ антител.

- 5 [0166] В таблице 6 приведены аминокислотные последовательности CDR легких цепей выбранных анти-СЕАСАМ антител.

[0167] В таблице 7 приведены аминокислотные последовательности VH и VL выбранных анти-СЕАСАМ антител.

[0168] Таблица 5.

мАт	Последовательность HCDR1 (SEQ ID NO:)	Последовательность HCDR2 (SEQ ID NO:)	Последовательность HCDR3 (SEQ ID NO:)
мАт 1	NYAMN (7)	VISGSGSGTYYADSVKG (8)	PPPMVRGVIITIGNY (9)
мАт 2	SYGLS (13)	WINTNTGNPTYAQGFTG (14)	KGIWGPFDY (15)
мАт 3	NYGVN (19)	WINTNTGNPTYVQGFTG (20)	KGIWGPFDH (21)
мАт 4	NYAMN (25)	VISGSGSGTYYADSVKG (26)	PPPMVRGVIITIGNY (27)
мАт 5	SGGHYWS (31)	NIYYSGSTHYNPSLKS (32)	GRLWFGEPQDFQ H (33)
мАт 6	DYGMN (37)	WINTNTGNPTYAQGFTG (38)	KAIWGWFDY (39)
мАт 7	NYAMT (43)	SISGTSANTYYADAVKG (44)	PILTLFGELPLDY (45)
мАт 8	RTSYWYG (49)	TIYYSGSTYYNPSLKS (50)	QIAVGAHRFDY (51)

мАт 9	DYAMN (55)	SISGTGGSTYYADSLKG (56)	DIAVGVTAYFDH (57)
мАт 10	TYGMS (61)	TISGSGDNTYYADSVKG (62)	GGLLWFGELPYPFD Y (63)
мАт 11	SYAMN (67)	AISGSGGSTYYADSVKG (68)	DFAVGATTSEFDY (69)
мАт 12	SYWIG (73)	ИЙPGDSDTRYSPSFQG (74)	GYPAPTVNDLDY (75)

[0169] Таблица 6.

мАт	Последовательность LCDR1 (SEQ ID NO:)	Последовательность LCDR2 (SEQ ID NO:)	Последовательность LCDR3 (SEQ ID NO:)
мАт 1	RASQSVSVNLA (10)	GASTRAT (11)	QQYNNWPFT (12)
мАт 2	KSSQNVLYSSNNKNYL A (16)	WASTRES (17)	QQYFSSPWT (18)
мАт 3	KSSQSVLYSSNNRLLYL A (22)	WASTRES (23)	QQYYNPWT (24)
мАт 4	RASQSVSVNLA (28)	GASTRAT (29)	QQYNNWPFT (30)

mAt 5	KSSQSVLYSSNNKNYL T (34)	WASTRES (35)	QQYYSTPT (36)
mAt 6	KPSQSVLYRSNNKNYL A (40)	WASTRES (41)	QQYYSTPCS (42)
mAt 7	RASQSVSSNLA (46)	GASTRAT (47)	QQYNNWPLT (48)
mAt 8	RASQGISSYLA (52)	AASTLQS (53)	QQLNSYPWT (54)
mAt 9	QGDSLRTYSAS (58)	GKNNRPS (59)	NSRDSRGNLLVV (60)
mAt 10	TGTSSDVGGYNYVS (64)	DVSNRPS (65)	SSYISTSTLYV (66)
mAt 11	QGDSLRSYYVS (70)	GKNNRPS (71)	NSRDSSNHLVV (72)
mAt 12	RASQSISSYLN (76)	AASSLQS (77)	QQSYSTPLT (78)

[0170] Таблица 7.

мАт	Последовательность VH (SEQ ID NO:)	Последовательность VL (SEQ ID NO:)
CCMB02.004	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFINYAMNWVRLTPG KGLEWVSVISGSGSGTTYADS VKGRFTVSRDNSKNTLYLQMN SLRVEDTAIYYCASPPMVRG VIITIGNYWGQGALVTVSS (79)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLS CRASQSVSVNLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATGIPARFSGS GSGTEFTLTISLQSEDFAVYY CQQYNNWPFTFGPGTKVDIK (80)
CCMB03.004	QVQLVQSGSEL RTPGASVKVS CKASGYTFTSYGLSWVRQAPG QGLEWMGWINTNTGNPTYAQ GFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISS LKAEDTAVYYCARKGIWGPFD YWGQGTLVTVSS (81)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN CKSSQNVLYSSNNKNYLAWY QQKPGQPPKLLIYWASTRESG VPDRFSGSGSGTDFTLTISCLQ AEDVAVYYCQQYFSSPWTFGQ GTKVEIK (82)
CCMB04.004	QVQLVQSGSELKKPGASVKVS CKASGYTFTNYGVNWVRQAP GQGLEWMGWINTNTGNPTYV QGFTGRFVFSLDTSVTAYLHI SSLKAEDTAVYFCARKGIWGP FDHWGQGTLVTVSS (83)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN CKSSQSVLYSSNNRLYLAWYQ QRPGQPPKLLIYWASTRESGVP DRFSGSGSGTDFTLTISLQAE DVAVYYCQQYYSNPWTFGGG TKVEIK (84)

CCMB07.004	<p>EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFTNYAMNWVRLAP GKGLEWVSVISGSGSGTYAD SVKGRFTVSRDNSKNTLYLQM NSLRVEDTAIYYCASPPMVR GVIITIGNYWQ GALVTVSS</p> <p>(85)</p>	<p>EIVMTQSPATLSVSPGERATLS CRASQSVSVNLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATSIPTRFSGS GSGTEFTLTISLQSEDFAVYY CQQYNNWPFTFGPGTKVEIK</p> <p>(86)</p>
CCMB09.004	<p>QVQLQESG PGLVKPSQTLSLTC TVTGD SIRSGGHYWSWIRQHP GKGLEWIGNIYYSGSTHYNPSL KSRLTISVDTSKNQFSLKVSSV TAADTAVYYCARGRLWFGE PQDFQHWGQGLVTVSS</p> <p>(87)</p>	<p>DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN CKSSQSVLYSSNNKNYLTWYQ QKPGQPPKLLIYWASTRESGVP DRFSGSGSGTDFTLTISLQAE DVAVYYCQQYYSTPTFGQGTK LEIK</p> <p>(88)</p>
CCMB18.004	<p>QVQLVQSGSELKKPGASVKVS CKASGYTLTDYGMNWVRQAP GQGLQWMGWINTNTGNPTYA QGFTGRFVFLDTSVSTAYLQI SSLKTEDTAVYYCARKAIWG WFDPWGQGLVTVSS</p> <p>(89)</p>	<p>DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN CKPSQSVLYRSNNKNYLAWY QKPGQPPKLLIHWASTRESG VPDRFSGSGSGTDFTLTISLQA EDVAVYYCQQYYSTPCSFGQG TKLEIK</p> <p>(90)</p>
CCMB20.004	<p>EVQLLES GGGLVQPGESLRLSC AASGFTFN NYAMTWVRQAPG KGLDWVSSISGTSANTYYADA VKGRFTISRDNM TTYLQMN SLRAEDTAVYYCAKPILTFGE LPLDYWGQGLVTVSS</p> <p>(91)</p>	<p>EIVMTQSPATLSVSPGERATLS CRASQSVSSNLAWYQQKTGQ APRLLIYGASTRATAFPARFSG SGSGTEFTLTISLQSEDFAVYY CQQYNNWPLTFGGGTKVEIK</p> <p>(92)</p>

