



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **129521** (13) **C2**
(51) МПК (2025.01)**C07K 16/18** (2006.01)**A61K 47/68** (2017.01)**A61K 47/65** (2017.01)**A61K 47/54** (2017.01)**A61K 38/07** (2006.01)

A61P 35/00

A61P 37/02 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

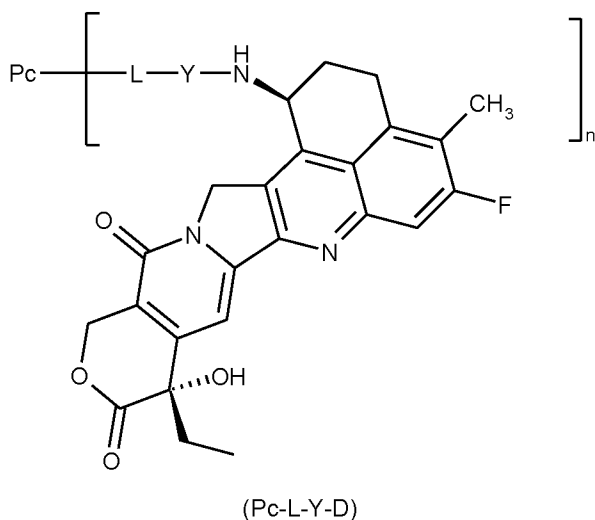
(21) Номер заявки: **а 2022 02371**
(22) Дата подання заявки: **15.12.2020**
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: **22.05.2025**
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **201911294912.3**
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **16.12.2019**
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **CN**
(41) Публікація відомостей про заявку: **25.08.2022, Бюл.№ 34**
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: **21.05.2025, Бюл.№ 21**
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/CN2020/136396, 15.12.2020**
(72) Винахідник(и):
Йінг Гуа (CN),
Мао Лангьон (CN),
Ванг Сіджіа (CN)

(73) Володілець (володільці):
ДЖЯНГСУ ХЕНГРУЙ МЕДІСІН КО., ЛТД.,
No.7 Kunlunshan Road, Economic and Technological Development Zone, Lianyungang, Jiangsu 222047, China (CN),
ШАНХАЙ ХЕНГРУЙ ФАРМАСЬЮТИКАЛ КО., ЛТД.,
No. 279 Wenjing Road, Minhang District, Shanghai 200245, China (CN)
(74) Представник:
Пахаренко Олександр Володимирович,
реєстр. №136
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
SHINMI D. et al. Novel anticarcinoembryonic antigen antibody-drug conjugate has antitumor activity in the existence of soluble antigen. Cancer Medicine. 01.04.2017. Vol. 6. No. 4. P. 798-808, DOI: 10.1002/cam4.1003
US 2018/280532 A1, 04.10.2018
US 2015/125386 A1, 07.05.2015
KNUTSON S. et al. Development and Evaluation of a Fluorescent Antibody-Drug Conjugate for Molecular Imaging and Targeted Therapy of Pancreatic Cancer. PLoS ONE. 23.06.2016. Vol. 11. No. 6. P. E0157762, DOI: 10.1371/journal.pone.0157762
WO 2015069430 A2, 14.05.2015
WO 2018177369 A1, 04.10.2018
CN 101658672 A, 03.03.2010
CN 105592859 A, 18.05.2016
WO 2013000269 A1, 03.01.2013
CN 104755494 A, 01.07.2015
CN 104837508 A, 12.08.2015
CN 105407891 A, 16.03.2016
NAKADA, T. et al. Novel Antibody Drug Conjugates Containing Exatecan Derivative-based Cytotoxic Payloads. Bioorganic and medicinal chemistry letters. 08.02.2016. Vol. 26. P. 1542-1545

UA 129521 C2

(54) АНАЛОГ КОН'ЮГАТА АНТИ-СЕА АНТИТІЛО-ЕКСАТЕКАН ТА ЙОГО ФАРМАЦЕВТИЧНЕ ЗАСТОСУВАННЯ**(57) Реферат:**

Винахід стосується кон'югата антитіло-лікарського засобу, що містить: анти-СЕА-антитіло, або його антигензв'язуючий фрагмент, кон'юговане з токсинним лікарським засобом за допомогою лінкера, де анти-СЕА-антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент містить варіабельну ділянку важкого ланцюга та варіабельну ділянку легкого ланцюга антитіла, при цьому кон'югат антитіло-лікарський засіб являє собою кон'югат антитіло-лікарський засіб загальної формули (Pc-L-Y-D):



в якій:

Y є -O-(CR^aR^b)_m-CR¹R²-C(O)-;

R^a та R^b є однаковими або різними та кожний є незалежно вибраним з групи, що складається з водню, дейтерію, галогену та C₁₋₆алкілу;

R¹ являє собою C₁₋₆галогеналкіл або C₃₋₆циклоалкіл;

R² є вибраним з групи, що складається з водню, C₁₋₆галогеналкілу та C₃₋₆циклоалкілу; або

R¹ та R², разом з атомами вуглецю, що до нього приєднані, утворюють C₃₋₆циклоалкіл;

m являє собою 0 або 1;

n є десятковим або цілим числом від 1 до 10;

L є лінкерною одиницею;

Pc являє собою анти-СЕА-антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга та варіабельну ділянку легкого ланцюга, де:

варіабельна ділянка важкого ланцюга включає HCDR1, HCDR2 та HCDR3, представлені у SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 та SEQ ID NO: 23, відповідно, та варіабельна ділянка легкого ланцюга включає LCDR1, LCDR2 та LCDR3, представлені у SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 та SEQ ID NO: 26, відповідно; або

варіабельна ділянка важкого ланцюга включає HCDR1, HCDR2 та HCDR3, представлені у SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 47 та SEQ ID NO: 23, відповідно, та варіабельна ділянка легкого ланцюга включає LCDR1, LCDR2 та LCDR3, представлені у SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 та SEQ ID NO: 26, відповідно.

Представлена заявка заявляє пріоритет китайської заявки на патент (заявка на патент № CN201911294912.3) поданої 16 грудня 2019 року.

ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ

Представлений винахід стосується аналогу кон'югату анти-СЕА антитіло-ексцисан, способу його отримання, фармацевтичних композицій, що його містять, та його застосування для отримання лікарського засобу для лікування захворювання або стану, опосередкованого СЕА, особливо його застосування в отриманні протипухлинного лікарського засобу.

ПЕРЕДУМОВИ СТВОРЕННЯ ВИНАХОДУ

Наведені в даному документі твердження лише надають довідкову інформацію, що стосується представленого розкриття, та не обов'язково є попереднім рівнем техніки. Карциноембріональний антиген (СЕА, також відомий як CEACAM-5 або CD66e), глікопротеїн з молекулярною масою приблизно 180 кДа, є одним з перших виявлених опухолеасоційованих антигенів. СЕА є членом суперродини імуноглобулінів та містить 7 доменів, прикріплених до клітинної мембрани через глікозилфосфатидилінозитоловий (GPI) якір (Thompson J.A., J Clin Lab Anal. 5:344-366, 1991). Спочатку СЕА був виявлений в екстрактах тканин раку товстої кишки та описаний Gold P та Freedman SO (Gold and Freedman 1965; Gold and Freedman, 1965), та згодом повідомлялося, що СЕА виявлений у сироватці пацієнтів з раком товстої кишки та іншими пухлинами із використанням чутливих способів радіоімунаналізу, тоді як вміст СЕА у сироватці здорової людини або пацієнтів з іншими захворюваннями є вкрай низьким (Thomson, Krupey et al., 1969). Експресія СЕА збільшується в ракових клітинах, та підвищений рівень СЕА сприяє міжклітинній адгезії та подальшому метастазуванню клітин (Marshall J., Semin Oncol., 30(Suppl. 8):30-6, 2003). СЕА, як правило, експресується в епітеліальних тканинах, включаючи клітини шлунково-кишкового тракту, дихальних та сечостатевого шляхів, та також клітини товстої кишки, шийки матки, потових залоз та передміхурової залози (Nap et al, Tumour biol., 9(2-3): 145-53, 1988; Nap et al, Cancer Res., 52(8):2329-23339, 1992). Кон'югат антитіло-лікарський засіб (ADC) зв'язує моноклональне антитіло або фрагмент антитіла з біологічно активним цитотоксином за допомогою стабільної хімічної лінкерної сполуки, повністю використовуючи специфічність зв'язування антитіла з поверхневими антигенами нормальних клітин та пухлинних клітин, та високу ефективність цитотоксичної речовини, та також уникнення першого недоліку, що полягає в слабкому терапевтичному ефекті, другого недоліку, що полягає в наявності серйозних токсичних побічних ефектів тощо. Це означає, що кон'югат антитіло-лікарський засіб може більш точно зв'язуватися з пухлинними клітинами та менше впливати на нормальні клітини в порівнянні зі звичайними хімотерапевтичними препаратами в минулому.

На даний час у патентах, таких як WO2015069430, повідомляється про деякі антитіла, націлені на СЕА, та препарати ADC. Проте, як і раніше, існує потреба в розробці більш ефективного та безпечного кон'югату анти-СЕА антитіло-лікарський засіб для більш ефективного застосування при лікуванні пухлин, пов'язаних з СЕА.

СУТЬ ВИНАХОДУ

Представлений винахід стосується кон'югату анти-СЕА антитіло-лікарський засіб та його фармацевтичного застосування, де кон'югат анти-СЕА антитіло-лікарський засіб містить анти-СЕА антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, кон'югований з токсинним лікарським засобом, необов'язково за допомогою лінкеру, де анти-СЕА антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент містять варіабельну ділянку важкого ланцюга та варіабельну ділянку легкого ланцюга антитіла, де:

i) HCDR1 та HCDR3 варіабельної ділянки важкого ланцюга є однаковими з HCDR1 та HCDR3 варіабельної ділянки важкого ланцюга представлених у SEQ ID NO: 7, та HCDR2 варіабельної ділянки важкого ланцюга є ідентичним до HCDR2 варіабельної ділянки важкого ланцюга представлених у SEQ ID NO: 7, або відрізняється від нього на одну амінокислоту; LCDR1, LCDR2 та LCDR3 варіабельної ділянки легкого ланцюга є однаковими з LCDR1, LCDR2 та LCDR3 варіабельної ділянки легкого ланцюга представлених у SEQ ID NO: 8;

ii) HCDR1 та HCDR3 варіабельної ділянки важкого ланцюга є однаковими з HCDR1 та HCDR3 варіабельної ділянки важкого ланцюга представлених у SEQ ID NO: 9, та HCDR2 варіабельної ділянки важкого ланцюга є ідентичним до HCDR2 варіабельної ділянки важкого ланцюга представлених у SEQ ID NO: 9 або відрізняється від нього на одну амінокислоту; LCDR1, LCDR2 та LCDR3 варіабельної ділянки легкого ланцюга є однаковими з LCDR1, LCDR2 та LCDR3 варіабельної ділянки легкого ланцюга представлених у SEQ ID NO: 10;

iii) HCDR1, HCDR2 та HCDR3 варіабельної ділянки важкого ланцюга є однаковими з HCDR1, HCDR2 та HCDR3 варіабельної ділянки важкого ланцюга представлених у SEQ ID NO: 11; LCDR1, LCDR2 та LCDR3 варіабельної ділянки легкого ланцюга є однаковими з LCDR1, LCDR2 та LCDR3 варіабельної ділянки легкого ланцюга представлених у SEQ ID NO: 12; або

iv) HCDR1 та HCDR3 варіабельної ділянки важкого ланцюга є однаковими з HCDR1 та HCDR3 варіабельної ділянки важкого ланцюга представленими у SEQ ID NO: 13, та HCDR2 варіабельної ділянки важкого ланцюга є ідентичним до HCDR2 варіабельної ділянки важкого ланцюга представлено у SEQ ID NO: 13 або відрізняється від нього на одну амінокислоту;
 5 LCDR1 та LCDR3 варіабельної ділянки легкого ланцюга є однаковими з LCDR1 та LCDR3 варіабельної ділянки легкого ланцюга представленими у SEQ ID NO: 14, та LCDR2 варіабельної ділянки легкого ланцюга є ідентичним до LCDR2 варіабельної ділянки легкого ланцюга представлено у SEQ ID NO: 14 або відрізняється від нього на одну амінокислоту.

В деяких варіантах здійснення представленого винаходу, анти-CEA антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент в кон'югаті антитіло-лікарський засіб містить варіабельну ділянку важкого ланцюга та варіабельну ділянку легкого ланцюга, де:

v) варіабельна ділянка важкого ланцюга включає HCDR1, HCDR2 та HCDR3 представлені у SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 та SEQ ID NO: 17, відповідно, та варіабельна ділянка легкого ланцюга включає LCDR1, LCDR2 та LCDR3 представлені у SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 та SEQ ID NO: 20, відповідно; або варіабельна ділянка важкого ланцюга включає HCDR1, HCDR2 та HCDR3 представлені у SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 38 та SEQ ID NO: 17, відповідно, та варіабельна ділянка легкого ланцюга включає LCDR1, LCDR2 та LCDR3 представлені у SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 та SEQ ID NO: 20, відповідно;

vi) варіабельна ділянка важкого ланцюга включає HCDR1, HCDR2 та HCDR3 представлені у SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 та SEQ ID NO: 23, відповідно, та варіабельна ділянка легкого ланцюга включає LCDR1, LCDR2 та LCDR3 представлені у SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 та SEQ ID NO: 26, відповідно; або варіабельна ділянка важкого ланцюга включає HCDR1, HCDR2 та HCDR3 представлені у SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 47 та SEQ ID NO: 23, відповідно, та варіабельна ділянка легкого ланцюга включає LCDR1, LCDR2 та LCDR3 представлені у SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 та SEQ ID NO: 26, відповідно;

vii) варіабельна ділянка важкого ланцюга включає HCDR1, HCDR2 та HCDR3 представлені у SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 та SEQ ID NO: 29, відповідно, та варіабельна ділянка легкого ланцюга включає LCDR1, LCDR2 та LCDR3 представлені у SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 та SEQ ID NO: 32, відповідно; або

viii) варіабельна ділянка важкого ланцюга включає HCDR1 та HCDR3 представлені у SEQ ID NO: 33 та SEQ ID NO: 34, відповідно, та HCDR2 представлені у SEQ ID NO: 16 або SEQ ID NO: 38; варіабельна ділянка легкого ланцюга включає LCDR1 та LCDR3 представлені у SEQ ID NO: 35 та SEQ ID NO: 37, та LCDR2 представлені у SEQ ID NO: 36 або SEQ ID NO: 64.

В деяких варіантах здійснення, анти-CEA антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент в кон'югаті антитіло-лікарський засіб містить варіабельну ділянку важкого ланцюга та варіабельну ділянку легкого ланцюга, де:

варіабельна ділянка важкого ланцюга включає HCDR1, HCDR2 та HCDR3 представлені у SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 16 та SEQ ID NO: 34, відповідно, та варіабельна ділянка легкого ланцюга включає LCDR1, LCDR2 та LCDR3 представлені у SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 та SEQ ID NO: 37, відповідно; або

варіабельна ділянка важкого ланцюга включає HCDR1, HCDR2 та HCDR3 представлені у SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 38 та SEQ ID NO: 34, відповідно, та варіабельна ділянка легкого ланцюга включає LCDR1, LCDR2 та LCDR3 представлені у SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 та SEQ ID NO: 37, відповідно; або

варіабельна ділянка важкого ланцюга включає HCDR1, HCDR2 та HCDR3 представлені у SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 16 та SEQ ID NO: 34, відповідно, та варіабельна ділянка легкого ланцюга включає LCDR1, LCDR2 та LCDR3 представлені у SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 64 та SEQ ID NO: 37, відповідно; або

переважно, варіабельна ділянка важкого ланцюга включає HCDR1, HCDR2 та HCDR3 представлені у SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 38 та SEQ ID NO: 34, відповідно, та варіабельна ділянка легкого ланцюга включає LCDR1, LCDR2 та LCDR3 представлені у SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 64 та SEQ ID NO: 37, відповідно.

В деяких варіантах здійснення представленого винаходу, анти-CEA антитіло в кон'югаті антитіло-лікарський засіб являє собою мишаче антитіло, химерне антитіло або гуманізоване антитіло.

В деяких варіантах здійснення представленого винаходу, анти-CEA антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, відповідно до будь-якого з вищезазначених варіантів здійснення, в кон'югаті антитіло-лікарський засіб містить варіабельну ділянку важкого ланцюга та варіабельну ділянку легкого ланцюга, де:

представлену у SEQ ID NO: 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75 або 76, або амінокислотну послідовність, що має щонайменше 90 % ідентичність будь-якій одній амінокислотній послідовності представлений у SEQ ID NO: 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75 або 76; переважно, варіабельна ділянка важкого ланцюга має амінокислотну послідовність представлену у SEQ ID NO: 68, та варіабельна ділянка легкого ланцюга має амінокислотну послідовність представлену у SEQ ID NO: 76.