CCMB23.004	<p>QLQLQESGPGLVKVPSETLSLTC TVSADSISRYSYYWGWIRQPPG KGLEWIGTIYYSGSTYYNPSLK SRVTISVDTSRNHFSLTLNSVT AADTAVYYCARQIAVGAHRF DYWGQGTGLVTVSS</p> <p>(93)</p>	<p>DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITC RASQGISSYLAWYQQKPGKAP KLLIYAASLTLQSGVPSRFSGSG SGTEFTLTISLQPEDFATYYCQ QLNSYPWTFGQGTKVEIK</p> <p>(94)</p>
CCMB35.004	<p>EVQLLES GGGLVQPGESLRLSC AASGLTFSDYAMNWVRQAPG KGLYWVSSISGTGGSTYYADS LKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKDIAVGVT AYFDHWGQGTGLVTVSS</p> <p>(95)</p>	<p>SSELTQDPAVSVALGQTVRITC QGDSLRTYSASWYQQKPGQAP VLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSS GNTASLTITGAQAEDAADYYC NSRDSRGNLLVVFGGGTKLTV L</p> <p>(96)</p>
CCMB42.004	<p>EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFNTYGMSWARQAP GKGLEWVSTISGSGDNTYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQIN SLRAEDTAVYYCAKGGLLWF GELPYPFDYWGQGTGLVTVSS</p> <p>(97)</p>	<p>QSALTQPASVSGSPGQSITISCT GTSSDVGGYNYVSWYQQHPG KAPKLMYDVSNRPSGVSNRFS GSKSDNTASLTISGLQAEDAAD YYCSSYISTSTLYVFGIGTKVT VL</p> <p>(98)</p>
CCMB61.004	<p>EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMNWVRQAP GKGLEWVSAISGSGGSTYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAKDFAVG ATTSFDYWGQGSGLVTVSS</p> <p>(99)</p>	<p>SSELTQDPAVSVALGQTVRITC QGDSLRSYYVSWYQQKPGQA PTLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSS SGNTPSLTITGAQAEDAADYYC NSRDSSNHLVVFGGRTKLTVL</p> <p>(100)</p>

CCMB66.004	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISC KSGSYSFTSYWIGWVRQMPG KGLEWMGIIYPGDS DTRYSPSF QGQVTISADKSISTAYLQWSSL KASDTAMY YCARGYPAPTVN DLDYWGQGTLVTVSS (101)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIT CRASQSISSYLNWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQSYSTPLTFGQGTKVEIK (102)
------------	--	---

Пример 5. Модуляция активации Т-клеток и эффекторной функции с помощью анти-СЕАСАМ мАт.

[0171] Анти-СЕАСАМ антитела оценивали на их способность модулировать активацию Т-клеток и эффекторную функцию. Это было сделано путем активации нормальных донорских Т-клеток антителом, специфичным к CD3 (ОКТ3, Janssen, сконструированным на остове IgG1), в присутствии или отсутствии связывающих СЕАСАМ антител. Активность Т-клеток оценивали по дифференцировке, пролиферации и секреции цитокинов. Репрезентативные образцы, которые показывают переменную модуляцию параметров активации Т-клеток, показаны в качестве примеров ниже.

[0172] **Стимуляция мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC).** PBMC оттаивали или выделяли из свежей крови / лейкоцитарной массы (NemaCare, Northridge, CA) и промывали средой RPMI 1640 (Thermo), дополненной GlutaMAX™ и 10 % FBS (Thermo). Пролиферацию PBMC оценивали с помощью набора CellTrace™ Violet Cell Proliferation Kit (Thermo). PBMC подсчитывали и ресуспендировали в концентрации 2×10^6 /мл. В 96-луночный круглодонный планшет добавляли 50 мкл, содержащих либо разведение анти-СЕАСАМ антитела в среде, либо только среду. 50 мкл, содержащие анти-CD3 или среду, добавляли в 96-луночный круглодонный планшет. Клетки высевали по 100 мкл или 2×10^5 клеток на лунку. Планшеты инкубировали в течение 3 дней при 37 °C.

[0173] **Окрашивание и цитометрический анализ.** После инкубации планшет отцентрифугировали, а 100 мкл супернатанта собирали для анализа цитокинов. Клеточный осадок ресуспендировали в 50 мкл буфера BD FACS (BD Biosciences),

содержащего блок Fc и краситель Live/Dead (Life Technologies #L34957). Планшет инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре и промывали 150 мкл буфера BD FACS. Осадок клеток ресуспендировали в 50 мкл буфера BD FACS, содержащего коктейль антител, включая анти-PD-1 антитела, конъюгированные с Brilliant Violet (BV) 605™ (Biolegend #329923), анти-CD25 антитела, конъюгированные с BV650 (BD #563719), анти-CD4 антитела, конъюгированные с BV7119 (Biolegend #317440), анти-CD8 антитела, конъюгированные с BV785 (Biolegend #301045), и анти-CEACAM1, конъюгированные с аллофикоцианином (APC, Biolegend #305312) в течение 30 мин. Клетки промывали 150 мкл буфера BD FACS и пермеабилizировали в 50 мкл буфера eBioscience FoxP3 в течение 20 мин. Клетки промывали в 150 мкл перманентного/промывочного буфера eBioscience FoxP3, затем ресуспендировали в перманентном/промывочном буфере eBioscience FoxP3, содержащем антитела для проточной цитометрии, в соответствии с панелью Flow Panel в течение 30 мин. Клетки промывали в 150 мкл перманентного/промывочного буфера eBioscience FoxP3, затем фиксировали в 150 мкл BD Cytofix и анализировали на проточном цитометре BD Fortessa. Цитокины анализировали с использованием набора для культивирования тканей человека Meso Scale Devices Human Th1/Th2 (MSD, K15010B). Вкратце, супернатант из культур Т-клеток инкубировали на предварительно покрытых и заблокированных 96-луночных планшетах в течение 1 часа, детектировали смесью MSD Detection Antibody Blend в течение 1 часа с последующей промывкой и добавлением буфера считывания. Затем планшеты считывали на планшете-ридере MSD Sector. Значения флуоресценции использовали для расчета концентраций цитокинов с использованием стандартной кривой из того же планшета.

[0174] Результаты показали, что антитела, связывающие CEACAM, модулируют все три типа активации Т-клеток. Во-первых, экспрессия поверхностного маркера индуцировалась на Т-клетках в ответ на воздействие антител CEACAM1 в сочетании с анти-CD3 антителом (**рис. 8**). Экспрессию PD-1 на поверхности Т-клеток применяли в качестве маркера активации Т-клеток (**рис. 8**). Как CD4, так и CD8 Т-клетки имели повышенные уровни PD-1 в присутствии антител, связывающих CEACAM, до двух раз по сравнению с одним лишь CD3 ($p < 0,0001$, ANOVA). Во-вторых, анализ пролиферации Т-клеток продемонстрировал увеличение количества делящихся клеток за счет разбавления фиолетового лазерного возбудимого красителя (CTV) ($p < 0,0001$, ANOVA) (**рис. 9**). Наконец, лигирование CEACAM на Т-клетках в присутствии

стимуляции CD3 увеличивало продукцию цитокинов IFN γ (**рис. 10a**, $p = 0,0105$, ANOVA) и TNF α (**рис. 10b**, $p = 0,0146$, ANOVA).