В деяких варіантах здійснення представленого винаходу, анти-CEA антитіло відповідно до будь-якого із вищезазначених варіантів здійснення в кон'югаті антитіло-лікарський засіб являє собою гуманізоване антитіло, що містить каркасну ділянку, отриману з антитіла людини, або його варіанту каркасної ділянки, та варіант каркасної ділянки має зворотні мутації до 10 амінокислот у каркасній ділянці легкого ланцюга та/або каркасній ділянці важкого ланцюга антитіла людини;

переважно, варіант каркасної ділянки є вибраним з будь-якого одного з наступних (i) - (1):

(i) каркасної ділянки варіабельної ділянки легкого ланцюга, що містить LCDR1, LCDR2 та LCDR3, що мають послідовності представлені у SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 та SEQ ID NO: 20, відповідно, що включають одну або більше зворотних мутацій амінокислот, вибраних з групи, що складається з 46P, 47W, 49Y, 70S та 71Y, та/або каркасної ділянки варіабельної ділянки важкого ланцюга, що містить HCDR1, що має послідовність представлену у SEQ ID NO: 15, HCDR2, що має послідовність представлену у SEQ ID NO: 16 або SEQ ID NO: 38 та HCDR3, що має послідовність представлену у SEQ ID NO: 17, що включає одну або більше зворотних мутацій амінокислот, вибраних з групи, що складається з 38K та 46K;

(j) каркасної ділянки варіабельної ділянки легкого ланцюга, що містить LCDR1, LCDR2 та LCDR3, що мають послідовності представлені у SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 та SEQ ID NO: 26, відповідно, що включають одну або більше зворотних мутацій амінокислот, вибраних з групи, що складається з 2V, 42G, 44V та 71Y, та/або каркасної ділянки варіабельної ділянки важкого ланцюга, що містить HCDR1, що має послідовність представлену у SEQ ID NO: 21, HCDR2, що має послідовність представлену у SEQ ID NO: 22 або SEQ ID NO: 47 та HCDR3, що має послідовність представлену у SEQ ID NO: 23, що включає одну або більше зворотних мутацій амінокислот, вибраних з групи, що складається з 481, 66K, 67A, 69L, 71V, 73K, 82F та 82A R;

(к) каркасної ділянки варіабельної ділянки легкого ланцюга, що містить LCDR1, LCDR2 та LCDR3, що мають послідовності представлені у SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 та SEQ ID NO: 32, відповідно, що включають одну або більше зворотних мутацій амінокислот, вибраних з групи, що складається з 3V, 43P та 58V, та/або каркасної ділянки варіабельної ділянки важкого ланцюга, що містить HCDR1, HCDR2 та HCDR3, що мають послідовності представлені у SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 та SEQ ID NO: 29, що включають одну або більше зворотних мутацій амінокислот, вибраних з групи, що складається з 38K, 66K та 71V; та

(l) каркасної ділянки варіабельної ділянки легкого ланцюга, що містить LCDR1, що має послідовність представлену у SEQ ID NO: 35, LCDR2, що має послідовність представлену у SEQ ID NO: 36 або SEQ ID NO: 64 та LCDR3, що має послідовність представлену у SEQ ID NO: 37, що включає одну або більше зворотних мутацій амінокислот, вибраних з групи, що складається з 4V, 36Y, 43P, 47V, 49E, 70D та 871; та/або каркасної ділянки варіабельної ділянки важкого ланцюга, що містить HCDR1, що має послідовність представлену у SEQ ID NO: 33, HCDR2, що має послідовність представлену у SEQ ID NO: 16 або SEQ ID NO: 38 та HCDR3, що має послідовність представлену у SEQ ID NO: 34, що включає одну або більше зворотних мутацій амінокислот, вибраних з групи, що складається з 21, 38K та 46K; (т) каркасної ділянки варіабельної ділянки легкого ланцюга, що містить LCDR1, LCDR2 та LCDR3, що мають послідовності представлені у SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 та SEQ ID NO: 26, відповідно, що включають одну або більше зворотних мутацій амінокислот, вибраних з групи, що складається з 2V, 42G, 44V та 71Y, та/або каркасної ділянки варіабельної ділянки важкого ланцюга, що містить HCDR1, що має послідовність представлену у SEQ ID NO: 21, HCDR2, що має послідовність представлену у SEQ ID NO: 22 або SEQ ID NO: 47 та HCDR3, що має послідовність представлену у SEQ ID NO: 23, що включає одну або більше зворотних мутацій амінокислот, вибраних з групи, що складається з 66K, 67A, 69L, 71V, 73K, 82F та 82A R;

де сайти зворотних мутацій є пронумерованими відповідно до системи нумерації Кабата.

В деяких варіантах здійснення представленого винаходу, анти-CEA антитіло, відповідно до будь-якого із вищезазначених варіантів здійснення, в кон'югаті антитіло-лікарський засіб являє собою гуманізоване антитіло, що містить каркасну ділянку, отриману з антитіла людини, або його варіанту каркасної ділянки, та варіант каркасної ділянки має зворотні мутації до 10

амінокислот у каркаській ділянці легкого ланцюга та/або каркаській ділянці важкого ланцюга антитіла людини;

переважно, варіант каркаської ділянки є вибраним з будь-якого одного з наступних (i) - (1):

(i) каркаської ділянки варіабельної ділянки легкого ланцюга, що містить LCDR1, LCDR2 та LCDR3, що мають послідовності представлені у SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 та SEQ ID NO: 20, відповідно, що включають одну або більше зворотних мутацій амінокислот, вибраних з групи, що складається з 46P, 47W, 49Y, 70S та 71Y, та/або

каркаської ділянки варіабельної ділянки важкого ланцюга, що містить HCDR1, що має послідовність представлену у SEQ ID NO: 15, HCDR2, що має послідовність представлену у SEQ ID NO: 16 або SEQ ID NO: 38 та HCDR3, що має послідовність представлену у SEQ ID NO: 17, що включає одну або більше зворотних мутацій амінокислот, вибраних з групи, що складається з 38K та 46K;

(j) каркаської ділянки варіабельної ділянки легкого ланцюга, що містить LCDR1, LCDR2 та LCDR3, що мають послідовності представлені у SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 та SEQ ID NO: 26, відповідно, що включають одну або більше зворотних мутацій амінокислот, вибраних з групи, що складається з 2V, 42G, 44V та 71Y, та/або

каркаської ділянки варіабельної ділянки важкого ланцюга, що містить HCDR1, що має послідовність представлену у SEQ ID NO: 21, HCDR2, що має послідовність представлену у SEQ ID NO: 22 або SEQ ID NO: 47 та HCDR3, що має послідовність представлену у SEQ ID NO: 23, що включає одну або більше зворотних мутацій амінокислот, вибраних з групи, що складається з 48I, 66K, 67A, 69L, 71V, 73K, 82F та 82A R;

(k) каркаської ділянки варіабельної ділянки легкого ланцюга, що містить LCDR1, LCDR2 та LCDR3, що мають послідовності представлені у SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 та SEQ ID NO: 32, відповідно, що включають одну або більше зворотних мутацій амінокислот, вибраних з групи, що складається з 3V, 43P та 58V, та/або

каркаської ділянки варіабельної ділянки важкого ланцюга, що містить HCDR1, HCDR2 та HCDR3, що мають послідовності представлені у SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 та SEQ ID NO: 29, відповідно, що включають одну або більше зворотних мутацій амінокислот, вибраних з групи, що складається з 38K, 66K та 71V; та

(l) каркаської ділянки варіабельної ділянки легкого ланцюга, що містить LCDR1, що має послідовність представлену у SEQ ID NO: 35, LCDR2, що має послідовність представлену у SEQ ID NO: 36 або SEQ ID NO: 64 та LCDR3, що має послідовність представлену у SEQ ID NO: 37, що включають одну або більше зворотних мутацій амінокислот, вибраних з групи, що складається з 4V, 36Y, 43P, 47V, 49E, 70D та 87I; та/або

каркаської ділянки варіабельної ділянки важкого ланцюга, що містить HCDR1, що має послідовність представлену у SEQ ID NO: 33, HCDR2, що має послідовність представлену у SEQ ID NO: 16 або SEQ ID NO: 38 та HCDR3, що має послідовність представлену у SEQ ID NO: 34, що включає одну або більше зворотних мутацій амінокислот, вибраних з групи, що складається з 21, 38K та 46K;

де сайти зворотних мутацій є пронумерованими відповідно до системи нумерації Кабата.

В деяких варіантах здійснення представленого винаходу, анти-CEA антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, відповідно до будь-якого із вищезазначених варіантів здійснення, в кон'югаті антитіло-лікарський засіб містить константну ділянку важкого ланцюга та легкого ланцюга антитіла; переважно, константна ділянка важкого ланцюга є вибраною з групи, що складається з константних ділянок IgG1, IgG2, IgG3 та IgG4 людини, та константна ділянка легкого ланцюга є вибраною з групи, що складається з константних ділянок κ та λ ланцюга антитіла людини; більш переважно, антитіло містить константну ділянку важкого ланцюга, що має послідовність представлену у SEQ ID NO: 77 та константну ділянку легкого ланцюга, що має послідовність представлену у SEQ ID NO: 78 або SEQ ID NO: 79;

найбільш переважно, анти-CEA антитіло, що використовується в представленому винаході, містить:

(m) важкий ланцюг, що має послідовність представлену у SEQ ID NO: 80 або послідовність, що має щонайменше 85 % ідентичність з нею, та/або легкий ланцюг, що має послідовність представлену у SEQ ID NO: 81 або послідовність, що має щонайменше 85 % ідентичність з нею;

(n) важкий ланцюг, що має послідовність представлену у SEQ ID NO: 82 або послідовність, що має щонайменше 85 % ідентичність з нею, та/або легкий ланцюг, що має послідовність представлену у SEQ ID NO: 83 або послідовність, що має щонайменше 85 % ідентичність з нею;

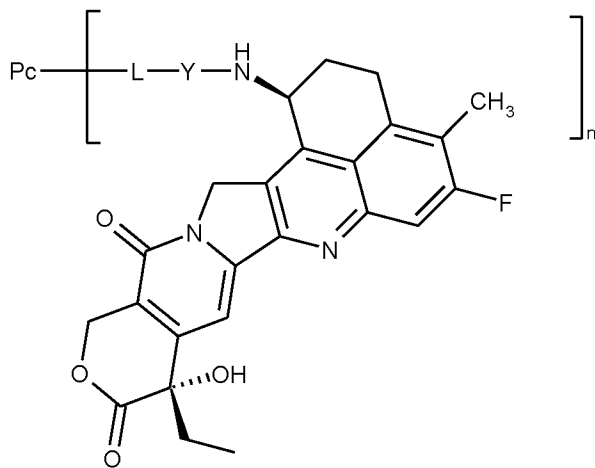
(o) важкий ланцюг, що має послідовність представлену у SEQ ID NO: 84 або послідовність, що має щонайменше 85 % ідентичність з нею, та/або легкий ланцюг, що має послідовність

представлену у SEQ ID NO: 85 або послідовність, що має щонайменше 85 % ідентичність з нею; або

(р) важкий ланцюг, що має послідовність представлену у SEQ ID NO: 86 або послідовність, що має щонайменше 85 % ідентичність з нею, та/або легкий ланцюг, що має послідовність представлену у SEQ ID NO: 87 або послідовність, що має щонайменше 85 % ідентичність з нею.

В деяких варіантах здійснення представленого винаходу, антигензв'язуючий фрагмент відповідно до будь-якого одного з вищезазначених варіантів здійснення, є вибраним з групи, що складається з Fab, Fab', F(ab')₂, одноланцюгового антитіла (scFv), димеризованої V-ділянки (діатіла) та V-ділянки стабілізованої дисульфідом (dsFv).

В деяких варіантах здійснення представленого винаходу, кон'югат антитіло-лікарський засіб відповідно до будь-якого одного з вищезазначених варіантів здійснення, являє собою кон'югат антитіло-лікарський засіб загальної формули (Pc-L-Y-D):



(Pc-L-Y-D)

де:

Y є вибраним з групи, що складається з -O-(CR^aR^b)_m-CR¹-R²-C(O)-, -O-CR¹-R²-(CR^aR^b)_m-, -O-CR¹R²-, -NH-(CR^aR^b)_m-CR¹-R²-C(O)- та -S-(CR^aR^b)_m-CR¹-R²-C(O)-;

R^a та R^b є однаковими або різними та кожний є незалежно вибраним з групи, що складається з водню, дейтерію, галогену, алкіл, галогеналкілу, дейтерованого алкілу, алкокси, гідрокси, аміно, ціано, нітро, гідроксисалкілу, циклоалкілу та гетероциклілу; або, R^a та R^b, разом з атомами вуглецю, що до них приєднані, утворюють циклоалкіл та гетероцикліл;

R¹ є вибраним з групи, що складається з галогену, галогеналкілу, дейтерованого алкілу, циклоалкілу, циклоалкілалкілу, алкоксисалкілу, гетероциклілу, арилу та гетероарилу; R² є вибраним з групи, що складається з водню, галогену, галогеналкілу, дейтерованого алкілу, циклоалкілу, циклоалкілалкілу, алкоксисалкілу, гетероциклілу, арилу та гетероарилу; або, R¹ та R², разом з атомами вуглецю, що до них приєднані, утворюють циклоалкіл або гетероцикліл;

або, R^a та R, разом з атомами вуглецю, що до них приєднані, утворюють циклоалкіл або гетероцикліл;

m є цілим числом від 0 до 4;

n є десятковим або цілим числом від 1 до 10;

L є лінкерною одиницею;

Pc являє собою антитіло CEA або його антигензв'язуючий фрагмент, як описано вище.

В деяких варіантах здійснення представленого винаходу, в кон'югаті антитіло-лікарський засіб, відповідно до будь-якого одного з вищезазначених варіантів здійснення, n являє собою ціле або десяткове число від 0 до 10, n може бути середнім значенням 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10, переважно від 1 до 8, більш переважно від 2 до 8, та найбільш переважно від 4 до 6, та n являє собою середнє десяткове або ціле число.

В деяких варіантах здійснення представленого винаходу, в кон'югаті антитіло-лікарський засіб, відповідно до будь-якого одного з вищезазначених варіантів здійснення, n являє собою середнє десяткове або ціле число від 3 до 5.

В деяких варіантах здійснення представленого винаходу, в кон'югаті антитіло-лікарський засіб відповідно до будь-якого одного з вищезазначених варіантів здійснення, n являє собою середнє десяткове або ціле число від 6 до 7.

В деяких варіантах здійснення представленого винаходу, кон'югат антитіло-лікарський засіб, відповідно до будь-якого одного з вищезазначених варіантів здійснення, є таким, як показано в загальній формулі (Pc-L-Y-D), де:

Y являє собою $-O-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$;

5 R^a та R^b є однаковими або різними та кожний є незалежно вибраним з групи, що складається з водню, дейтерію, галогену та алкілу;

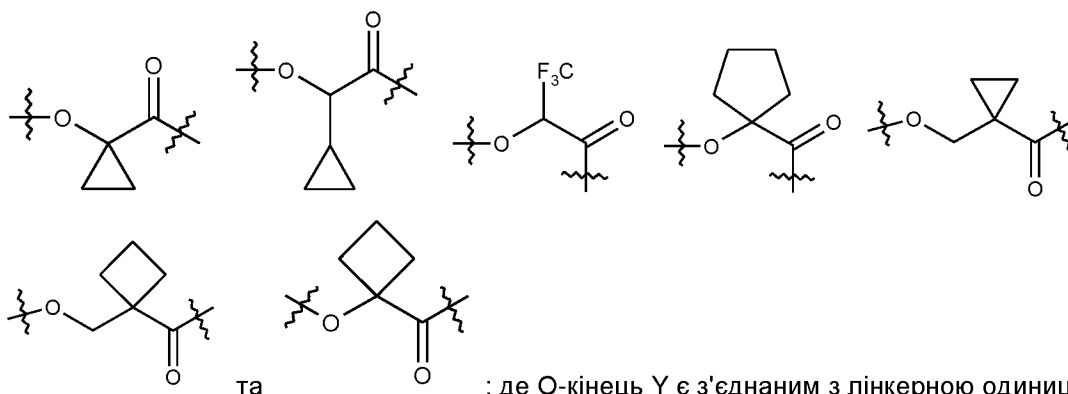
R^1 являє собою галогеналкіл або C_{3-6} циклоалкіл;

R^2 є вибраним з групи, що складається з водню, галогеналкілу та C_{3-6} циклоалкілу;

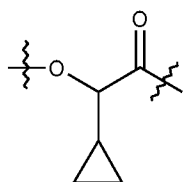
або, R^1 та R^2 , разом з атомами вуглецю, що до них приєднані, утворюють C_{3-6} циклоалкіл;

10 m являє собою 0 або 1.

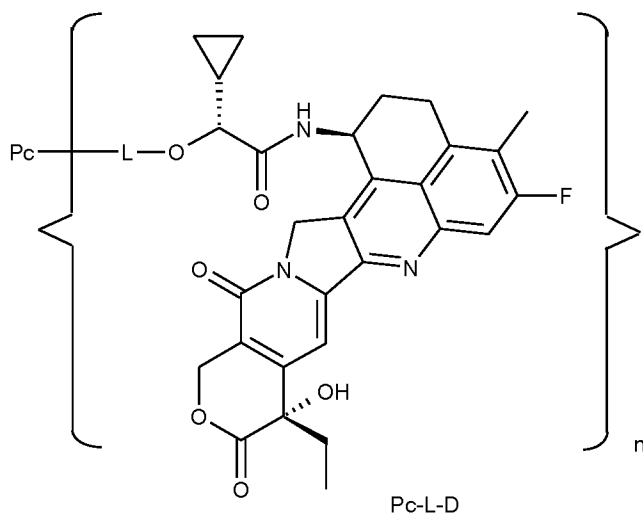
В деяких варіантах здійснення представленого винаходу, в кон'югаті антитіло-лікарський засіб, відповідно до будь-якого одного з вищезазначених варіантів здійснення, Y є вибраним з групи, що складається з:



В деяких варіантах здійснення представленого винаходу, в кон'югаті антитіло-лікарський засіб, відповідно до будь-якого одного з вищезазначених варіантів здійснення, Y являє собою:



В деяких варіантах здійснення представленого винаходу, кон'югат антитіло-лікарський засіб, відповідно до будь-якого одного з вищезазначених варіантів здійснення, є вибраним з:



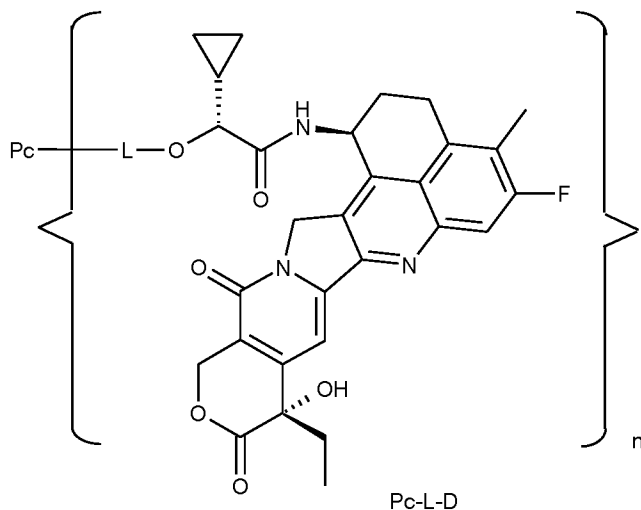
де:

L є лінкерною одиницею;

Pc являє собою анти-CEA антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент;

n є десятковим або цілим числом від 1 до 10.