Пример 6. Модуляция ответов Т-клеток на опухоли в мышинных моделях с помощью анти-СЕАСАМ1 антител.

5 [0175] Анти-СЕАСАМ антитела также можно применять для демонстрации эффективности на моделях гуманизированных мышей. Блокирование взаимодействия СЕАСАМ с Т-клетками улучшает активацию и функцию Т-клеток и, следовательно, может играть роль в ингибировании роста или регрессии опухолей на моделях

10 гуманизированных мышей. Введение анти-СЕАСАМ антител одновременно, до или после приживления Т-клеток мышам с опухолями либо из гематологических злокачественных новообразований, таких как лейкозы, лимфомы или миелома, либо из солидных опухолей, таких как меланома, рак предстательной железы или клеточных

15 линий немелкоклеточного рака легкого, может увеличить способность этих Т-клеток контролировать рост опухоли.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное анти-СЕАСАМ антитело (к связанной с раково-эмбриональным антигеном молекуле клеточной адгезии) или его антигенсвязывающий фрагмент,
5 содержащий HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с последовательностями SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11 и 12, соответственно.

2. Выделенное анти-СЕАСАМ антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1,
содержащий вариабельную область тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID
10 NO: 79 и вариабельную область легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO:
80.

3. Выделенное анти-СЕАСАМ антитело или его антигенсвязывающий фрагмент,
содержащий HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с
15 последовательностями SEQ ID NO: 13, 14, 15, 16, 17 и 18, соответственно.

4. Выделенное анти-СЕАСАМ антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 3,
содержащий VH с последовательностью SEQ ID NO: 81 и VL с последовательностью
SEQ ID NO: 82.
20

5. Выделенное анти-СЕАСАМ антитело или его антигенсвязывающий фрагмент,
содержащий HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с
последовательностями SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22, 23 и 24, соответственно.

- 25 6. Выделенное анти-СЕАСАМ антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 5,
содержащий VH с последовательностью SEQ ID NO: 83 и VL с последовательностью
SEQ ID NO: 84.

7. Выделенное анти-CEACAM антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с последовательностями SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28, 29 и 30, соответственно.
- 5 8. Выделенное анти-CEACAM антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 7, содержащий VH с последовательностью SEQ ID NO: 85 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 86.
9. Выделенное анти-CEACAM антитело или его антигенсвязывающий фрагмент,
10 содержащий HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с последовательностями SEQ ID NO: 31, 32, 33, 34, 35 и 36, соответственно.
10. Выделенное анти-CEACAM антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 9, содержащий VH с последовательностью SEQ ID NO: 87 и VL с
15 последовательностью SEQ ID NO: 88.
11. Выделенное анти-CEACAM антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с последовательностями SEQ ID NO: 37, 38, 39, 40, 41 и 42, соответственно.
20
12. Выделенное анти-CEACAM антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 11, содержащий VH с последовательностью SEQ ID NO: 89 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 90.
- 25 13. Выделенное анти-CEACAM антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с последовательностями SEQ ID NO: 43, 44, 45, 46, 47 и 48, соответственно.

14. Выделенное анти-CEACAM антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 13, содержащий VH с последовательностью SEQ ID NO: 91 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 92.
- 5 15. Выделенное анти-CEACAM антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с последовательностями SEQ ID NO: 49, 50, 51, 52, 53 и 54, соответственно.
- 10 16. Выделенное анти-CEACAM антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 15, содержащий VH с последовательностью SEQ ID NO: 93 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 94.
- 15 17. Выделенное анти-CEACAM антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с последовательностями SEQ ID NO: 55, 56, 57, 58, 59 и 60, соответственно.
18. Выделенное анти-CEACAM антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 17, содержащий VH с последовательностью SEQ ID NO: 95 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 96.
- 20 19. Выделенное анти-CEACAM антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с последовательностями SEQ ID NO: 61, 62, 63, 64, 65 и 66, соответственно.
- 25 20. Выделенное анти-CEACAM антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 19, содержащий VH с последовательностью SEQ ID NO: 97 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 98.

21. Выделенное анти-CEACAM антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с последовательностями SEQ ID NO: 67, 68, 69, 70, 71 и 72, соответственно.
- 5 22. Выделенное анти-CEACAM антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 21, содержащий VH с последовательностью SEQ ID NO: 99 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 100.
- 10 23. Выделенное анти-CEACAM антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с последовательностями SEQ ID NO: 73, 74, 75, 76, 77 и 78, соответственно.
- 15 24. Выделенное анти-CEACAM антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 23, содержащий VH с последовательностью SEQ ID NO: 101 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 102.
- 20 25. Выделенное анти-CEACAM антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурируют за связывание с CEACAM1 и, необязательно, CEACAM5 или CEACAM6, с эталонным антителом, содержащим
- а) переменную область тяжелой цепи (VH) с последовательностью SEQ ID NO: 79 и переменную область легкой цепи (VL) с последовательностью SEQ ID NO: 80; или
- б) VH с последовательностью SEQ ID NO: 81 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 82;
- 25 в) VH с последовательностью SEQ ID NO: 83 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 84;
- д) VH с последовательностью SEQ ID NO: 85 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 86;
- 30 е) VH с последовательностью SEQ ID NO: 87 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 88;

- f) VH с последовательностью SEQ ID NO: 89 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 90;
- g) VH с последовательностью SEQ ID NO: 91 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 92;
- 5 h) VH с последовательностью SEQ ID NO: 93 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 94;
- i) VH с последовательностью SEQ ID NO: 95 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 96;
- j) VH с последовательностью SEQ ID NO: 97 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 10 98;
- k) VH с последовательностью SEQ ID NO: 99 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 100; или
- l) VH с последовательностью SEQ ID NO: 101 и VL с последовательностью SEQ ID NO: 102.

15

26. Выделенное анти-СЕАСАМ антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–25, причем антитело представляет собой изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

20 27. Выделенное анти-СЕАСАМ антитело по любому из пп. 1–26, причем антитело представляет собой мультиспецифическое антитело.

28. Выделенное анти-СЕАСАМ антитело по любому из пп. 1–27, причем антитело представляет собой биспецифическое антитело.

25

29. Фармацевтическая композиция, содержащая анти-СЕАСАМ антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–28 и фармацевтически приемлемый носитель.

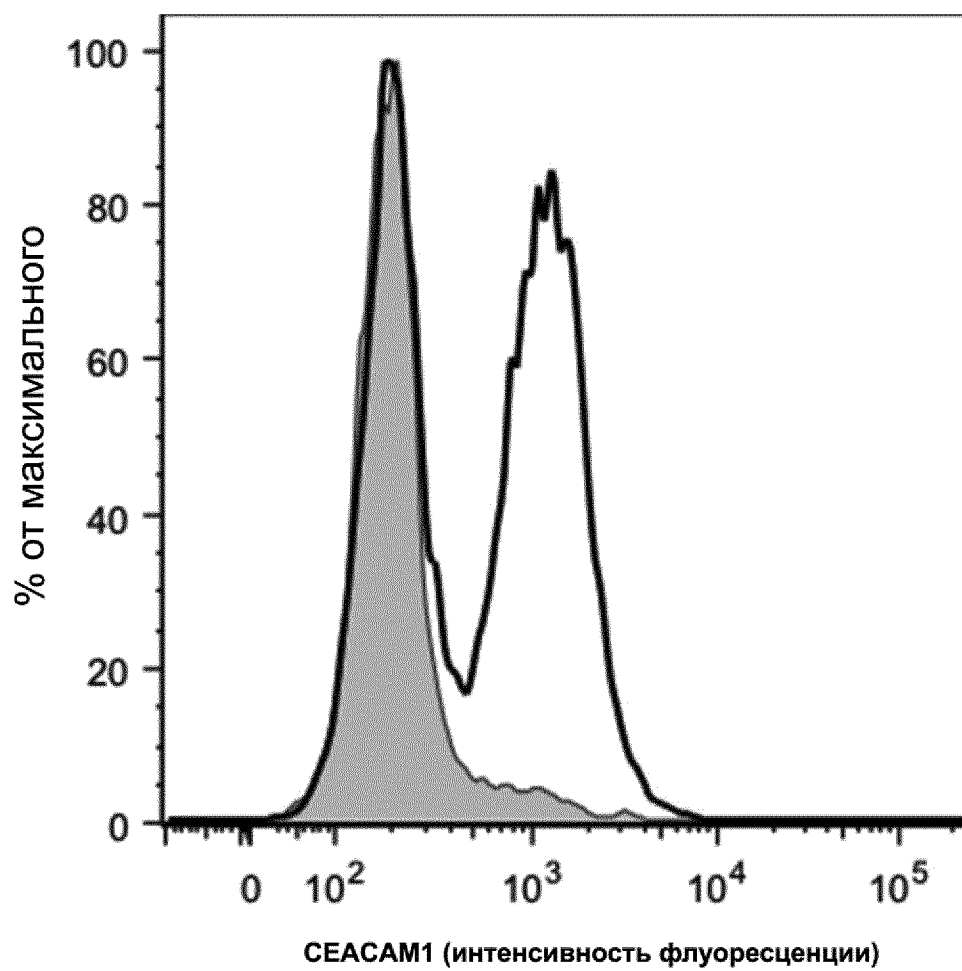
30. Выделенное анти-СЕАСАМ антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–29, конъюгированное с одной или более гетерологичными молекулами.
- 5 31. Выделенный полинуклеотид, кодирующий анти-СЕАСАМ антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–28.
32. Выделенный полинуклеотид, кодирующий анти-СЕАСАМ антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и содержащий полинуклеотидную последовательность,
10 кодирующую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 79–102.
33. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 32.
- 15 34. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п. 33.
35. Способ получения анти-СЕАСАМ антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1–28, включающий в себя культивирование клетки-хозяина по п. 34 в условиях, в которых антитело экспрессируется, и выделение
20 антитела, продуцируемого клеткой-хозяином.
36. Способ лечения СЕАСАМ-положительного рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий в себя введение терапевтически эффективного количества выделенного анти-СЕАСАМ антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1–
25 28, или фармацевтической композиции по п. 34 субъекту для лечения СЕАСАМ-положительного рака.
37. Способ по п. 36, в котором анти-СЕАСАМ антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в комбинации со вторым терапевтическим агентом.

38. Способ по п. 37, в котором второй терапевтический агент представляет собой хирургическое вмешательство, химиотерапию, терапию по депривации андрогенов или облучение или любую их комбинацию.

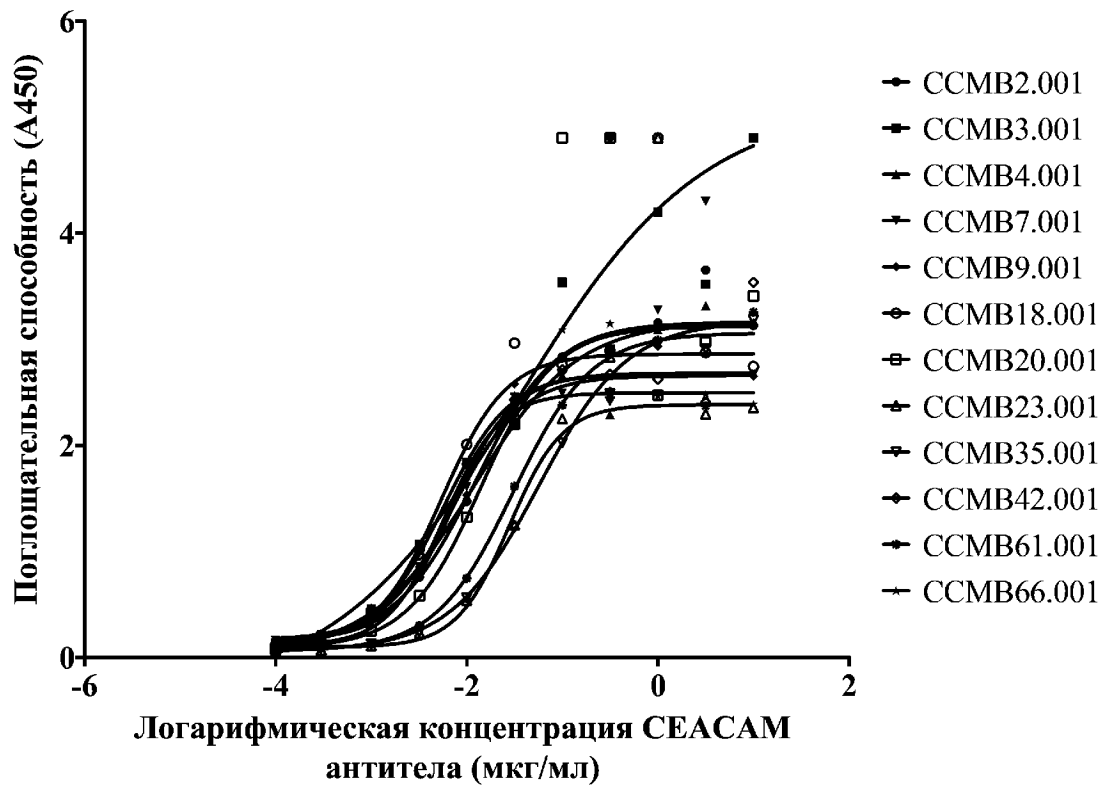
5

39. Набор, содержащий антитело по любому из пп. 1–28.