В деяких варіантах здійснення представленого винаходу, кон'югат антитіло-лікарський засіб, відповідно до будь-якого одного з вищезазначених варіантів здійснення, є вибраним з:



5

де:

L є лінкерною одиницею;

Pc являє собою анти-СЕА антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент;

10 n є десятковим або цілим числом від 1 до 10.

В деяких варіантах здійснення представленого винаходу, в кон'югаті антитіло-лікарський засіб, відповідно до будь-якого одного з вищезазначених варіантів здійснення, лінкерна одиниця -L- являє собою $-L^1-L^2-L^3-L^4-$, де

15 L^1 є вибраним з групи, що складається з $-(\text{сукцинімідил-3-іл-N})-\text{W}-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{NR}^3-\text{W}-\text{C}(\text{O})-$ та $-\text{C}(\text{O})-\text{W}-\text{C}(\text{O})-$, де W є вибраним з групи, що складається з C_{1-8} алкілу, C_{1-8} алкілциклоалкілу та лінійного гетероалкілу, з від 1 до 8 атомами, та гетероалкіл містить від 1 до 3 гетероатомів вибраних з групи, що складається з N, O та S, де C_{1-8} алкіл, циклоалкіл та лінійний гетероалкіл, кожний є незалежно необов'язково додатково заміщеним одним або більше замісниками вибраними з групи, що складається з галогену, гідрокси, ціано, аміно, алкілу, хлоралкілу, дейтерованого алкілу, алкокси та циклоалкілу;

20 L^2 є вибраним з групи, що складається з $-\text{NR}^4(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})p^1\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$, $-\text{NR}^4(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})p^1\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$, $-\text{S}(\text{CH}_2)p^1\text{C}(\text{O})-$ та хімічного зв'язку, де p^1 являє собою ціле число від 1 до 20;

25 L^3 являє собою пептидний залишок, що складається з від 2 до 7 амінокислот, де амінокислоти є вибраними з амінокислотних залишків, утворених з амінокислот з фенілаланіну, гліцину, валіну, лізіну, цитруліну, серину, глутамінової кислоти та аспаргінової кислоти, та є необов'язково додатково заміщеними одним або більше замісниками вибраними з групи, що складається з галогену, гідрокси, ціано, аміно, алкілу, хлоралкілу, дейтерованого алкілу, алкокси та циклоалкілу;

30 L^4 є вибраним з групи, що складається з $-\text{NR}^5(\text{CR}^6\text{R}^7)_t-$, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^5$, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^5(\text{CH}_2)_t-$ та хімічного зв'язку, де t являє собою ціле число від 1 до 6;

R^3 , R^4 та R^5 є однаковими або різними та кожний, є незалежно вибраним з групи, що складається з водню, алкілу, галогеналкілу, дейтерованого алкілу та гідроксиалкілу;

35 R^6 та R^7 є однаковими або різними та кожний, є незалежно вибраним з групи, що складається з водню, галогену, алкілу, галогеналкілу, дейтерованого алкілу та гідроксиалкілу.

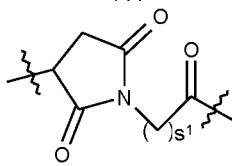
В деяких варіантах здійснення, L^1 є вибраним з групи, що складається з $-(\text{сукцинімідил-3-іл-N})-\text{W}-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{NR}^3-\text{W}-\text{C}(\text{O})-$ та $-\text{C}(\text{O})-\text{W}-\text{C}(\text{O})-$, де W є вибраним з групи, що складається з C_{1-8} алкілу, C_{1-8} алкіл- C_{3-6} циклоалкілу та лінійного гетероалкілу з від 1 до 8 атомами ланцюга, та гетероалкіл містить від 1 до 3 гетероатомів вибраних з групи, що складається з N, O та S, де C_{1-8} алкіл, C_{1-8} алкіл- C_{3-6} циклоалкіл або лінійний гетероалкіл з від 1 до 8 атомами ланцюга є незалежно необов'язково додатково заміщеним одним або більше замісниками, вибраними з групи, що складається з галогену, гідрокси, ціано, аміно, алкілу, хлоралкілу, дейтерованого алкілу, алкокси та циклоалкілу. В деяких варіантах здійснення, L^2 є вибраним з групи, що складається з $-\text{NR}^4(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})p^1\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$, $-\text{NR}^4(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})p^1\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$, $-\text{S}(\text{CH}_2)p^1\text{C}(\text{O})-$ та хімічного зв'язку, де p^1 являє собою ціле число від 1 до 20.

45

В деяких варіантах здійснення, L^3 являє собою пептидний залишок, що складається з від 2 до 7 амінокислот, де амінокислоти є вибраними з групи, що складається з амінокислотних залишків утворених з амінокислот з фенілаланіну, гліцину, валіну, лізину, цитруліну, серину, глутамінової кислоти та аспаргінової кислоти, та є необов'язково додатково заміщеними одним або більше замісниками вибраними з групи, що складається з галогену, гідрокси, ціано, аміно, алкілу, хлоралкілу, дейтерованого алкілу, алкокси та циклоалкілу. В деяких варіантах здійснення, L^4 є вибраним з групи, що складається з $-NR^5(CR^6R^7)_t$, $-C(O)NR^5$, $-C(O)NR^5(CH_2)_t$ та хімічного зв'язку, де t являє собою ціле число від 1 до 6. В деяких варіантах здійснення, R^3 , R^4 та R^5 є однаковими або різними та кожний є незалежно вибраним з групи, що складається з водню, алкілу, галогеналкілу, дейтерованого алкілу та гідроксиалкілу.

В деяких варіантах здійснення, R^6 та R^7 є однаковими або різними та кожний є незалежно вибраним з групи, що складається з водню, галогену, алкілу, галогеналкілу, дейтерованого алкілу та гідроксиалкілу.

В деяких варіантах здійснення представленого винаходу, в кон'югаті антитіло-лікарський засіб, відповідно до будь-якого одного з вищезазначених варіантів здійснення, лінкерна одиниця $-L-$ являє собою $-L^1-L^2-L^3-L^4-$, де



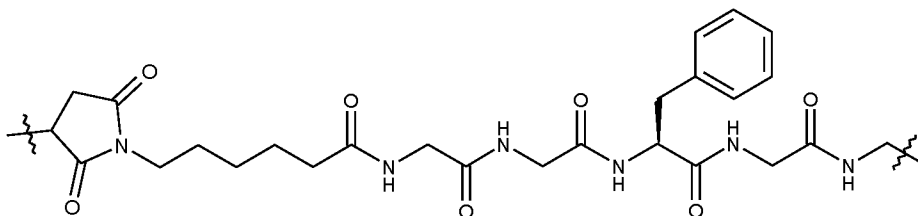
L^1 являє собою , та s^1 являє собою ціле число від 2 до 8;

L^2 являє собою хімічний зв'язок;

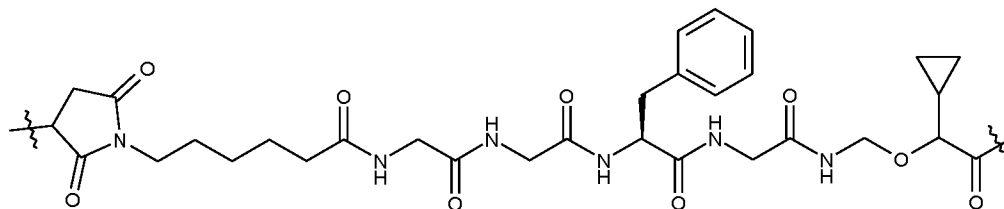
L^3 являє собою тетрапептидний залишок; переважно, L^3 являє собою тетрапептидний залишок гліцин-гліцин-фенілаланін-гліцин (GGFG, SEQ ID NO: 92);

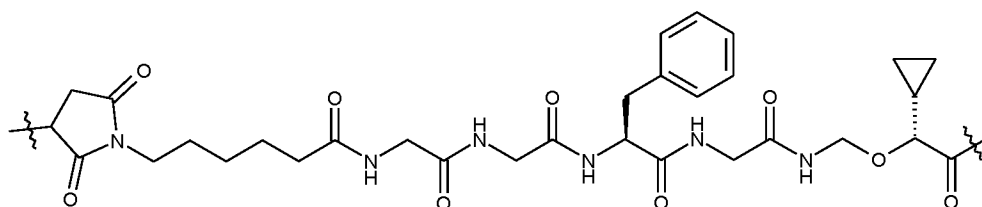
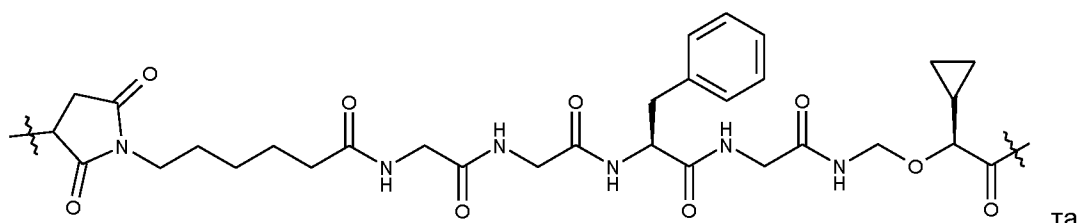
L^4 являє собою $-NR^5(CR^6R^7)_t$, де R^5 , R^6 та R^7 є однаковими або різними та кожний, незалежно являє собою водень або алкіл, та t являє собою 1 або 2; де кінець L^1 є з'єднаним з Pc , та кінець L^4 є з'єднаним з Y .

В деяких варіантах здійснення представленого винаходу, кон'югат антитіло-лікарський засіб, відповідно до будь-якого одного з вищезазначених варіантів здійснення є таким, як показано в загальній формулі ($Pc-L-Y-D$) або загальній формулі $Pc-L-D$, де $-L-$ являє собою:

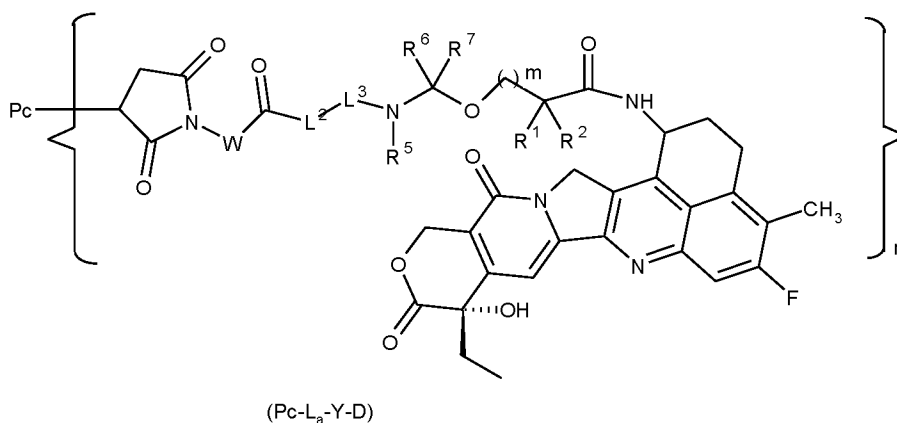


В деяких варіантах здійснення представленого винаходу, кон'югат антитіло-лікарський засіб, відповідно до будь-якого одного з вищезазначених варіантів здійснення є таким, як показано в загальній формулі ($Pc-L-Y-D$) або загальній формулі $Pc-L-D$, де $L-Y$ необов'язково є вибраним з групи, що складається з:





- 5 В деяких варіантах здійснення представленого винаходу, кон'югат антитіло-лікарський засіб, відповідно до будь-якого одного з вищезазначених варіантів здійснення являє собою кон'югат антитіло-лікарський засіб загальної формули (Pc-L_a-Y-D):

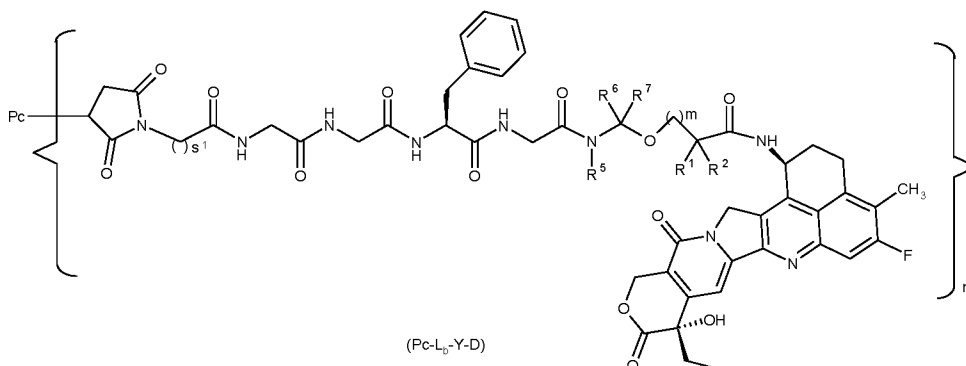


10

де:

W, L², L³, R⁵, R⁶ та R⁷ є такими, як визначено в лінкерній одиниці L;Pc, n, R¹, R² та m є такими, як визначено в загальній формулі (Pc-L-Y-D).

- 15 В деяких варіантах здійснення представленого винаходу, кон'югат антитіло-лікарський засіб, відповідно до будь-якого одного з вищезазначених варіантів здійснення, являє собою кон'югат антитіло-лікарський засіб загальної формули (Pc-L_b-Y-D):

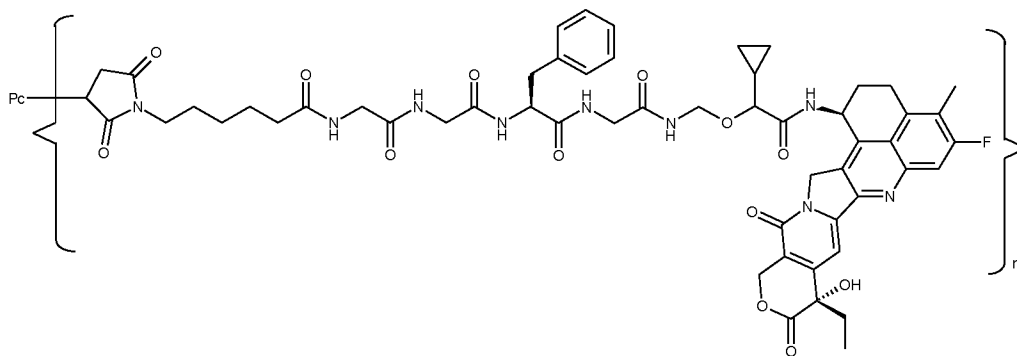


20

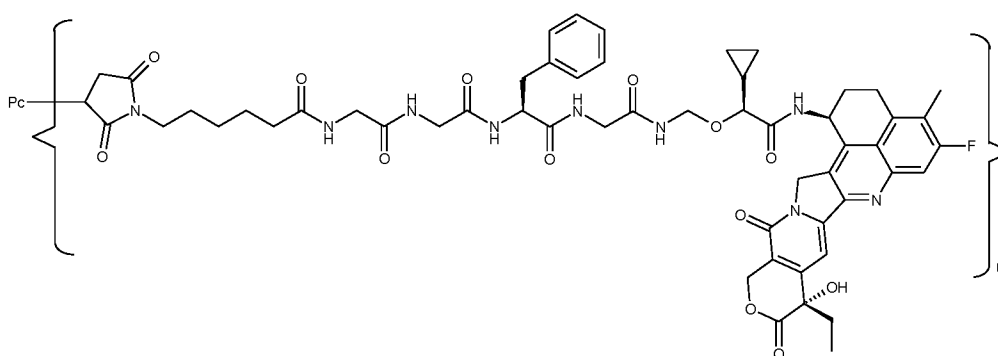
де:

s¹ являє собою ціле число від 2 до 8;Pc, R¹, R², R⁵-R⁷, m та n є такими, як визначено в загальній формулі (Pc-L_a-Y-D).