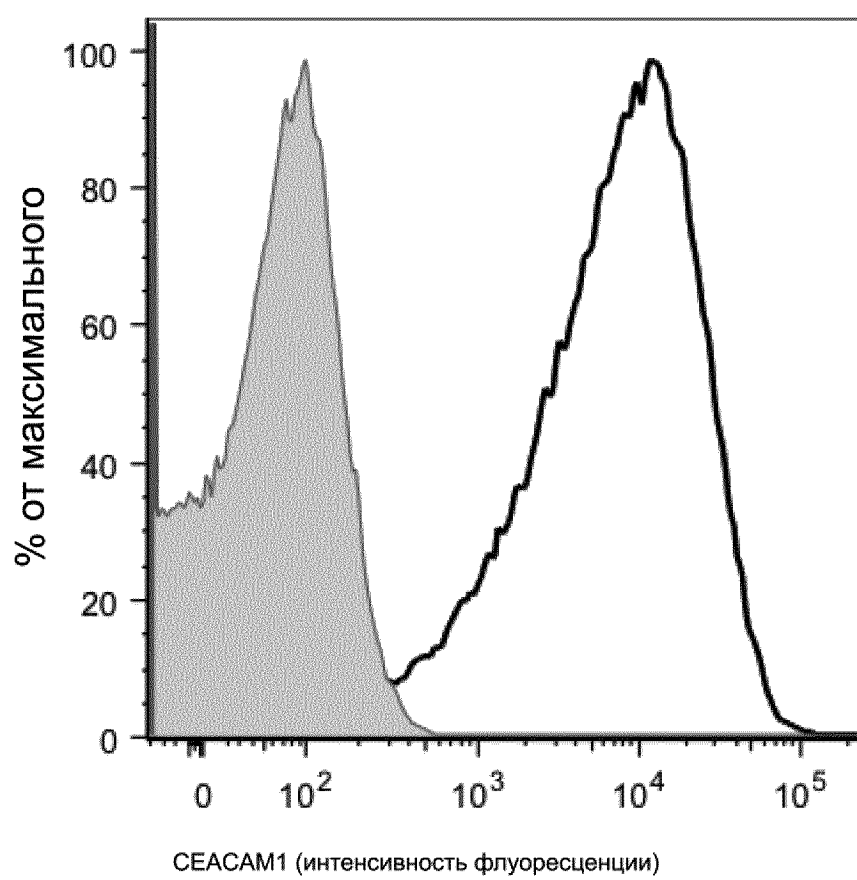
Фиг. 1



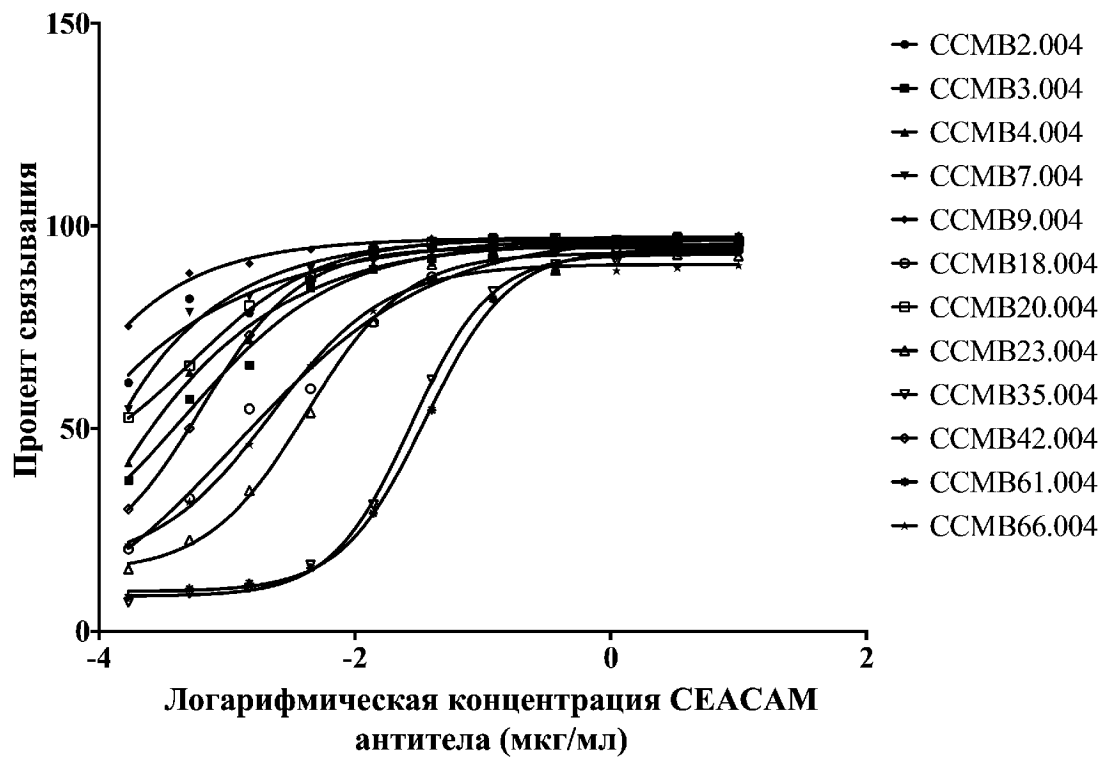
Фиг. 2



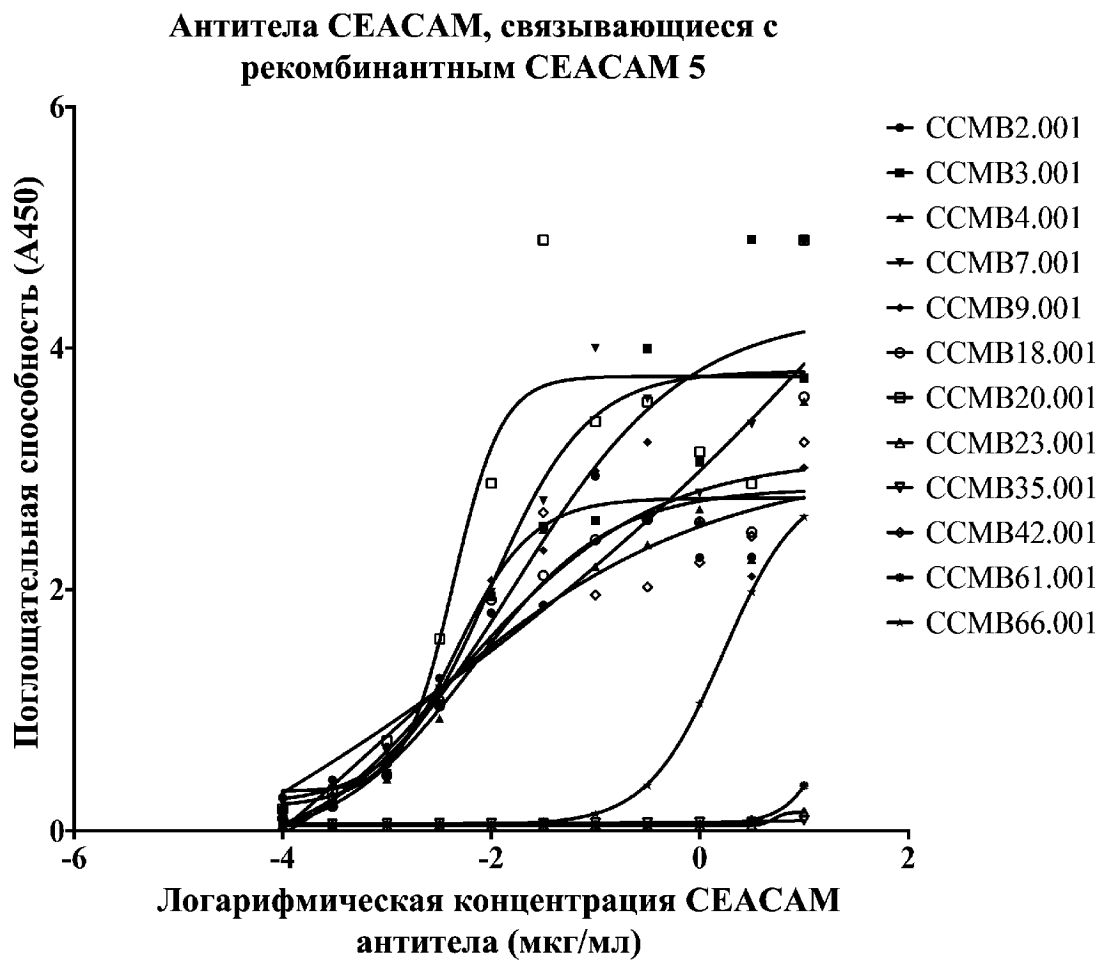