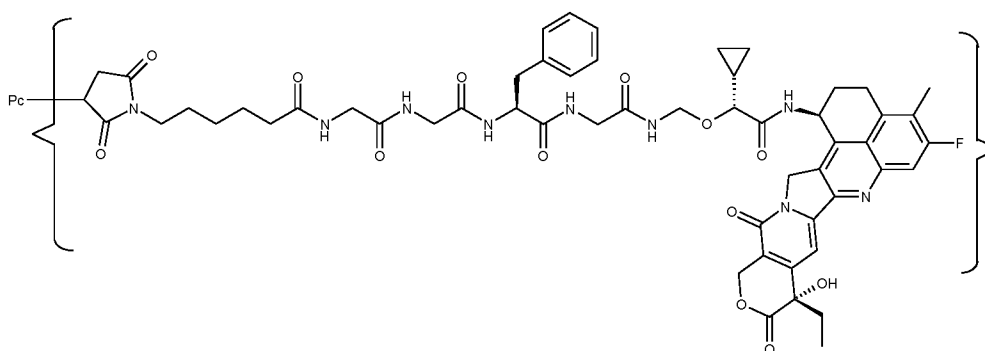
В деяких варіантах здійснення представленого винаходу, кон'югат антитіло-лікарський засіб, відповідно до будь-якого одного з вищезазначених варіантів здійснення є вибраним з групи, що складається з:



5



та



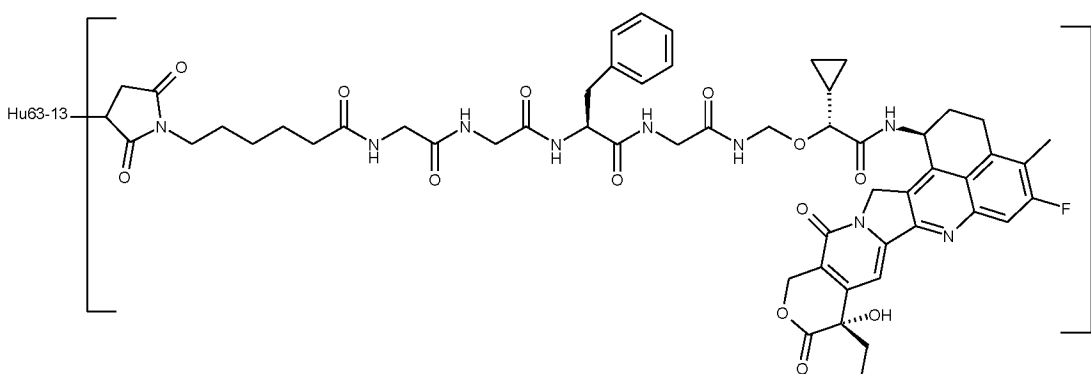
10

де Рс та n є такими, як визначено в загальній формулі (Pc-L-Y-D).

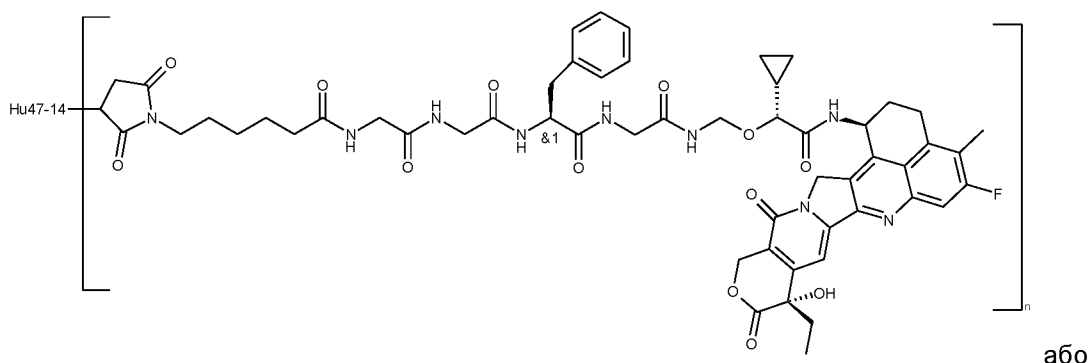
В деяких варіантах здійснення представленого винаходу, кон'югат антитіло-лікарський засіб є вибраним з групи, що складається з:

15

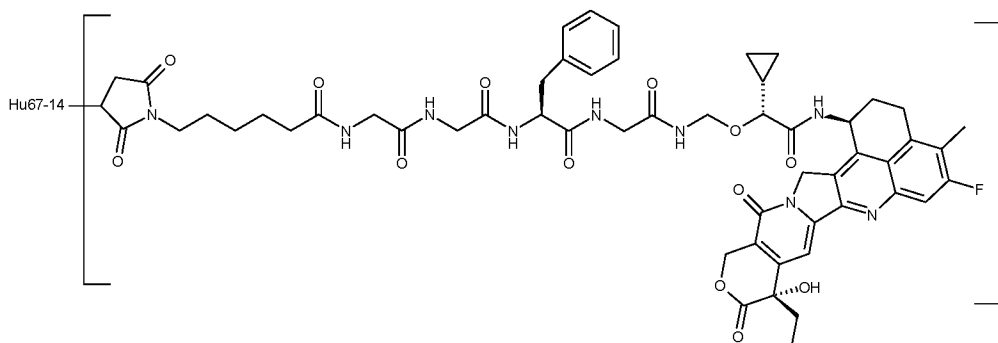
Hu63-13-2-A



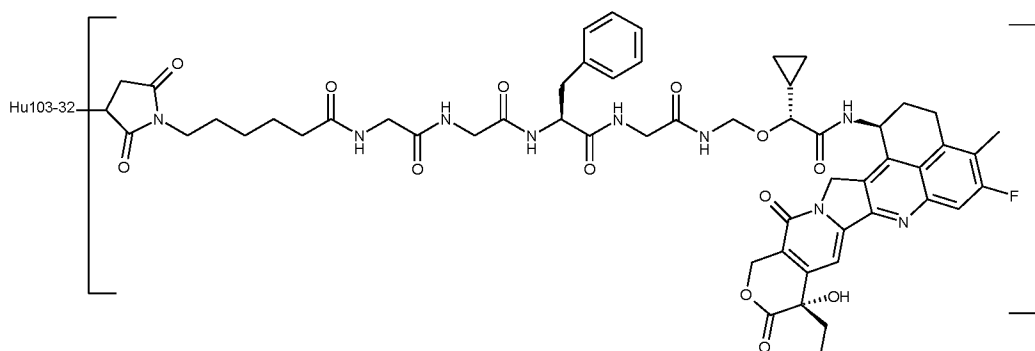
Hu47-14-2-A



5 Hu67-14-2-A



Hu103-32-2-A



10

де n є таким, як визначено в загальній формулі (Pc-L-Y-D);

антитіла є описаними наступним чином:

Hu63-13 містить важкий ланцюг, що має послідовність представлену у SEQ ID NO: 80, та легкий ланцюг, що має послідовність представлену у SEQ ID NO: 81;

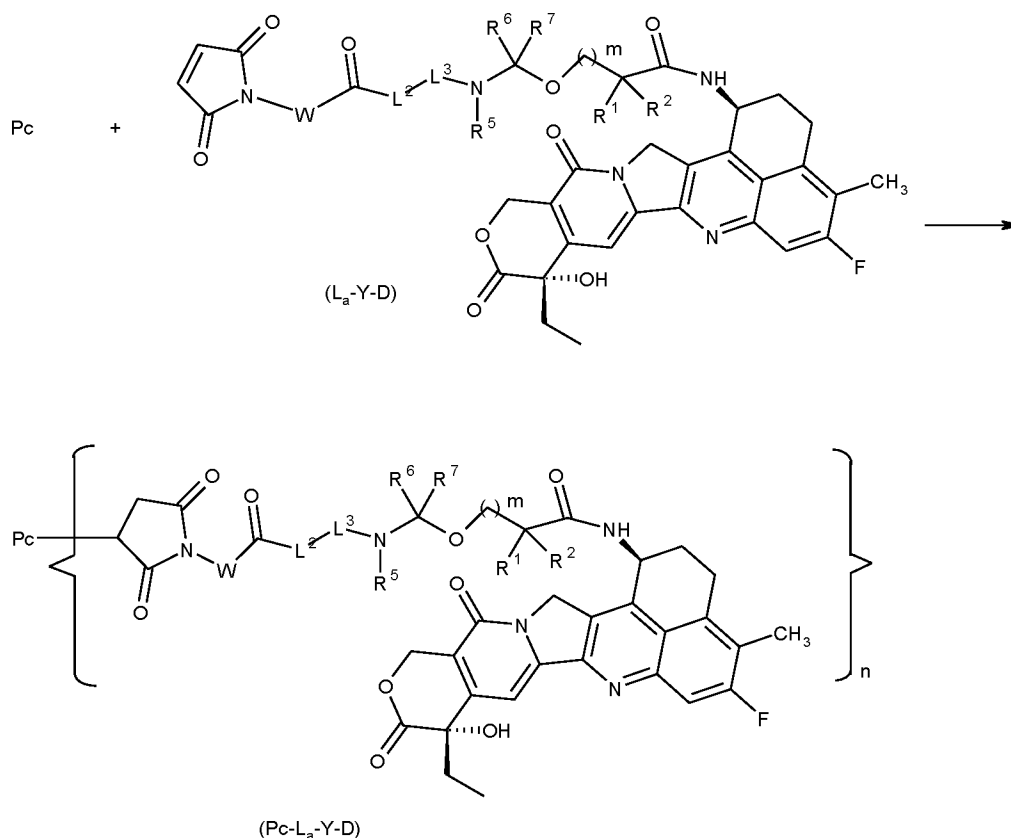
15 Hu47-14 містить важкий ланцюг, що має послідовність представлену у SEQ ID NO: 82, та легкий ланцюг, що має послідовність представлену у SEQ ID NO: 83;

Hu67-14 містить важкий ланцюг, що має послідовність представлену у SEQ ID NO: 84, та легкий ланцюг, що має послідовність представлену у SEQ ID NO: 85;

20 Hu103-32 містить важкий ланцюг, що має послідовність представлену у SEQ ID NO: 86, та легкий ланцюг, що має послідовність представлену у SEQ ID NO: 87.

Необов'язково, n може бути цілим числом, відмінним від нуля або десятковим числом від 0 до 10, переважно цілим або десятковим числом від 1 до 10; більш переважно цілим або десятковим числом від 2 до 8; та найбільш переважно цілим або десятковим числом від 3 до 8; необов'язково, n може бути десятковим або цілим числом від 3 до 5; необов'язково, n є десятковим або цілим числом від 6 до 7.

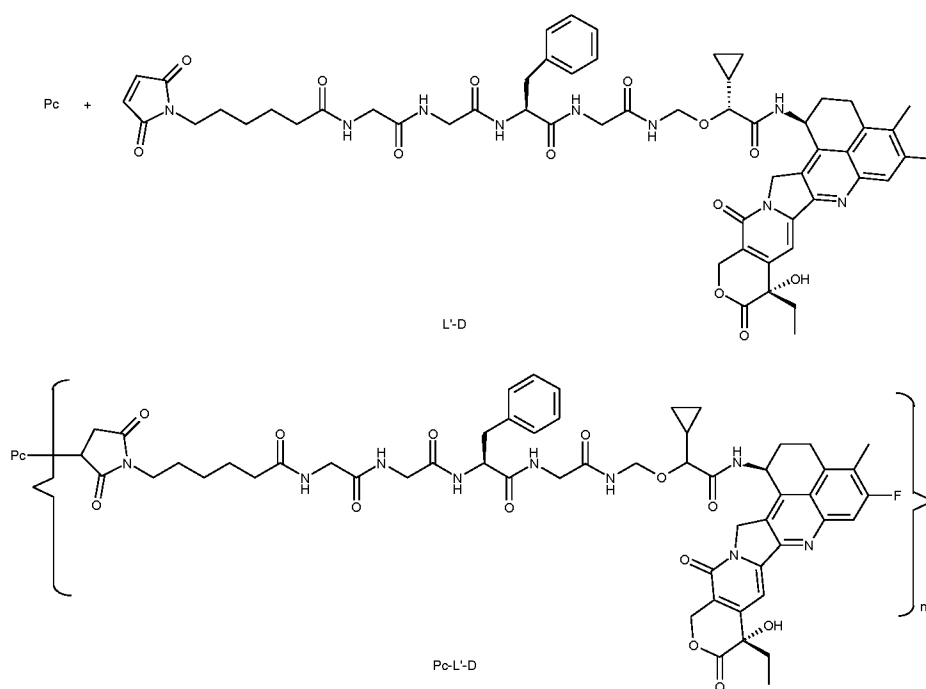
25 Представлений винахід додатково передбачає спосіб отримання кон'югату антитіло-лікарський засіб загальної формули (Pc-La-Y-D), де спосіб включає наступні стадії:



піддавання відновленого Рс та загальної формули (L_a-Y-D) реакції сполучення з отриманням сполуки загальної формули (Рс-L_a-Y-D); в якій:

- 5 Рс являє собою анти-CEA антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент;
W, L², L³, R¹, R², R⁵-R⁷, m та n є такими, як визначено в загальній формулі (Рс-L_a-Y-D).

Представлений винахід додатково передбачає спосіб отримання кон'югату антитіло-лікарський засіб загальної формули (Рс-L'-D), де спосіб включає наступні стадії:



піддавання відновленого Рс та загальної формули (L_a'-D) реакції сполучення з отриманням сполуки; в якій:

Рс являє собою анти-СЕА антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, як описано вище; п є таким, як визначено в загальній формулі (Рс-Л-У-Д).

В іншому аспекті, представлений винахід передбачає фармацевтичну композицію, що містить кон'югат антитіло-лікарський засіб, відповідно до будь-якого одного з вищезазначених варіантів здійснення та один або більше фармацевтично прийнятних ексципієнтів, розріджувачів або носіїв.

В іншому аспекті, представлений винахід передбачає застосування кон'югату антитіло-лікарський засіб, відповідно до будь-якого одного з вищезазначених варіантів здійснення, або фармацевтичної композиції, що містить теж саме, що й лікарський засіб.

В іншому аспекті, представлений винахід передбачає застосування кон'югату антитіло-лікарський засіб, відповідно до будь-якого одного з вищезазначених варіантів здійснення, або фармацевтичної композиції, що містить теж саме, для отримання лікарського засобу для лікування захворювання або стану, опосередкованого СЕА. Захворювання або стан, опосередкований СЕА являє собою рак з високою експресією СЕА, або захворювання або стан, опосередкований СЕА являє собою рак з помірною експресією СЕА.

В іншому аспекті, представлений винахід передбачає застосування кон'югату антитіло-лікарський засіб, відповідно до будь-якого одного з вищезазначених варіантів здійснення, або фармацевтичної композиції, що містить теж саме, для отримання лікарського засобу для лікування або попередження пухлини; де пухлина та рак переважно являє собою плоскоклітинну карциному голови та шиї, рак голови та шиї, рак мозку, нейрогліому, мультиформну гліобластому, нейробластому, карциному центральної нервової системи, нейроендокринну пухлину, рак горла, рак носоглотки, рак стравоходу, рак щитоподібної залози, злоякісну плевральну мезотеліому, рак легенів, рак молочної залози, рак печінки, гепатобіліарний рак, рак підшлункової залози, рак шлунку, рак шлунково-кишкового тракту, рак кишечника, рак товстої кишки, колоректальний рак, рак нирки, нирково-клітинну карциному, рак яєчників, рак ендометрію, рак шийки матки, рак сечового міхура, рак передміхурової залози, рак яєчка, рак шкіри, меланому, лейкомію, лімфому, рак кістки, хондросаркому, мієлому, множинну мієлому, мієлодиспластичний синдром, Пухлину Крукенберга, мієлопроліферативну пухлину, плоскоклітинний рак, Саркому Юінга, системний амілоїдоз легких ланцюгів або клітинну карциному Меркеля; більш переважно, лімфома є вибраною з групи, що складається з: лімфоми Ходжкіна, неходжкінської лімфоми, дифузної В-великоклітинної лімфоми, фолікулярної лімфоми, первинної медіастинальної В-великоклітинної лімфоми, мантийно-клітинної лімфоми, малої лімфоцитарної лімфоми, В-великоклітинної лімфоми багаті Т-клітинами/гістіоцитами та лімфоплазмацитарної лімфоми, рак легенів є вибраним з недрібноклітинного раку легенів або дрібноклітинного раку легенів, та лейкомія є вибраною з групи, що складається з: хронічної мієлоїдної лейкомії, гострої мієлоїдної лейкомії, лімфоцитарної лейкомії, лімфобластної лейкомії, гострої лімфобластної лейкомії, хронічної лімфобластної лейкомії та мієлоїдно-клітинної лейкомії.

В іншому аспекті, представлений винахід додатково стосується способу лікування та/або запобігання пухлині, де спосіб включає введення пацієнту, який цього потребує, терапевтично ефективної кількості кон'югату антитіло-лікарський засіб, відповідно до будь-якого одного з вищезазначених варіантів здійснення, або фармацевтичної композиції, що його містить; де пухлина переважно являє собою рак пов'язаний з високою експресією СЕА.

В іншому аспекті, представлений винахід додатково стосується способу лікування або запобігання раку, де спосіб включає введення пацієнту, який цього потребує, терапевтично ефективної кількості кон'югату антитіло-лікарський засіб, відповідно до будь-якого одного з вищезазначених варіантів здійснення, або фармацевтичної композиції, що його містить; де пухлина та рак переважно являють собою плоскоклітинну карциному голови та шиї, рак голови та шиї, рак мозку, нейрогліому, мультиформну гліобластому, нейробластому, карциному центральної нервової системи, нейроендокринну пухлину, рак горла, рак носоглотки, рак стравоходу, рак щитоподібної залози, злоякісну плевральну мезотеліому, рак легенів, рак молочної залози, рак печінки, гепатобіліарний рак, рак підшлункової залози, рак шлунку, рак шлунково-кишкового тракту, рак кишечника, рак товстої кишки, колоректальний рак, рак нирки, нирково-клітинну карциному, рак яєчників, рак ендометрію, рак шийки матки, рак сечового міхура, рак передміхурової залози, рак яєчка, рак шкіри, меланому, лейкомію, лімфому, рак кістки, хондросаркому, мієлому, множинну мієлому, мієлодиспластичний синдром, пухлину Крукенберга, мієлопроліферативну пухлину, плоскоклітинний рак, саркому Юінга, системний амілоїдоз легких ланцюгів або клітинну карциному Меркеля; більш переважно, лімфома є вибраною з групи, що складається з: лімфоми Ходжкіна, неходжкінської лімфоми, дифузної В-великоклітинної лімфоми, фолікулярної лімфоми, первинної медіастинальної В-великоклітинної

лімфоми, мантийно-клітинної лімфоми, малої лімфоцитарної лімфоми, В-великоклітинної лімфоми багатоклітинної Т-клітинами/гістіоцитами та лімфоплазмацитарної лімфоми, рак легень є вибраним з недрібноклітинного раку легень або дрібноклітинного раку легень, та лейкоз є вибраною з групи, що складається з: хронічної мієлоїдної лейкозії, гострої мієлоїдної лейкозії, лімфоцитарної лейкозії, лімфобластної лейкозії, гострої лімфобластної лейкозії, хронічної лімфобластної лейкозії та мієлоїдно-клітинної лейкозії. Активна сполука (наприклад, кон'югат ліганд-лікарський засіб, відповідно до представленого винаходу, або його фармацевтично прийнятна сіль) може бути сформульованою у формі, прийнятній для введення за будь-яким прийнятним способом, переважно у формі стандартної дози або у формі одноразової дози, яка може бути введена суб'єктом самостійно. Стандартна доза, за представленим винаходом може бути у вигляді таблетки, капсули, облатки, флакону, порошку, гранули, пастилки, супозиторію, регенеруючого порошку або у рідкій лікарській формі.

Доза введення активної сполуки або композиції, що використовується у способі лікування за представленим винаходом, як правило, варіюватиметься залежно від тяжкості захворювання, ваги суб'єкта та ефективності активної сполуки. Проте, як загальне керівництво, прийнятна стандартна доза може становити від 0,1 до 1000 мг. Фармацевтична композиція за представленим винаходом, на додаток до активної сполуки, може містити один або більше ексципієнтів вибраних з групи, що складається з: наповнювача, розріджувача, зв'язуючої речовини, змочуючого агенту, дезінтегруючого агенту, ексципієнту тощо. В залежності від способу введення, композиція може містити від 0,1 до 99 мас. % активної сполуки.

Антитіло CEA та кон'югат антитіло-лікарський засіб передбачені в представленому винаході, мають гарну афінність до антигенів клітинної поверхні, гарну ефективність ендодитозу та високу ефективність інгібування пухлини, а також більш широкі можливості застосування лікарського засобу, та є прийнятними для клінічного застосування лікарського засобу.

КОРОТКИЙ ОПИС КРЕСЛЕНЬ

На Фігурі 1 представлені результати FACS-детектування зв'язування гуманізованих антитіл з CEA людини на клітинному рівні.

Фігура 2 демонструє байстендер ефект та цитотоксичність молекул ADC; дані демонструють, що всі молекули ADC мають сильний байстендер ефект та цитотоксичність, і при спільному культивуванні MKN45 та HCT116, молекули ADC можуть інгібувати проліферацію обох типів клітин, в той час як при культивуванні HCT116 окремо, молекули ADC в поєднанні з 2-A принципово не є токсичними для клітин.

Фігура 3 демонструє вплив молекул ADC на об'єм пухлини в моделі пухлини ксенотрансплантата LS174T; дані демонструють, що всі молекули ADC мають вплив на інгібування збільшення об'єму пухлин порівняно з контрольною групою (PBS), та інгібуючі ефекти на пухлини в групах 3-мПК є кращими, ніж у групах 1-мПК; серед груп 3-мПК найкращий інгібуючий ефект на пухлини має Hu63-13-2-A, за ним слідує Hu47-14-2-A та потім Hu67-14-2-A, та Lmab-CL2A-SN38 має найгірший інгібуючий ефект на пухлини.

Фігура 4 демонструє вплив молекул ADC на масу пухлини в моделі пухлини ксенотрансплантата LS174T; дані демонструють, що всі молекули ADC мають вплив на інгібування збільшення маси пухлин, як при низьких, так і при високих дозах порівняно з контрольною групою (PBS); серед груп 3-мПК найкращий інгібуючий ефект на пухлини має Hu63-13-2-A, за ним слідує Hu47-14-2-A та потім Hu67-14-2-A, та Lmab-CL2A-SN38 має найгірший інгібуючий ефект на пухлини.

Фігура 5 демонструє вплив молекул ADC на об'єм пухлини в моделі пухлини ксенотрансплантата MKN45; дані демонструють, що всі молекули ADC мають вплив на інгібування збільшення об'єму пухлин порівняно з контрольною групою (PBS), та інгібуючі ефекти на пухлини в групах 3-мПК є кращими, ніж у групах 1-мПК; серед груп 3-мПК найкращий інгібуючий ефект на пухлини має Hu67-14-2-A, за ним слідує Hu103-32-2-A та потім Hu63-13-2-A, та Lmab-CL2A-SN38 має найгірший інгібуючий ефект на пухлини.

Фігура 6 демонструє вплив молекул ADC на масу пухлини в моделі пухлини ксенотрансплантата MKN45; дані демонструють, що всі молекули ADC мають вплив на інгібування збільшення маси пухлин, як при низьких, так і при високих дозах порівняно з контрольною групою (PBS); серед груп 3-мПК, найкращий інгібуючий ефект на пухлини має Hu67-14-2-A, за ним слідує Hu103-32-2-A та потім Hu63-13-2-A, та Lmab-CL2A-SN38 має найгірший інгібуючий ефект на пухлини.

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС ВІНАХОДУ

1. Термінологія

Якщо не визначено інше, всі технічні та наукові терміни, що використовуються в даному документі, мають те саме значення, яке, як правило, розуміють спеціалісти в даній галузі

техніки, до якої належить представлений винахід. Хоча будь-які способи та матеріали, подібні або еквівалентні тим, що описані в даному документі, можуть бути використані для реалізації або дослідження представленого винаходу, в даному документі є описаними переважні способи та матеріали. В описі та формулі представленого винаходу, наступні терміни є використаними відповідно до наведених нижче визначень.

Коли в представленому винаході використовується торгове найменування, передбачається, що воно включає склад комерційного продукту під торговим найменуванням, а також непатентований лікарський засіб та активний лікарський компонент комерційного продукту під торговим найменуванням.

Якщо не зазначено інше, терміни, використані в описі та формулі винаходу, мають наступне значення.

Термін "лікарський засіб" стосується хімічної речовини, яка може змінювати або визначати фізіологію та патологічний стан організму та може застосовуватись для профілактики, діагностики та лікування захворювань. До складу лікарського засобу входить цитотоксичний препарат. Немає чіткої межі між лікарським засобом та токсичною речовиною. Токсична речовина стосується хімічної речовини, яка має токсичну дію на організми та здатна заподіяти шкоду здоров'ю людини навіть у невеликих дозах.

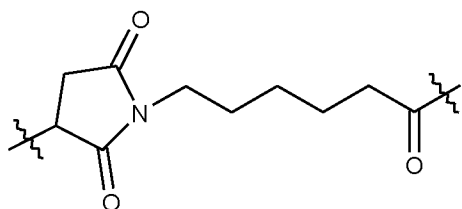
Будь-який лікарський засіб у великих дозах може викликати токсичні реакції.

Цитотоксичний препарат стосується речовини, яка інгібує або перешкоджає функціонуванню клітин та/або спричиняє загибель або руйнування клітин. Цитотоксичний препарат, в принципі може вбивати пухлинні клітини при досить високій концентрації; проте, через відсутність специфічності, цитотоксичний препарат може викликати апоптоз нормальних клітин, вбиваючи при цьому пухлинні клітини, що призводить до серйозних побічних ефектів. Цитотоксичний препарат включає токсини, такі як низькомолекулярні токсини або ферментативно активні токсини бактеріального, грибового, рослинного або тваринного походження, радіоізотопи (наприклад, At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} та радіоактивні ізотопи Lu), токсичні препарати, хімотерапевтичні препарати, антибіотики та нуклеолітичні ферменти. Термін "лінкерна одиниця", "лінкер" або "фрагмент лінкера" стосується хімічного структурного фрагменту або зв'язку, який є зв'язаним з лігандом на одному кінці та зв'язаним з лікарським засобом на іншому кінці, та також може бути зв'язаним з іншими лінкерами, та потім зв'язаним з лікарським засобом.

Лінкер може містити один або більше компонентів лінкера. Приклади компонентів лінкера включають 6-малеїмідокапроїл ("MC"), малеїмідопропіоніл ("MP"), валін-цитрулін ("val-cit" або "vc"), аланін-фенілаланін ("ala-phe"), p-амінобензилоксикарбоніл ("PAB"), N-сукцинімідил 4-(2-піридилтіо)пентаноат ("SPP"), N-сукцинімідил 4-(N-малеїмідометил)циклогексан-1 карбоксилат ("SMCC", також згадується в даному документі як "MCC"), та N-сукцинімідил(4-йодоацетил)амінобензоат ("SIAB"). Лінкер може включати екстендери, спейсери та амінокислотні ланки та може бути синтезований з використанням способів, відомих у даній галузі техніки, такі як описані в документі US 2005-0238649A1. Лінкер може бути "розщеплюваним лінкером", що сприяє вивільненню лікарських засобів у клітинах. Наприклад, можуть бути використані кислотолабільні лінкери (наприклад, гідразони), чутливі до протеази лінкери (наприклад, чутливі до пептидази), фотоллабільні лінкери, диметиллінкер або дисульфідвмісні лінкери. (Chari et al., Cancer Research 52: 127-131(1992); Патент США № 5,208,020).

Скорочення

Компоненти лінкера включають, але не обмежуються цим: MC=6-малеїмідокапроїл, що має структуру:



Val-Cit або "vc"=валін-цитрулін (приклад дипептиду в розщеплюваному протеазою лінкері),
цитрулін=2-аміно-5-уреїдопентова кислота,
PAB=p-амінобензилоксикарбоніл (приклад "саморуйнівних" компонентів лінкера),
Me-Val-Cit=N-метил-валін-цитрулін (де лінкерний пептидний зв'язок був модифікований).

для запобігання його розщепленню катепсином В),
 MC(PEG)6-OH=малеїмідокапроїл-поліетиленгліколь (приєднується до цистеїну антитіла),
 SPP=N-сукцинімідил 4-(2-піридилтіо)валерат,
 SPDP=N-сукцинімідил 3-(2-піридилдитіо)пропіонат,
 5 SMCC=сукцинімідил-4-(N-малеїмідометил)циклогексан-1-карбоксилат,
 IT=імінотіолан.

Термін "кон'югат антитіло-лікарський засіб" означає, що антитіло є зв'язаним з біологічно активним лікарським засобом за допомогою стабільної зв'язуючої одиниці. В представленому винаході, "кон'югат антитіло-лікарський засіб" або кон'югат антитіло лікарський засіб (ADC)
 10 означає, що моноклональне антитіло або фрагмент антитіла є зв'язаними з біологічно активним токсичним лікарським засобом за допомогою стабільної зв'язуючої одиниці. Антитіло може бути кон'юговане з лікарським засобом безпосередньо або через лінкер. Середня кількість модулів лікарського засобу, кон'югованих з кожним антитілом (середнє навантаження лікарського засобу або навантаження лікарського засобу, яке може бути представлене як n), може знаходитися в
 15 діапазоні, наприклад, від приблизно 0 до приблизно 20 модулів лікарського засобу; в деяких варіантах здійснення від 1 до приблизно 10 модулів лікарського засобу; та в деяких варіантах здійснення від 1 до приблизно 8 модулів лікарського засобу.

Термін "середнє навантаження лікарським засобом" або "лікарське навантаження" стосується середньої кількості цитотоксичного лікарського засобу, навантаженого на ліганд у молекулах кон'югату антитіло-лікарський засіб, та може також бути представлений як співвідношення лікарського засобу до антитіла. Навантаження лікарським засобом може варіюватися від 0-12, переважно 1-10 цитотоксичних препаратів на ліганд (Pc). У варіантах здійснення представленого винаходу, навантаження лікарським засобом є представленим як n ,
 20 що також може називатися значенням DAR (співвідношення лікарський засіб-антитіло), та приблизні значення можуть являти собою середнє значення 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 та 10. Середня кількість лікарських засобів на молекулу ADC після реакцій зв'язування може бути охарактеризована за допомогою звичайних способів, таких як УФ/видима спектроскопія, мас-спектрометрія, аналізи ELISA та ВЕРХ.

Трилітерні та однолітерні коди амінокислот, що використовуються в представленому винаході, є описаними в J. biol. chem, 243, p3558 (1968).

Термін "антитіло" стосується імуноглобуліну, який має структуру тетрапептидного ланцюга, утвореного шляхом з'єднання двох важких ланцюгів та двох легких ланцюгів за допомогою міжланцюгових дисульфідних зв'язків. Відповідно до відмінностей в амінокислотній композиції та порядку розташування константних ділянок важкого ланцюга, імуноглобуліни можуть бути розділені на п'ять класів, що інакше називаються ізотипами імуноглобулінів, а саме IgM, IgD,
 35 IgG, IgA та IgE, з їх відповідними важкими ланцюгами, що являють собою μ -ланцюг, δ -ланцюг, γ -ланцюг, α -ланцюг та ϵ -ланцюг, відповідно. Ig одного класу може бути розділений на різні підкласи відповідно до відмінностей в амінокислотній композиції шарнірних ділянок та кількості і положеннях дисульфідних зв'язків важких ланцюгів; наприклад, IgG може бути розділений на
 40 IgG1, IgG2, IgG3 та IgG4. Легкі ланцюги класифікуються на κ - або λ -ланцюги за відмінностями в константних ділянках. Кожний з п'яти класів Ig може мати κ -ланцюг або λ -ланцюг.

У важких талегких ланцюгах повнорозмірних антитіл, послідовності приблизно зі 110 амінокислот поблизу N-кінця значно відрізняються і тому називаються варіабельними ділянками (Fv-ділянками); решта амінокислотних послідовностей поблизу C-кінця є відносно стабільними і
 45 тому називаються константними ділянками. Варіабельні ділянки включають 3 гіперваріабельні ділянки (HVR) та 4 каркасні ділянки (FR) з відносно консервативними послідовностями. 3 гіперваріабельні ділянки визначають специфічність антитіла і тому також є відомими як ділянки, що визначають комплементарність (CDR). Кожна варіабельна ділянка легкого ланцюга (LCVR) або варіабельна ділянка важкого ланцюга (HCVR) складається з 3 CDR та 4 FR, розташованих
 50 від аміно-кінця до карбокси-кінця в наступному порядку: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 та FR4. 3 CDR легкого ланцюга відносяться до LCDR1, LCDR2 та LCDR3, та 3 CDR важкого ланцюга відносяться до HCDR1, HCDR2 та HCDR3.

Терміни "повністю гуманізоване антитіло", "повністю людське антитіло" або "абсолютно людське антитіло", також відомі як "повністю гуманізоване моноклональне антитіло", мають як гуманізовану варіабельну ділянку, так і константну ділянку, для усунення імуногенності та токсичних побічних ефектів. Розвиток моноклональних антитіл має чотири стадії, а саме мишачі моноклональні антитіла, химерні моноклональні антитіла, гуманізовані моноклональні антитіла та повністю гуманізовані моноклональні антитіла. Основні релевантні технології отримання повністю людських антитіл включають: технологію отримання гібридами людини, технологію отримання В-лімфоцитів, трансформованих EBV, технологію фагового дисплея, технологію
 60

отримання антитіл трансгенних мишей, технологію отримання В-одноклітинного антитіла тощо. Термін антигензв'язуючий фрагмент стосується одного або більше фрагментів антитіла, які зберігають здатність зв'язуватися з антигеном. Демонструє, що фрагмент повнорозмірного антитіла може бути використаний для виконання антигензв'язуючої функції антитіла. Зв'язуючий

5 фрагмент, що входить до складу "антигензв'язуючого фрагмента" є вибраним з групи, що складається з Fab, Fab', F(ab')₂, одно ланцюгового антитіла (scFv), димеризованої V-ділянки (діатіло), дисульфід-стабілізованої V-ділянки (dsFv) та антигензв'язуючих фрагментів пептидів, що містять CDR; приклади включають (i) фрагменти Fab, моновалентні фрагменти, що складаються з доменів VL, VH, CL та CH1; (ii) фрагменти F(ab')₂, двовалентні фрагменти, що

10 містять два фрагменти Fab, з'єднані за допомогою дисульфідних містків в шарнірних ділянках; (iii) фрагменти Fd, що складаються з доменів VH та CH1; (iv) фрагменти Fv, що складаються з доменів VH та VL одного плеча антитіла; (v) окремі домени або фрагменти dAb (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546), що складаються з доменів VH; та (vi) виділені ділянки, що визначають комплементарність (CDR) або (vii) комбінації двох або більше виділених CDR, які

15 можуть бути необов'язково зв'язані синтетичними лінкерами. Крім того, хоча два домени фрагмента Fv, VL та VH, кодуються окремими генами, вони можуть бути зв'язаними синтетичним лінкером шляхом рекомбінації, таким чином, що він є здатним продукувати єдиний протеїновий ланцюг, в якому ділянки VL та VH поєднані та утворюють моновалентну молекулу (що називається одноланцюговим Fv (scFv); дивіться, наприклад, Bird et al. (1988) Science

20 242:423-426; та Huston et al. (1988) Proc. Natl Acad. Sci USA 85:5879-5883). Такі одноланцюгові антитіла також є включеними в термін "антигензв'язуючий фрагмент" антитіла. Такі фрагменти антитіла є отриманими з використанням звичайних способів, відомих фахівцям в даній галузі, та підданими скринінгу на придатність таким самим чином, як і інтактні антитіла. Антигензв'язуючі частини можуть бути отримані з використанням технології рекомбінантної ДНК або шляхом ферментативного або хімічного розщеплення інтактних імуноглобулінів. Антитіла можуть бути різних ізотипів, наприклад, IgG (наприклад, підтип IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4), IgA1, IgA2, IgD, IgE або IgM антитіла. Як правило, Fab являє собою фрагмент антитіла, що має молекулярну масу приблизно 50 000 та має антигензв'язуючу активність, серед фрагментів, отриманих шляхом

25 обробки молекули антитіла IgG протеаза папаїном (наприклад, розщеплення амінокислотного залишку в положенні 224 Н-ланцюга), в якому частина на N-кінці Н-ланцюга є з'єднаною з L-ланцюгом за допомогою дисульфідного зв'язку.