Фиг. 3



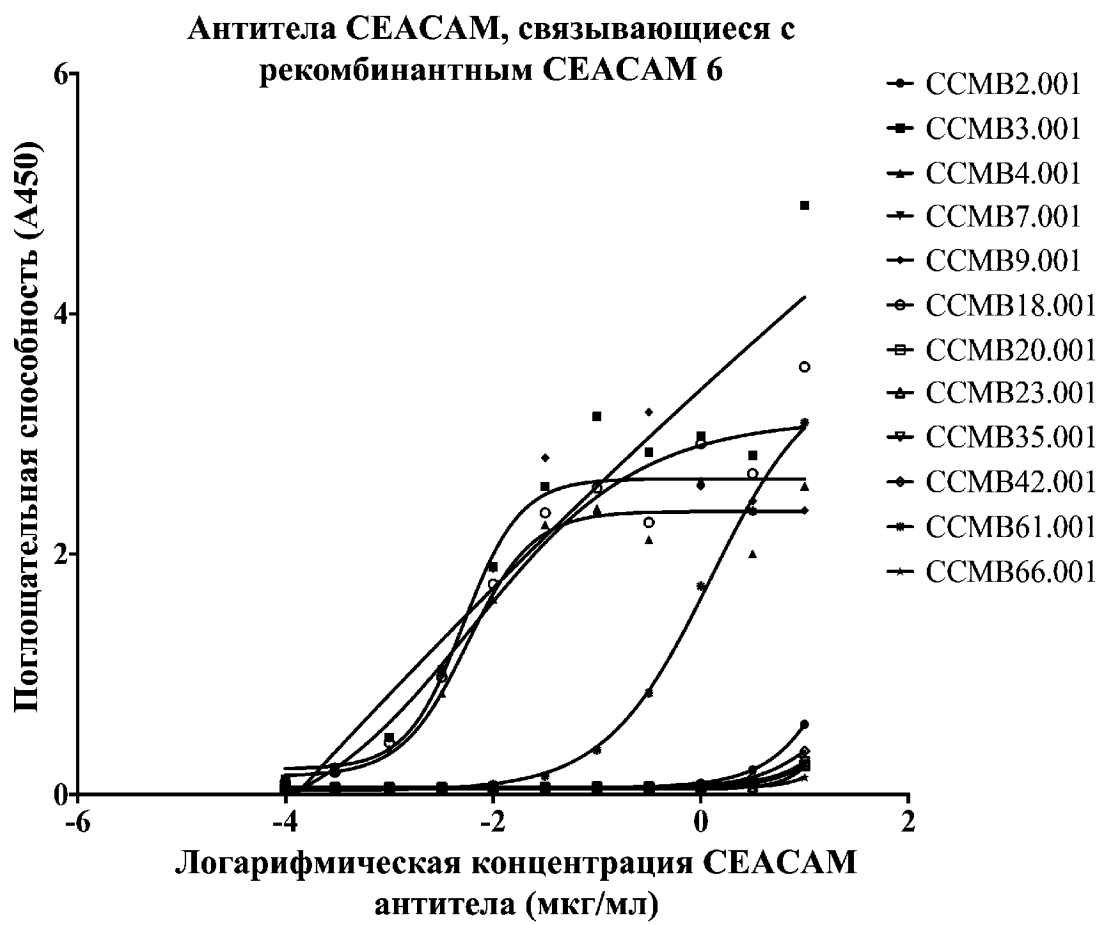
Фиг. 4



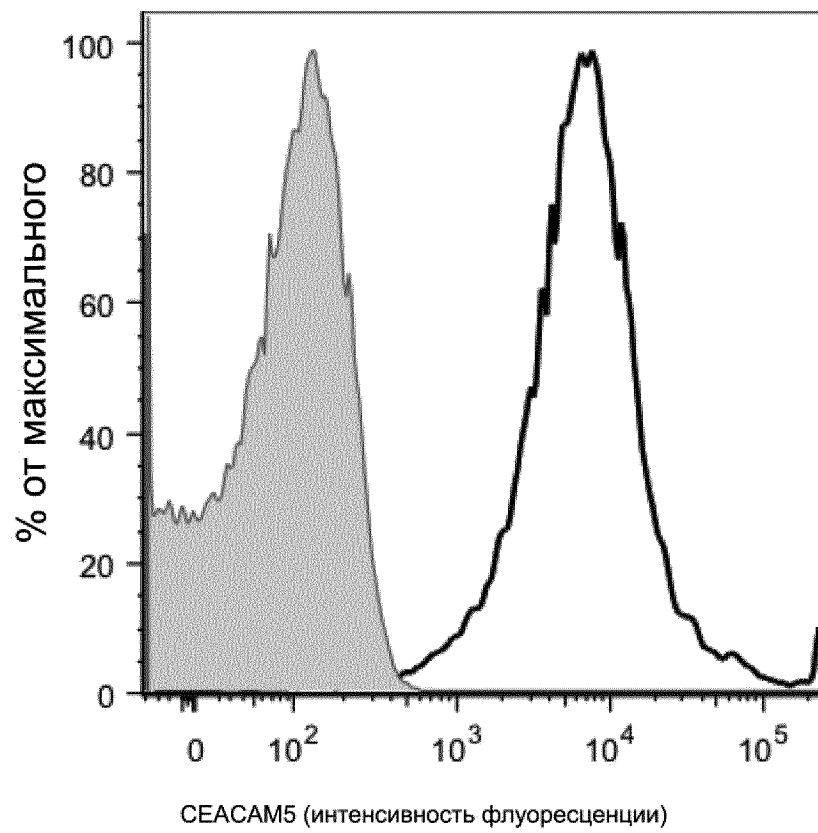
Фиг. 5а



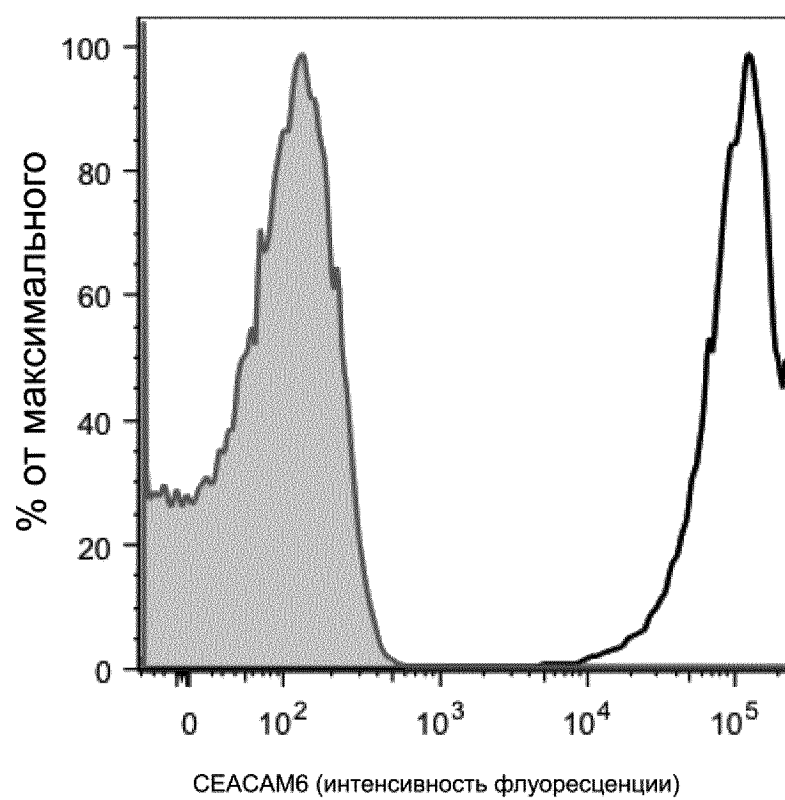