В цілому, F(ab')₂ являє собою фрагмент антитіла, отриманий шляхом розщеплення частини нижче дисульфідного зв'язку в шарнірній ділянці IgG за допомогою ферменту пепсину. Він має молекулярну масу приблизно 100 000, має антигензв'язуючу активність та містить дві ділянки

35 Fab, з'єднані в шарнірному положенні.

В цілому, Fab' являє собою фрагмент антитіла, що має молекулярну масу приблизно 50 000 та має антигензв'язуючу активність, отриманий шляхом розщеплення дисульфідного зв'язку в шарнірній ділянці F(ab')₂, описаної вище.

Крім того, Fab' може бути отриманий шляхом вставки ДНК, що кодує фрагмент Fab', у прокаріотичний або еукаріотичний вектор експресії та введення вектора в прокаріот або еукаріот для експресії Fab'.

40

Термін "одноланцюгове антитіло", "одноланцюговий Fv" або "scFv" означає молекулу, що містить варіабельний домен важкого ланцюга антитіла (або VH) та варіабельний домен легкого ланцюга антитіла (або VL), зв'язані лінкером. Такі scFv молекули можуть мати загальну

45 структуру: NH₂-VL-лінкер-VH-COOH або NH₂-VH-лінкер-HL-COOH. Прийнятні лінкери в попередньому рівні техніки складаються з повторюваних амінокислотних послідовностей GGGGS або їх варіантів, наприклад, 1-4 повторюваних варіантів (Holliger et al. (1993), Proc. Natl Acad. Sci. USA 90:6444-6448). Інші лінкери, які можуть бути використаними в представленому винаході, є описаними Alfthan et al. (1995), Protein Eng. 8:725-731; Choi et al. (2001), Em J. Immunol. 31:94-106; Hu et al. (1996), Cancer Res. 56:3055-3061, Kipriyanov et al. (1999), J. Mol. Biol. 293:41-56; та Roovers et al. (2001), Cancer Immunol.

50

Термін "CDR" стосується однієї з 6 гіперваріабельних ділянок в межах варіабельного домену антитіла, які переважно сприяють зв'язуванню антигену, В цілому, є три CDR (HCDR1, HCDR2 та HCDR3) в кожній варіабельній ділянці важкого ланцюга та три CDR (LCDR1, LCDR2 та LCDR3) в кожній варіабельній ділянці легкого ланцюга. Кордони амінокислотної CDR послідовності можуть бути визначеними з використанням будь-якої з безлічі добре відомих схем. Одне з найпоширеніших визначень 6 CDR є представленим в Kabat E.A. et al., (1991) Sequences of proteins of immunological interest. NIH Publication 91-3242. Визначення CDR за методом Кабата, що використовується в даному документі, застосовується лише до CDR1,

60 CDR2 та CDR3 варіабельного домену легкого ланцюга та до CDR2 та CDR3 варіабельного

домену важкого ланцюга. Також є включеними схема нумерації "Чотія", схема нумерації "ABM", схема нумерації контакт" (дивіться Martin, ACR. Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains[J]. 2001), схема нумерації ImMunoGenTics(IMGt) (Lefranc M.P., Dev. Cотр. Immunol., 27, 55-77(2003)) тощо.

5 Термін "каркас антитіла" стосується частини варіабельного домену VL або VH, який служить каркасом для антигензв'язуючих петель (CDR) варіабельного домену. По суті це варіабельний домен без CDR.

Термін "епітоп" або "антигенна детермінанта" стосується ділянки на антигені, з яким зв'язується імуноглобулін або антитіло. Епітопи, як правило, містять щонайменше 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 9, 10, 11, 12, 13, 14 або 15 суміжних або несуміжних амінокислот в унікальній просторовій конформації, дивіться, наприклад, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G.E.Morris, Ed. (1996).

Терміни "специфічне зв'язування", "селективне зв'язування", "селективно зв'язуватися з" та "специфічно зв'язуватися з" стосується зв'язування антитіла з епітопом на заздалегідь визначеному антигені. Як правило, антитіло зв'язується з афінністю (KD) менше ніж приблизно 10^{-7} M, наприклад, менше ніж приблизно 10^{-8} M, 10^{-9} M або 10^{-10} M або менше. Термін "KD" стосується константи рівноваги дисоціації для взаємодії антитіло-антиген. Як правило, антитіло (або антигензв'язуючий фрагмент) за представленим винаходом, зв'язується з CEA (або його епітопом) з константою рівноваги дисоціації (KD) менше ніж приблизно 10^{-7} M, наприклад, 20 менше ніж приблизно 10^{-8} M або 10^{-9} M; наприклад, значення KD визначають за допомогою способу FACS для афінності антитіла за представленим винаходом, до антигену клітинної поверхні.

Термін "конкурувати" при використанні у випадку, коли антигензв'язуючі протеїни (наприклад, нейтралізуючі антигензв'язуючі протеїни або нейтралізуючі антитіла) конкурують за 25 один й той самий епітоп, стосується конкуренції між антигензв'язуючими протеїнами, аналізованої за допомогою наступного аналізу в якому аналізований антигензв'язуючий протеїн (наприклад, антитіло або його імунологічно функціональний фрагмент) запобігає або інгібує (наприклад, зменшує) специфічне зв'язування еталонного антигензв'язуючого протеїну (наприклад, ліганду або еталонного антитіла) з загальним антигеном (наприклад, антигеном 30 CEA або його фрагментом). Для визначення того, чи конкурує антигензв'язуючий протеїн з іншим, є доступними численні типи аналізів конкурентного зв'язування, такі як твердофазний прямий або непрямий радіоімуний аналіз (PIA), твердофазний прямий або непрямий імуоферментний аналіз (ІФА) та сендвіч-конкурентний аналіз (дивіться, наприклад, Stahl et al., 1983, Methods in Enzymology 9:242-253), твердофазний прямий біотин-авідин ІФА (дивіться, наприклад, Kirkland et al., 1986, J. Immunol. 137:3614-3619), твердофазний аналіз з прямим 35 міченням та твердофазний сендвіч-аналіз з прямим міченням (дивіться, наприклад Harlow and Lane, 1988, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press), твердофазний прямий PIA з міткою 1-125 (дивіться, наприклад, Morel et al., 1988, Molec. Immunol. 25:7-15), твердофазний прямий біотин-авідин ІФА (дивіться, наприклад, Cheung, et al, 1990, Virology 40 176:546-552) та прямий мічений PIA (Moldenhauer et al, 1990, Scand. J. Immunol. 32:77-82). Як правило, аналіз стосується використання очищеного антигену, що зв'язується з твердою поверхнею або клітиною, що несе будь-який з немічених аналізованих антигензв'язуючих протеїнів та мічених еталонних антигензв'язуючих протеїнів. Конкурентне інгібування вимірюють шляхом вимірювання кількості мітки, зв'язаної з твердою поверхнею або клітиною в присутності 45 аналізованого антигензв'язуючого протешу. Як правило, аналізований антигензв'язуючий протеїн є присутнім у надмірній кількості. Антигензв'язуючі протеїни, ідентифіковані за допомогою конкурентного аналізу (конкурентні антигензв'язуючі протеїни), включають: антигензв'язуючий протеїн, що зв'язується з таким самим епітопом, що й еталонний антигензв'язуючий протеїн та антигензв'язуючий протеїн, що зв'язується з сусіднім епітопом 50 досить близько до зв'язуючого епітопу антигензв'язуючого протеїну, та два епітопи просторово інтерферують один з одним для запобігання зв'язуванню. В цілому, коли конкурентний антигензв'язуючий протеїн присутній у надмірній кількості, специфічне зв'язування еталонного антигензв'язуючого протеїну із загальним антигеном інгібуватиметься (наприклад, знижуватись) щонайменше на 4(M5 %, 45-50 %, 50-55 %, 55-60 %, 60-65 %, 65-70 %, 70-75 % або 75 % або 55 більше. В деяких випадках зв'язування інгібується щонайменше на 80-85 %, 85-90 %, 90-95 %, 95-97 % або 97 % або більше.

Термін "молекула нуклеїнової кислоти" стосується молекули ДНК або молекули РНК. Молекула нуклеїнової кислоти може бути одноланцюговою або дволанцюговою, але переважно являє собою дволанцюгову ДНК. Нуклеїнова кислота є "функціонально зв'язаною", коли вона є 60 розміщеною у функціональному взаємозв'язку з іншою послідовністю нуклеїнової кислоти.

Наприклад, промотор або енхансер є функціонально зв'язаним з кодуючою послідовністю, якщо він впливає на транскрипцію кодуючої послідовності.

"Ідентичність" амінокислотної послідовності стосується відсотка амінокислотних залишків, спільних для першої послідовності та другої послідовності, де при вирівнюванні амінокислотних послідовностей вводяться пропуски, якщо це необхідно для досягнення максимальної відсоткової ідентичності послідовності, та будь-яке консервативне заміщення не розглядається як частина ідентичності послідовності. З метою визначення відсоткової ідентичності амінокислотної послідовності, вирівнювання може бути досягнуто різними шляхами, відомими фахівцям у даній галузі техніки, наприклад, з використанням загальнодоступного програмного забезпечення, такого як BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 або програмного забезпечення Megalign (DNASTAR). Спеціалісти в даній галузі техніки можуть визначити параметри, прийнятні для вимірювання вирівнювання, включаючи будь-які алгоритми, необхідні для досягнення максимального вирівнювання повної довжини вирівняних послідовностей.

Термін "вектор експресії" стосується молекули нуклеїнової кислоти, здатної транспортувати іншу нуклеїнову кислоту, з якою вона зв'язана. В одному варіанті здійснення, вектор являє собою "плазмідну", яка стосується кільцевої дволанцюгової петлі ДНК, в яку можуть бути лігвані додаткові сегменти ДНК. В іншому варіанті здійснення, вектор являє собою вірусний вектор, в якому додаткові сегменти ДНК можуть бути лігвані у вірусний геном. Вектори, розкриті в даному документі, є здатними до автономної реплікації в клітині-господарі, в яку вони є введені (наприклад, бактеріальні вектори, що мають бактеріальний початок реплікації, та епісомальні вектори ссавців) або здатні до інтеграції в геном клітини-господаря після введення в клітину-господаря, таким чином, реплікуватися з геномом господаря (наприклад, неепісомальні вектори ссавців).

Способи одержання та очищення антитіл та антигензв'язуючих фрагментів є добре відомими в даній галузі техніки, наприклад, способи, описані в chapters 5-8 and 15 °F Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press. Антигензв'язуючі фрагменти також можуть бути отримані з використанням звичайних способів. Антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, описані в представленому винаході, є генетично сконструйованими таким чином, щоб вони містили одну або більше додаткових FR-ділянок людини в нелюдських ділянках CDR. Послідовності зародкової лінії FR людини можуть бути отримані на сайті <http://imgt.cines.fr> of ImMunoGeneTics (IMGT) або з immunoglobulin journal, Lefranc, G., the Immunoglobulin FactsBook, Academic Press, 2001 ISBN 012441351, шляхом порівняння бази даних генів зародкової лінії варіабельної ділянки з програмним забезпеченням MOE.

Термін "клітина-господар" стосується клітини, в яку був введений вектор експресії. Клітини-господарі можуть включати бактеріальні, мікробні, рослинні або тваринні клітини. Схильні до трансформації бактерії включають представників родини Enterobacteriaceae, таких як штами *Escherichia coli* або *Salmonella*, членів родини Bacillaceae, таких як *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus* та *Haemophilus influenzae*. Прийнятні мікроорганізми включають *Saccharomyces cerevisiae* та *Pichia pastoris*. Прийнятні лінії клітин-господарів тварин включають клітини CHO (лінія клітин яєчника китайського хом'ячка) та клітини NS0.

Сконструйоване антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, за представленим винаходом, можуть бути отримані та очищені з використанням звичайних способів. Наприклад, послідовності кДНК, що кодують важкий та легкий ланцюги, можуть бути клонованими та рекомбінованими у вектор експресії. Вектори експресії рекомбінантних імуноглобулінів можуть бути стабільно трансфіковані в клітини-господарі. Як більш рекомендований попередній рівень техніки, системи експресії ссавців призводитимуть до глікозилування антитіла, особливо на N-кінці сайту Fc-ділянки. Позитивні клони розмножуються в середовищі в біореакторі для отримання антитіл. Культура з секретованим антитілом може бути очищеною за допомогою звичайних методик, наприклад, за допомогою колонки A або G Sepharose FF. Неспецифічно зв'язані фракції вимиваються. Зв'язане антитіло елюють, використовуючи спосіб градієнту pH, фрагменти антитіл виявляють за допомогою SDS-PAGE та збирають. Антитіло може бути відфільтрованим та сконцентрованим з використанням звичайних способів. Розчинні суміші та полімери також можуть бути видаленими за допомогою традиційних способів, таких як молекулярні сита та іонний обмін. Отриманий продукт необхідно негайно заморозити, наприклад, при -70 °C, або ліофілізувати.

Термін "пептид" стосується фрагменту сполуки між амінокислотою та протеїном. Утворюється шляхом з'єднання 2 і більше молекул пептидними зв'язками амінокислот та є структурно-функціональним фрагментом протеїну. Термін "цукор" стосується біомакромолекул, що складаються з елементів C, H та O. Вони можуть бути розділеними на моносахариди, дисахариди, полісахариди тощо.

Термін "алкіл" стосується насиченої аліфатичної вуглеводневої групи, яка являє собою лінійну або розгалужену групу, що містить від 1 до 20 атомів вуглецю, переважно алкіл, що містить від 1 до 12 атомів вуглецю, більш переважно алкіл, що містить від 1 до 10 атомів вуглецю, та найбільш переважно алкіл, що містить від 1 до 6 атомів вуглецю (що містять 1, 2, 3, 4, 5 або 6 атомів вуглецю). Необмежуючі приклади включають метил, етил, н-пропіл, ізопропіл, н-бутил, ізобутил, трет-бутил, втор-бутил, н-пентил, 1,1-диметилпропіл, 1,2-диметилпропіл, 2,2-диметилпропіл, 1-етилпропіл, 2-метилбутил, 3-метилбутил, н-гексил, 1-етил-2-метилпропіл, 1,1,2-триметилпропіл, 1,1-диметилбутил, 1,2-диметилбутил, 2,2-диметилбутил, 1,3-диметилбутил, 2-етилбутил, 2-метилпентил, 3-метилпентил, 4-метилпентил, 2,3-диметилбутил, н-гептил, 2-метилгексил, 3-метилгексил, 4-метилгексил, 5-метилгексил, 2,3-диметилпентил, 2,4-диметилпентил, 2,2-диметилпентил, 3,3-диметилпентил, 2-етилпентил, 3-етилпентил, н-октил, 2,3-диметилгексил, 2,4-диметилгексил, 2,5-диметилгексил, 2,2-диметилгексил, 3,3-диметилгексил, 4,4-диметилгексил, 2-етилгексил, 3-етилгексил, 4-етилгексил, 2-метил-2-етилпентил, 2-метил-3-етилпентил, н-ноніл, 2-метил-2-етилгексил, 2-метил-3-етилгексил, 2,2-диетилпентил, н-децил, 3,3-диетилгексил, 2,2-диетилгексил, та їх різні ізомери бічного ланцюга тощо. Більш переважним є нижчий алкіл, що має від 1 до 6 атомів вуглецю, та необмежуючі приклади включають метил, етил, н-пропіл, ізопропіл, н-бутил, ізобутил, трет-бутил, втор-бутил, н-пентил, 1,1-диметилпропіл, 1,2-диметилпропіл, 2,2-диметилпропіл, 1-етилпропіл, 2-метилбутил, 3-метилбутил, н-гексил, 1-етил-2-метилпропіл, 1,1,2-триметилпропіл, 1,1-диметилбутил, 1,2-диметилбутил, 2,2-диметилбутил, 1,3-диметилбутил, 2-етилбутил, 2-метилпентил, 3-метилпентил, 4-метилпентил, 2,3-диметилбутил тощо. Алкіл може бути заміщеним або незаміщеним. При заміщенні, замісник може бути заміщений в будь-якому доступному місці з'єднання, де замісник переважно являє собою одну або більше з наступних груп незалежно вибраних з групи, що складається з алкілу, алкенілу, алкінілу, алкокси, алкілтію, алкіламіно, галогену, меркапто, гідрокси, нітро, ціано, циклоалкілу, гетероциклоалкілу, арилу, гетероарилу, циклоалкокси, гетероциклоалкокси, циклоалкілтію, гетероциклоалкілтію та оксо.

Термін "гетероалкіл" стосується алкілу, що містить один або більше гетероатомів, що вибрані з групи, що складається з N, O та S, де алкіл є таким, як визначено вище. Термін "алкілен" стосується насиченої лінійної або розгалуженої аліфатичної вуглеводневої групи, що має 2 залишки, отримані з вихідного алкану шляхом видалення двох атомів водню від одного й того самого атома вуглецю або двох різних атомів вуглецю. Це лінійна або розгалужена група, що містить від 1 до 20 атомів вуглецю, переважно алкілен, що містить від 1 до 12 атомів вуглецю, більш переважно алкілен, що містить від 1 до 6 атомів вуглецю (що містить 1, 2, 3, 4, 5 або 6 атомів вуглецю). Необмежуючі приклади алкілену включають, але не обмежуються цим, метилен(-CH₂-), 1,1-етиліден(-CH(CH₃)-), 1,2-етиліден(-CH₂CH₂-), 1,1-пропіліден(-CH(CH₂CH₃)-), 1,2-пропіліден(-CH₂CH(CH₃)-), 1,3-пропіліден(-CH₂CH₂CH₂-), 1,4-бутиліден(-CH₂CH₂CH₂CH₂-), 1,5-бутиліден(-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-) тощо. Алкілен може бути заміщеним або незаміщеним. При заміщенні, замісник може бути заміщений в будь-якому доступному місці з'єднання, де замісник переважно незалежно вибраний з групи, що складається з алкілу, алкенілу, алкінілу, алкокси, алкілтію, алкіламіно, галогену, меркапто, гідрокси, нітро, ціано, циклоалкілу, гетероциклоалкілу, арилу, гетероарилу, циклоалкокси, гетероциклоалкокси, циклоалкілтію, гетероциклоалкілтію та оксо.