Фиг. 5b



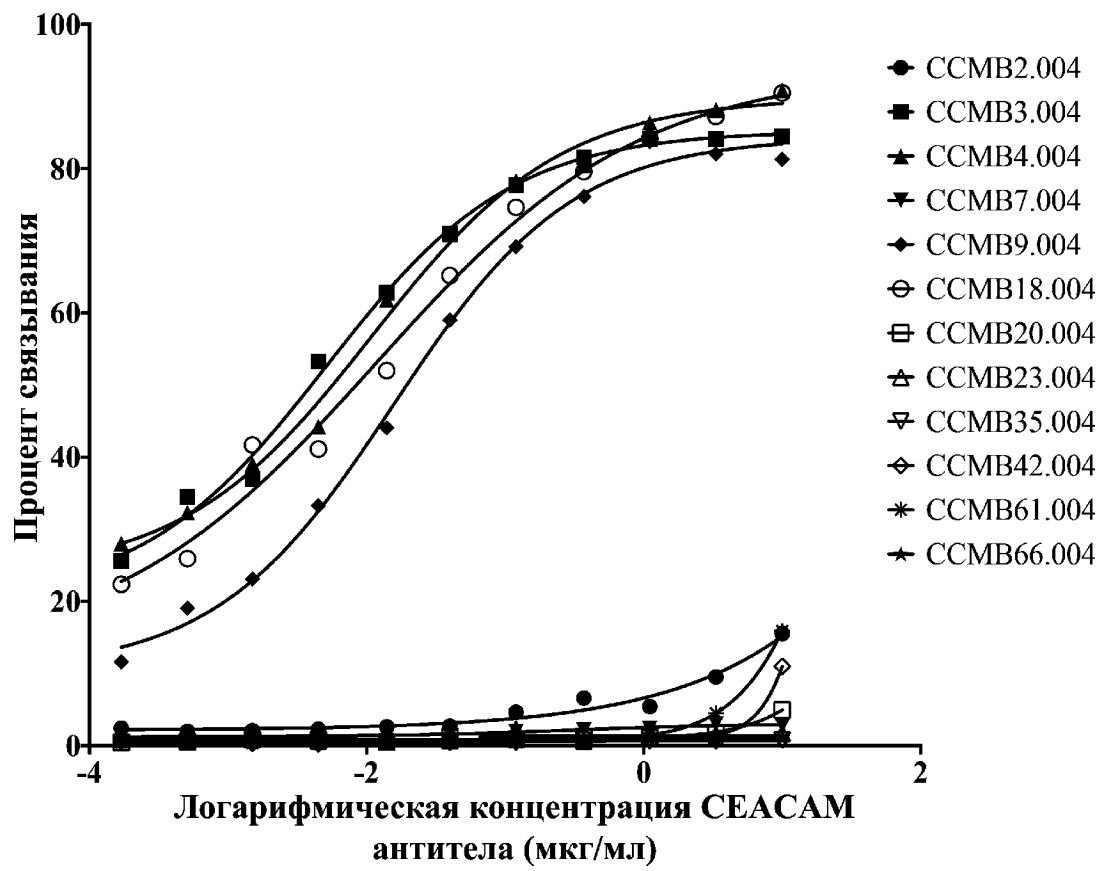
Фиг. 6а



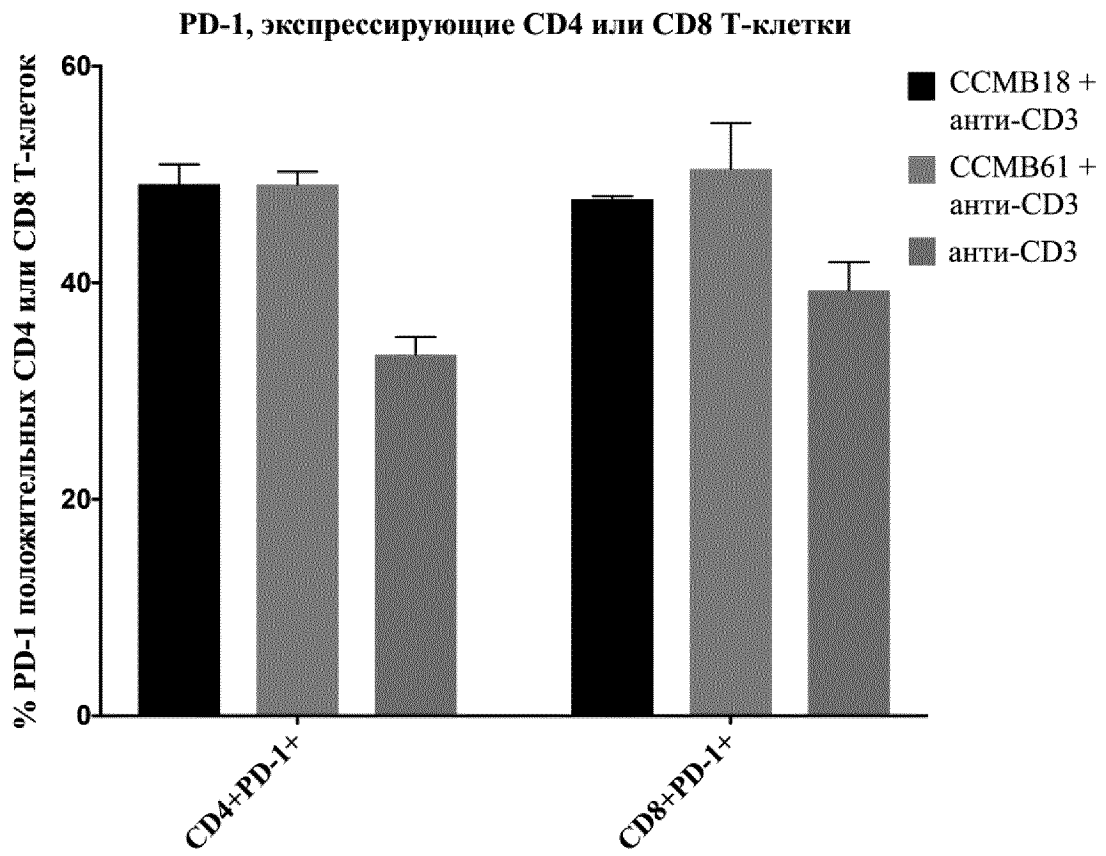
Фиг. 6b



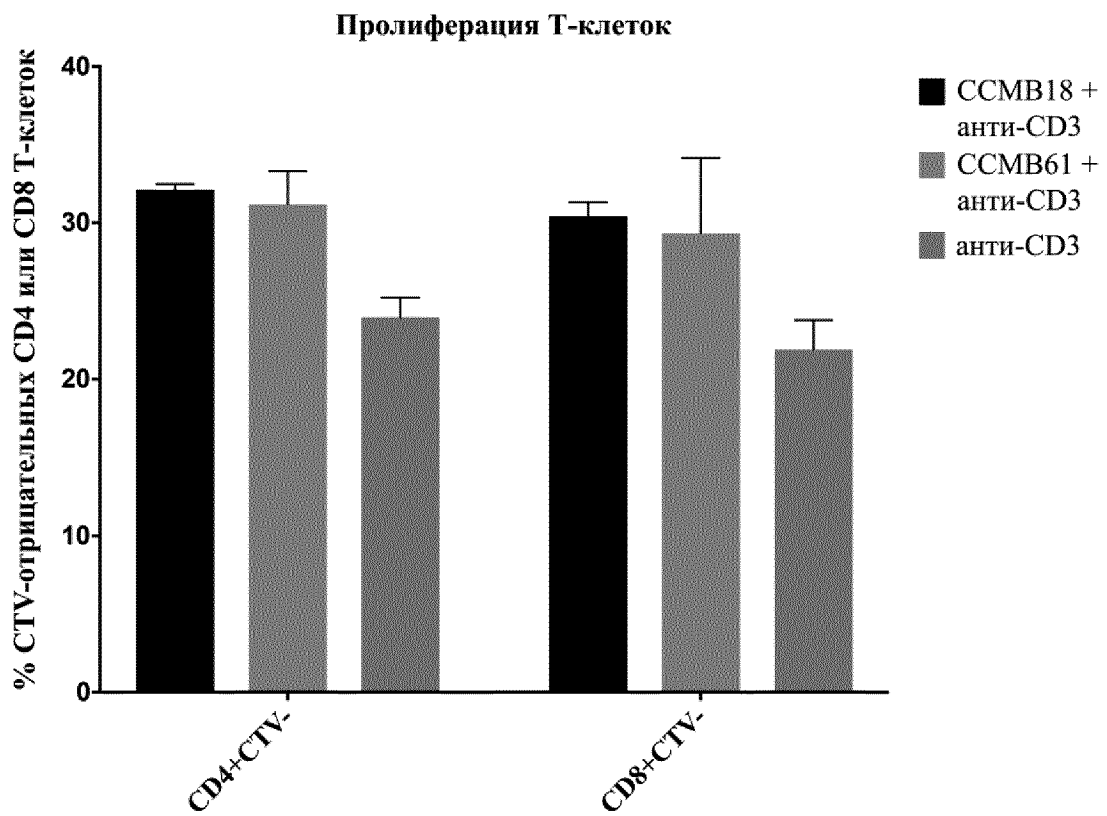
Фиг. 7b



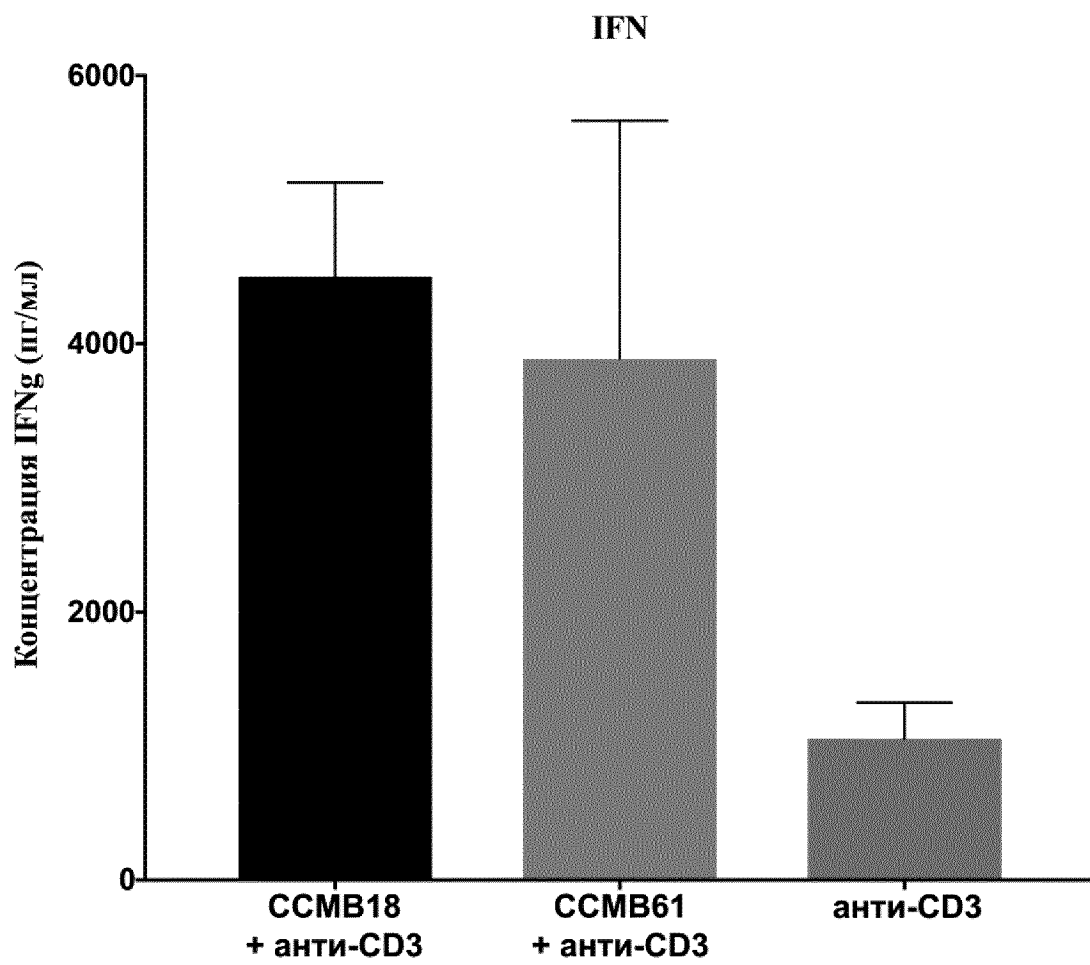
Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10а



Фиг. 10b