Термін "алкокси" стосується -O-(алкілу) та -O-(незаміщеного циклоалкілу), де алкіл або циклоалкіл є таким як визначено вище. Необмежуючі приклади алкокси включають: метокси, етокси, пропокси, бутокси, циклопропілокси, циклобутокси, циклопентилокси та циклогексилокси. Алкокси може бути необов'язково заміщеним або незаміщеним, та при заміщенні, замісник переважно являє собою одну або більше з наступних груп незалежно вибраних з групи, що складається з: алкілу, алкенілу, алкінілу, алкокси, алкілтію, алкіламіно, галогену, меркапто, гідрокси, нітро, ціано, циклоалкілу, гетероциклоалкілу, арилу, гетероарилу, циклоалкокси, гетероциклоалкокси, циклоалкілтію та гетероциклоалкілтію.

Термін "галогеналкіл" стосується алкільної групи, в якій водень є заміщеним одним або більше галогенами, де алкіл є таким, як визначено вище.

Термін "дейтерований алкіл" стосується алкільної групи, в якій водень є заміщеним одним або більше атомами дейтерію, де алкіл є таким, як визначено вище.

Термін "гідроксиалкіл" стосується алкільної групи, в якій водень є заміщеним однією або більше гідрокси групами, де алкіл є таким, як визначено вище.

Термін "гідрокси" стосується групи -OH.

Термін "галоген" стосується фтору, хлору, бромов або йоду.

Термін "аміно" стосується -NH₂.

Термін "нітро" стосується -NO₂.

Термін "ціано" стосується -CN.

Представлений винахід також включає різні дейтеровані форми сполук формули (I).

Кожний доступний атом водню, зв'язаний з атомом вуглецю, може бути незалежно заміщений атомом дейтерію. Спеціалісти в даній галузі техніки можуть синтезувати сполуки формули (I) у дейтерованій формі з посиланням на відповідну літературу.

Комерційно доступні дейтеровані вихідні матеріали можуть бути використаними для отримання дейтерованих форм сполук формули (I), або вони можуть бути синтезованими з використанням звичайних способів з дейтерованими реагентами, включаючи, але не обмежуючись цим, дейтерований боран, тридейтерований боран в тетрагідрофурані, дейтерований алюмогідрид літію, дейтерований йодетан, дейтерований йодметан тощо.

Термін "необов'язковий" або "необов'язково" означає, що подія або обставина, що описані пізніше, можуть, але не обов'язково, мати місце, та що опис включає випадки, коли подія чи обставина відбуваються або не відбуваються. Наприклад, "гетероциклічна група необов'язково заміщена алкілом" означає, що алкіл може бути присутнім, але не обов'язково, та що опис включає випадки, коли гетероциклічна група є заміщеною або не заміщеною алкілом.

Термін "заміщений" означає, що один або більше, переважно до 5, більш переважно 1, 2 або 3 атоми водню в групі є незалежно заміщеними замісниками. Замісник знаходиться лише у своєму можливому хімічному положенні, та спеціалісти в даній галузі зможуть визначити (експериментально або теоретично) можливе чи неможливе заміщення без надмірних зусиль. Наприклад, він може бути нестабільним, коли аміно або гідрокси, що мають вільний водень, зв'язаний з атомом вуглецю, що має ненасичений (наприклад, олефіновий) зв'язок.

Термін "фармацевтична композиція" стосується суміші, що містить одну або більше сполук, описаних у даному документі, або їх фізіологічно/фармацевтично прийнятні солі або проліки, та інші хімічні компоненти, наприклад, фізіологічно/фармацевтично прийнятні носії та ексципієнти. Призначення фармацевтичної композиції полягає в тому, щоб сприяти введенню в організм, що полегшує абсорбцію активного інгредієнта, тим самим виявляючи біологічну активність.

Термін "фармацевтично прийнятна сіль" стосується солі кон'югатів антитіло-лікарський засіб за представленим винаходом, або солі активної сполуки, описаної в представленому винаході. Такі солі є безпечними та ефективними при застосуванні у суб'єкта та мають необхідну біологічну активність. Кон'югат ліганд-лікарський засіб за представленим винаходом, містить щонайменше одну аміногрупу і, таким чином може утворювати сіль з кислотою. Необмежуючі приклади фармацевтично прийнятних солей включають: гідрохлорид, гідробромід, гідродат, сульфат, бісульфат, цитрат, ацетат, сукцинат, аскорбат, оксалат, нітрат, сорбат, гідрофосфат, дигідрофосфат, саліцилат, гідро цитрат, тарtrat, малеат, фумарат, форміат, бензоат, мезилат, етансульфонат, бензолсульфонат та п-толуолсульфонат.

В одному варіанті здійснення представленого винаходу, цитотоксичний препарат є кон'югованим з меркаптогрупою антитіла за допомогою лінкерної одиниці. Навантаження кон'югату ліганд-цитотоксичний препарат може бути контрольоване за наступними необмежуваними способами, включаючи:

- (1) контроль молярного співвідношення зв'язуючого реагенту до моноклонального антитіла,
- (2) контроль часу реакції та температури, та
- (3) вибір різних реагентів.

Для отримання традиційних фармацевтичних композицій робиться посилання на Chinese Pharmacopoeia.

Термін "фармацевтично прийнятний носій" для лікарського засобу за представленим винаходом, стосується системи, яка може змінювати спосіб попадання лікарського засобу в суб'єкт та розподіл лікарського засобу в суб'єкті, контролювати швидкість вивільнення лікарського засобу та доставляти лікарський засіб до цільового органу. Вивільнення носія лікарського засобу та цільової системи, може зменшити деградацію та втрату лікарського засобу, зменшити побічні ефекти та покращити біодоступність. Наприклад, полімерні поверхнево-активні речовини, які можуть бути використані як носії, можуть самозбиратися завдяки своїй унікальній амфифільній структурі з утворенням різних форм агрегатів, таких як міцели, мікроемульсії, гелі, рідкі кристали та везикули, як переважні приклади. Агрегати мають здатність інкапсулювати молекули лікарського засобу та мають гарну проникність для мембран, тому вони можуть бути використані як чудові носії лікарських засобів.

Термін "ексципієнт" являє собою добавку, крім діючої речовини, до фармацевтичної композиції. Його також можна назвати ад'ювантом. Наприклад, зв'язуючі речовини, наповнювачі, розпушувачі, лубриканти в таблетках; основа у напівтвердих мазевих та кремових препаратах; консерванти, антиоксиданти, коригенти, ароматизатори, співрозчинники, емульгатори, солюбілізатори, агенти, що регулюють тоничність, барвники тощо у рідких

формуляціях, всі можуть бути віднесені до ексципієнтів. Термін "розріджувач", також відомий як наповнювач, використовується в першу чергу для збільшення ваги та об'єму таблетки. Додавання розріджувача не лише забезпечує певний об'єм, але також зменшує відхилення дози основних інгредієнтів, покращує пресування лікарського засобу тощо. Коли лікарські засоби в таблетованій формі містять олійні компоненти, обов'язково додають абсорбент для поглинання олійних компонентів, для підтримування "сухого" стану та полегшення приготування таблетки. Приклади включають крохмаль, лактозу, неорганічні солі кальцію, мікрокристалічну целюлозу тощо. Фармацевтична композиція може бути у формі стерильного водного розчину для ін'єкцій. Доступні та прийнятні носії або розчинники включають воду, розчин Рінгера та ізотонічний розчин хлориду натрію. Стерильний розчин для ін'єкцій може бути стерильною мікроемulsionю олія-у-воді для ін'єкцій, в якій активний інгредієнт розчинений в олійній фазі. Наприклад, активний інгредієнт розчиняють у суміші соєвої олії та лецитину. Потім олійний розчин додають до суміші води та гліцерину та обробляють для утворення мікроемulsionі. Ін'єкція або мікроемulsion можуть бути локально введені в кровотік суб'єкта у великих кількостях. Як альтернатива, може бути бажаним вводити розчин та мікроемulsion таким чином, щоб підтримувати постійну циркулюючу концентрації сполуки за представленим винаходом. Для підтримання такої постійної концентрації, може бути використаний безперервний пристрій внутрішньовенної доставки. Прикладом такого пристрою є насос для внутрішньовенних ін'єкцій Deltac CADD-PLUS.TM.5400

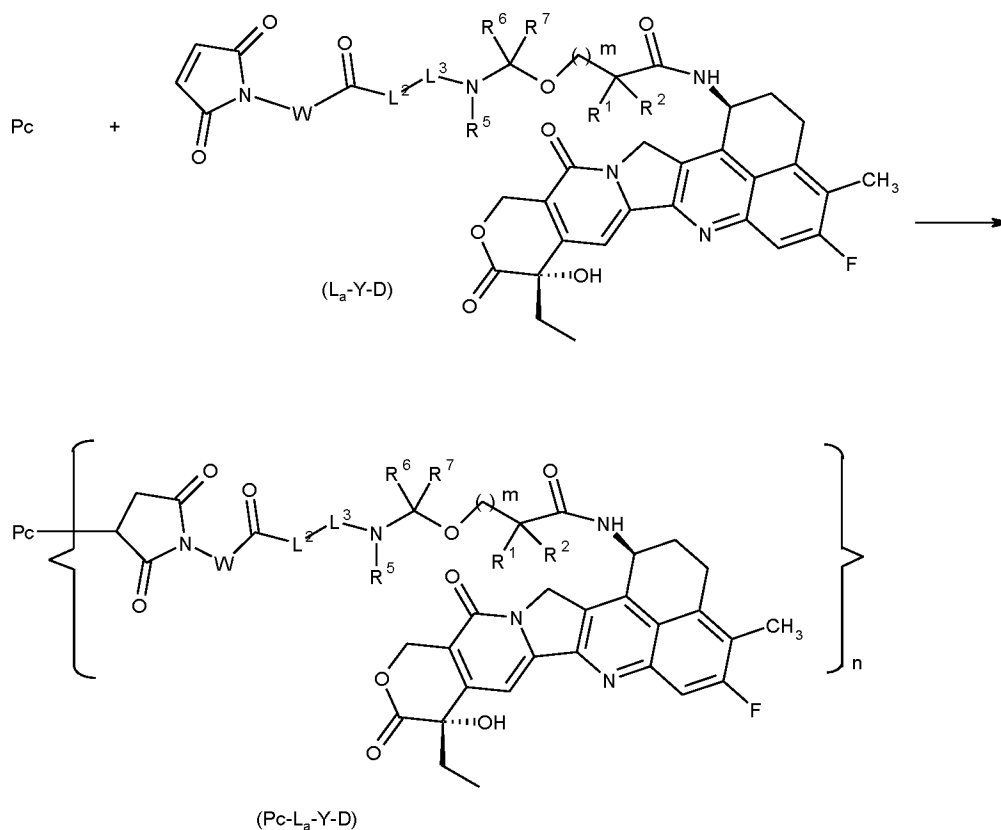
Фармацевтична композиція може бути у формі стерильної ін'єкційної водної або олійної суспензії для внутрішньом'язового та підшкірного введення. Суспензія може бути отримана відповідно до попереднього рівня техніки з використанням згаданих вище відповідних диспергаторів або змочуючих агентів та суспендуючих агентів. Стерильна ін'єкційна композиція також може являти собою стерильну ін'єкцію або суспензію, отриману в прийнятному для парентерального введення нетоксичному розріджувачі або розчиннику, наприклад, розчині, приготованому в 1,3-бутандіолі. Крім того, як розчинник або суспендує середовище, як правило, може бути використаним стерильна нелетка олія. Для зазначеної мети, може бути використаною будь-яка суміш нелетких олій, включаючи синтетичні моногліцериди або дигліцериди. Крім того, жирні кислоти, такі як олеїнова кислота, можуть бути використані при приготуванні ін'єкцій.

Представлений винахід стосується розщеплюваного зв'язуючого плеча з певною структурою, активної речовини з певною структурою та кон'югату антитіло-лікарський засіб (ADC), що складається зі зв'язуючого плеча, активної речовини та антитіла. Такий ADC являє собою комплекс, утворений шляхом зв'язування токсичної речовини з антитілом через спейсер. Кон'югат антитіло-лікарський засіб (ADC) розщеплюється *in vivo* з вивільненням активних молекул, тим самим відіграючи протипухлинну роль.

2. Способи синтезу

Для цілей синтезу прийняті наступні технічні схеми синтезу.

Спосіб отримання сполуки загальної формули (Pc-La-Y-D) включає наступні стадії:



піддавання відновленого Рс та загальної формули (L_a-Y-D) реакції сполучення з отриманням сполуки загальної формули (Pc-L_a-Y-D), де відновлюючий агент переважно являє собою ТСЕР; зокрема, дисульфідні зв'язки в антитілі переважно зменшуються; де:

Рс, W, L², L³, R¹, R², R⁵-R⁷, m та n є такими як визначено в загальній формулі (Pc-L_a-Y-D). Один або більше варіантів здійснення представленого винаходу є детально описаними в описі вище. Хоча будь-які способи та матеріали, аналогічні або ідентичні тим, що описані в даному документі, також можуть бути використані для реалізації або дослідження представленого винаходу, переважні способи та матеріали є описаними нижче. Інші ознаки, об'єкти та переваги представленого винаходу будуть очевидними з опису та формули винаходу. В описі та формулі винаходу, форми однини включають посилання на множину, якщо в контексті явно не зазначено інше. Якщо не зазначено інше, всі технічні та наукові терміни, що використовуються в даному документі мають значення, як правило, зрозумілі спеціалістам в галузі техніки, до якої належить представлений винахід. Всі патенти та публікації, які цитуються в описі, є включеними шляхом посилання. Наступні приклади є представленими для того, щоб більш повно проілюструвати переважні варіанти здійснення представленого винаходу. Зазначені приклади жодним чином не повинні тлумачитися як такі, що обмежують обсяг представленого винаходу, який визначається формулою винаходу.

Приклад 1: Отримання рекомбінантного протеїну CEA та стабільно трансфікованої клітини І. Послідовності рекомбінантного антигену CEA та протеїну CEA, експресовані на поверхні клітини

Амінокислотні послідовності CEA людини з Fc- та His-мітками клонували у вектори експресії клітин ссавців, після експресії та очищення в клітинах 293 Е отримували рекомбінантний протеїн, який потім використовували в дослідженнях наступних прикладів. Тим часом, ген CEA людини без мітки, ген CEACAM1 людини та ген CEA мавпи трансфікували в клітини CHO з утворенням клітинного штаму CHO, що експресує протеїн CEA на поверхні клітин, для подальшого скринінгу та ідентифікації антитіл. Амінокислотні послідовності споріднених протеїнів є наступними:

1. Амінокислотна послідовність CEA-His людини (hCEA-His):

KLTIESTPFNVAEGKEVLLLHVNLPQHLLFGYSWYKGERVDGNRQIIGYVIGTQQATPGPA
 YSGREIYPNASLLIQNIQNDTGfYTLHVIKSDLVNEEATGQFRVYPELPKPSISSNNSKPV
 EDKDAVAFTCEPETQDATYLWWVNNQSLPVSRLQLSNGNRILTILFNVTRNDTASYKCE
 TQNPVSARRSDSVILNVLYGPDAPTISPLNTSYRSGENLNLSCHAASNPPAQYSWFVNGT
 FQQTQELFIPNITVNNSGSYTCQAHNSDTGLNRTTVTTITVYAEPKPFITSNNSNPVEDE
 DAVALTCEPEIQNTTYLWWVNNQSLPVSRLQLSNDNRILTILLSVTRNDVGPYECGIQNE
 LSVDHSDPVILNVLYGPDPTISPSYTYRPGVNLSSLCHAASNPPAQYSWLIDGNIQQHT
 QELFISNITEKNSGLYTCQANNSASGHSRTTVKTITVSAELPKPSISSNNSKPVEDKDAVAF
 TCEPEAQNTTYLWWVNGQSLPVSRLQLSNGNRILTILFNVTRNDARAYVCGIQNSVSAN
 RSDPVTLDVLYGPDPTISPPDSSYLSGANLNLSCHSASNPSPOYSWRINGIPQQHTQVLFI
 AKITPNNNGTYACFVSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAHHHHHHH

(SEQ ID NO: 1)

(SEQ ID NO: 1)

2. Амінокислотна послідовність CEA-Fc людини (hCEA-Fc):

KLTIESTPFNVAEGKEVLLLHVNLPQHLLFGYSWYKGERVDGNRQIIGYVIGTQQATPGPA
 YSGREIYPNASLLIQNIQNDTGfYTLHVIKSDLVNEEATGQFRVYPELPKPSISSNNSKPV
 EDKDAVAFTCEPETQDATYLWWVNNQSLPVSRLQLSNGNRILTILFNVTRNDTASYKCE
 TQNPVSARRSDSVILNVLYGPDAPTISPLNTSYRSGENLNLSCHAASNPPAQYSWFVNGT
 FQQTQELFIPNITVNNSGSYTCQAHNSDTGLNRTTVTTITVYAEPKPFITSNNSNPVEDE
 DAVALTCEPEIQNTTYLWWVNNQSLPVSRLQLSNDNRILTILLSVTRNDVGPYECGIQNE
 LSVDHSDPVILNVLYGPDPTISPSYTYRPGVNLSSLCHAASNPPAQYSWLIDGNIQQHT
 QELFISNITEKNSGLYTCQANNSASGHSRTTVKTITVSAELPKPSISSNNSKPVEDKDAVAF
 TCEPEAQNTTYLWWVNGQSLPVSRLQLSNGNRILTILFNVTRNDARAYVCGIQNSVSAN
 RSDPVTLDVLYGPDPTISPPDSSYLSGANLNLSCHSASNPSPOYSWRINGIPQQHTQVLFI
 AKITPNNNGTYACFVSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAEPKSSDKTHTCPPCPAPEL
 LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
 NSTYRVVSVLTVHLQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK
 NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
 FSCVMHEALHNYHTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 2)

5

3. Амінокислотна послідовність CEA-His яванської макаки (супоCEA-His):

QLTIESRPFNVAEGKEVLLLAHNVSQLNLFYTWYKGERVDASRRIGSCVIRTQQITPGPAH
 SGRETIDFNASLLIQNVTSQSDTGSYTIQVIKEDLVNEEATGQFRVYPELPKPYITSNNSNPI
 EDKDAVALTCEPETQDITYLWWVNNQSLPVSRLQLSSDNRTILTFNIPRNDTTSYKCET
 QNPVSVRRSDPVTILNVLYGPDAPTISPLNTPYRAGEYLNLTCHAASNPTAQYFWFVNGT
 FQQTQELFIPNITVNNSGSYMCQAHNSATGLNRTTVTAITVYAELPKPYITSNNSNPEDK
 DAVTLTCEPETQDITYLWWVNNQRLSVSSRLSNDNRILTILFVNIPRNDTTFYECETQNP
 VSVRRSDPVTILNVLYGPDAPTISPLNTPYRAGENLNLSCHAASNPAQYFWFVNGTFQ
 STQELFIPNITVNNSGSYMCQAHNSATGLNRTTVTAITVYVELPKPYISSNNSNPEDKDA
 VTLTCEPVAENTTYLWWVNNQSLSVSPRLQLSNGNRILTILLSVTRNDTGYPYECGIQNS
 AKRSDPVTILNVTYGPDPTISPPDLRYSGANLNLCHSDSNPSPOYSWLINGTLRQHTQ
 VLFISKITSNNNGAYACFVSNLATGRNNSIVKNISVSSGDSAPGSSGLSAHHHHHHH

(SEQ ID NO: 3)

4. Амінокислотна послідовність CEA людини, експресована на поверхні клітин CHO (hCEA-CHO):

MESPSAPPHRWCPWQRLLLTASLLTFWNPPTAKLTIESTPFNVAEGKEVLLLHVNLPQH
 LFGYSWYKGERVDGNRQIIGYVIGTQQATPGPAYSGREIYPNASLLIQNIQNDTGFTYTLH
 VIKSDLVNEEATGQFRVYPELPKPSISSNNSKPVEDKDAVAFTCEPETQDATYLWWVNNQ
 SLPVSPRLQLSNGNRTLTLFNVTRNDTASYKCETQNPVSARRSDSVILNVLYGPDAPTISP
 LNTSYRSGENLNLSCHAASNPPAQYSWFVNGTFQQSTQELFIPNITVNNSGSYTCQAHNS
 DTGLNRTTVTTITVYAEPPKPFITSNNSNPVEDEDAVALTCEPEIQNTTYLWWVNNQSLPV
 SPRLQLSNDNRTLTLFNVTRNDVGPYECGIQNELSVDHSDPVILNVLYGPDAPTISPSTY
 YRPGVNLSSLCHAASNPPAQYSWLIDGNIQQHTQELFISNITEKNSGLYTCQANNSASGH
 SRTTVKTITVSAELPKPSISSNNSKPVEDKDAVAFTCEPEAQNTTYLWWVNGQSLPVSPR
 LQLSNGNRTLTLFNVTRNDARAYVCGIQNSVSANRSDPVTLDVLYGPDTPHSPDSSYLS
 GANLNLSCHSASNPSQYSWRENGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTYACFVSNLATGRNNSI
 VKSITVSASGTSPGLSAGATVGEMIGVLGVALI

(SEQ ID NO: 4)

5. Амінокислотна послідовність CEA мавпи, експресована на поверхні клітин CHO (супоCEA-CHO):

MEFGLSWLFLVAILKGVQCQLTIESRPFNVAEGKEVLLLAHNVSQNLFGYTWYKGERVD
 ASRRIGSCVIRTQQITPGPAHSGRETIDFNASLLIQNVTSQDTGSIYTIQVIKEDLVNEEATG
 QFRVYPELPKPYITSNNSNPVEDKDAVAFTCEPETQDITTYLWWVNNQSLPVSPRLELSSDN
 RLTIVFNIPRNDTTSYKCETQNPVSVRSDPVTILNVLYGPDAPTISPLNTPYRAGEYLNLT
 CHAASNPTAQYFWFVNGTFQQSTQELFIPNITVNNSGSYMCQAHNSATGLNRTTVTAITV
 YAEPLPKPYITSNNSNPVEDKDAVTLTCEPETQDITTYLWWVNNQRLSVSSRLELSDNRTL
 TVFNIPRNDTTFYECETQNPVSVRSDPVTILNVLYGPDAPTISPLNTPYRAGENLNLSC
 AASNPAQYFWFVNGTFQQSTQELFIPNITVNNSGSYMCQAHNSATGLNRTTVTAITVY
 VELPKPYITSNNSNPVEDKDAVTLTCEPEAENTTYLWWVNNQSLSVSPRLQLSNGNRTL
 LSVTRNDTGYPYECGIQNSAKRSDPVTILNVTYGPDTPHSPDLSYRSGANLNLSCSDS
 NPSPQYSWLNGTLRQHTQVLFISKITSNNNGAYACFVSNLATGRNNSIVKNISVSSGDSA
 PGSSGLSARATVGIIIGMLVGVALM

(SEQ ID NO: 5)

5

6. Амінокислотна послідовність CEACAM1 людини, експресована на поверхні клітин CHO (CEACAM1-CHO):

MGHLSAPLHRVRVPWQGLLLTASLLTFWNPPTAQLTTESMPFNVAEGKEVLLLHVNLP
 QQLFGYSWYKGERVDGNRQIVGYAIGTQQATPGPANSGRETIYPNASLLIQNVTONDTG
 FYTLQVIKSDLVNEEATGQFHVYPELPKPSISSNNSNPVEDKDAVAFTCEPETQDITTYLW
 WNNQSLPVSPRLQLSNGNRTLTLFNVTRNDTGYPYECIENPVSANRSDPVTILNVTYGPD
 TPTISPSDTYYRPGANLSLSCYAASNPPAQYSWLNGTFQQSTQELFIPNITVNNSGSYTCH
 ANNSVTGCRRTTVKTHVTELSPVVAKPQIKASKTTVTGDKDSVNLTCSTNDTGSIWFF
 KNQSLPSSERMKLSQGNNTLSNPVKREDAGTYWCEVFNPIKQNSDPIMLVNLYNALP
 QENGLSPGAIAGIVGVVALVALACFLHFGKTGRASDQDRLTEHKPSVSNHTQDHS
 NDPPNKMNEVTYSTLNFEAQQTQPTSASPSLTATEIYSEVKKQ

(SEQ ID NO: 6)

II. Очищення споріднених протеїнів

1. Очищення протеїну з His-міткою

- 10 Зразок супернатанту експресії клітин центрифугували на високій швидкості видалення
 домішок. Нікелеву колонку врівноважували буфером PBS (pH 7,4), промивали 2-5 об'ємами
 колонки, та зразок супернатанту наносили на колонку Ni Sepharose excel зі швидкістю потоку.
 Колонку промивали буфером PBS до тих під, поки показник A_{280} не знижувався до вихідного
 рівня. Потім хроматографічну колонку промивали PBS+10 mM імідазолу для видалення
 15 неспецифічно зв'язаних домішкових протеїнів та рідину, що витікла збирали. Назавершення,

цільовий протеїн елюювали розчином PBS, що містить 300 мМ імідазолу, та збирали пік елюювання. Зібраний елюат концентрували, та буфер зразка замінювали на PBS розчин за допомогою знесолюючої колонки, для отримання суміші для застосування в наступних дослідженнях.

5 2. Очищення протеїну, що містить Fc, химерне антитіло та гібридомне антитіло

Зразок супернатанту експресії клітин центрифугували при високій швидкості для видалення домішок, рекомбінантний протеїн, що містить Fc, супернатант експресії химерного антитіла очищували з використанням колонки з протеїном А, та супернатант експресії гібридами очищували з використанням колонки з протеїном G. Супернатант наносили на колонку зі швидкістю потоку. Колонку промивали PBS до тих пір, поки показник A280 не знижувався до вихідного рівня. Цільовий протеїн елюювали 100 мМ оцтової кислоти при pH 3,0 та нейтралізували 1 М Трис-HCl при pH 8,0. Елюований зразок концентрували, та буфер зразка замінювали PBS з отриманням суміші, яку ділили на аліквоти для подальшого застосування.

Приклад 2: Отримання мишачого моноклонального анти-CEA антитіла людини

15 1. Імунізація та злиття

Мишей імунізували протеїном hCEA-His та протеїном супо-CEA-His або перехресно імунізували клітинами hCEA-CHO та клітинами супоCEA-CHO. Кількість протеїну для імунізації становила 50 мкг для першої імунізації та 25 мкг для подальших імунізацій, клітинна імунізація становила 107 клітин на імунізацію, та імунізацію проводили один раз кожні два тижні. Після 3-х імунізацій, відбирали кров для визначення активності антитіл в сироватці. Мишей, у яких титр антитіл у сироватці був високим та досягав плато, відбирали для злиття спленоцитів. Лімфоцити селезінки та клітини мієломи, клітини Sp2/0 (ATCC® CRL-8287™) зливали за допомогою процедури злиття, опосередкованої ПЕГ, з отриманням гібридомних клітин. Злиті гібридомні клітини ресуспендували в напівтвердому повному середовищі MC (середовище RPMI-1640, що містить 20 % FBS, 1×HAT, 1×OPI та 2 % метилцелюлози) при щільності $0,5-1 \times 10^6$ клітин/мл, суспензію аліквоти поміщали в чашки для культивування клітин діаметром 35 мм та інкубували при 37 °C з 5 % CO₂ протягом 7-9 днів. На 7-9 день після злиття, залежно від розміру клітинного клону, окремі клітинні клони збирали в 96-лунковий планшет для культивування клітин, додаючи 200 мкл/лунку повного середовища HT (середовище RPMI-1640, що містить 20 % FBS, 1×HT та 1×OPI), культивували при 37 °C з 5 % CO₂ протягом 3 днів, та потім детектували.

2. Скринінг клітин гібридами

Первинний скринінг антитіл проводили на основі імуноферментного аналізу (ІФА) антигенів клітинної поверхні. Клітини наносили на планшет для ІФА (Corning, Cat # 3599) та культивували протягом ночі в інкубаторі при 37 °C. Коли клітини повністю прилипли до стінки та майже заповнювали всю лунку, супернатант видаляли. Клітини один раз промивали PBS, та потім фіксували буфером для фіксації клітин (Beyotime, Cat # P0098) при кімнатній температурі протягом 45 хвилин. Фіксуєний буфер видаляли, планшет промивали 3 рази за допомогою пристрою для промивання планшетів та блокували 5 % сухим знежиреним молоком при 37 °C протягом більше ніж 3 годин. Блокуючий буфер видаляли, та планшет промивали 3 рази за допомогою пристрою для промивання планшетів. Планшет з блокованими клітинами зберігали при -20 °C використовували безпосередньо. При використанні планшета, додавали супернатант культури клітин гібридами, розведеної в градієнті, та інкубували планшет при 37 °C протягом 1 години та промивали 3 рази з використанням пристрою для промивання планшетів. Додавали 100 мкл 10 000-кратно розведеного козиного антимишачого IgG H&L (HRP) вторинного антитіла (Abeam, Cat # ab205719), та планшет інкубували при 37 °C протягом 1 години та промивали 3 рази за допомогою пристрою для промивання планшетів. Додавали 100 мкл TMB (KPL, Cat # 5120-0077) та планшет поміщали на 10 хвилин при 37 °C для прояву забарвлення. Реакцію зупиняли шляхом додавання 100 мкл 1 М сірчаної кислоти та зчитували оптичну густину при 450 нм за допомогою ридера для мікропланшетів. Коли антитіло, що досліджується, зв'язувалося з CEA на клітинній поверхні без конкурентного зв'язування з розчинним CEA (pCEA), антитіло інкубували з pCEA протягом 30 хвилин, та потім додавали в клітинний планшет. Відібрані позитивні клони розмножували, заморожували для збереження посівного матеріалу та субклонували від два до трьох разів до тих пір, поки не отримували одноклітинні клони. Відібрані гібридомні клони додатково отримували та очищували безсироватковою клітинною культурою. Зв'язування отриманого гібридомного антитіла з протеїном CEA на клітинній поверхні визначали за допомогою проточного цитометра (спосіб є наведеним у Прикладі дослідження 1 представленого виноходу), та відбирали штами клітин гібридами з гарною зв'язуючою активністю. Результати визначення зв'язуючої активності моноклональних гібридомних клітинних штамів mAb47, mAb63, mAb67 та mAb103 є наведеними в Таблиці 1:

Таблиця 1

Результати дослідження щодо зв'язування мишачих антитіл СЕА
з протеїнами клітинної поверхні

Антитіла	EC50 (нМ)		
	МКН45	супоСЕА-СНО	СЕАСАМ1-СНО
mAb47	2,10	1,66	Зв'язування відсутнє
mAb63	3,62	2,88	Зв'язування відсутнє
mAb67	1,90	6,00	Зв'язування відсутнє
mAb103	3,94	0,71	Зв'язування відсутнє

3. Секвенування гібридомних антитіл

- Були відібрані моноклональні гібридомні клітинні штами mAb47, mAb63, mAb67 та mAb103, та послідовності моноклональних антитіл були клоновані. Процес клонування відбувався наступним чином: клітини гібридами, що ростуть у логарифмічній фазі, збирали, та РНК екстрагували використовуючи Trizol (Invitrogen, Cat #15596-018) та піддавали зворотній транскрипції кДНК. Після ПЛР-ампліфікації з використанням кДНК як матрицю, кДНК була секвенована компанією, що займається секвенуванням, та амінокислотні послідовності антитіл, що відповідають отриманим послідовностям ДНК, є наведеними в Таблиці 2 нижче:

Таблиця 2

Послідовності варіабельної ділянки мишачих анти-СЕА антитіл

Антитіла	Послідовність варіабельної ділянки VH важкого ланцюга	Послідовність варіабельної ділянки VL легкого ланцюга
mAb47	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYT FTTYGMSWVKQAPGKGLKWMGWINT YSGVPTYADDFKGRFAFSLETSASTAYL QINNLLKNEDTATYFCARRGNYGRWDF DVWGTGTTVTVSS (SEQ ID NO: 7)	EIVLTQSPALMAASPGKEKVTITCSV SSTISSSNLHWYQQKSETSPKPKWIY GTSNLAGSVPVRFSGSGSGTSYSYSLT ISSMEAEDAATYYCQQWSIYPLTF GAGTKLELK (SEQ ID NO: 8)
mAb63	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASG YFTDFYMNWVRQSHGKSLEWIGDIFP KNGNTDYNRKFKDKATLTVDKSSNTV YMEFRSLTLEDSAIYFCARSGYGNVVF DYWGQGTIFTVSS (SEQ ID NO: 9)	DVQMTQTSPALSASLGDRVTISCR TSQDINIYLNWYQQKPDGTVKLLI YYRSGLLSGVPSRFSFGSGSGTDYSL TISNLEPEDIATYFCQQGNTLPPTFG GGTKLEIK (SEQ ID NO: 10)
mAb67	EVQLQQSGPELVKPGASVKIYCKASGY TFTDYHNMWVKQSHGKSLEWIGDINP DIGGTSYNQNFKGKATLTVDKSSSTAY MELRSLTSEDSAVYYCSRWFDSFANW GQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 11)	DIVMTQSPASLAMSGLKRTISCRA SESVSIIGTNLHWYQQKPGQPPKL LIYHASNLETGVPARFSGSGSGADDF TLTIDPVEGDDVALYYCLQSRKIPY TFGGGKMEIK (SEQ ID NO: 12)
mAb103	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYT FTTYGVIWVKQAPGKGLKWMGWINTY SGVPTYADDFKGRFAFSLETSASTAFLQ INNLLKNEDTATYFCARKKTLTTVTPWFA YWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 13)	DLVVTQSSSASFSLGASAKLTCTLS SQHSTYTIIEWYQQPLKPPKYVME LKKDGSHTGDIPTDRFSGSSSGA DRYLTISNIQPEDEAIYICGVGNTIK EQFVYVFGGKTKTVL (SEQ ID NO: 14)

Таблиця 3

Послідовності CDR анти-CEA антитіл

Антитіла	Послідовність CDR важкого ланцюга		Послідовність CDR легкого ланцюга	
mAb47	HCDR1	TYGMS (SEQ ID NO: 15)	LCDR1	SVSSTISSSNLH (SEQ ID NO: 18)
	HCDR2	WINTYSGVPTYADDFKG (SEQ ID NO: 16)	LCDR2	GTSNLAS (SEQ ID NO: 19)
	HCDR3	RGNYGRWDFDV (SEQ ID NO: 17)	LCDR3	QQWSIYPLT (SEQ ID NO: 20)
mAb63	HCDR1	DFYMN (SEQ ID NO: 21)	LCDR1	RTSQDINIYLN (SEQ ID NO: 24)
	HCDR2	DIFPKNGNTDYNRKFKD (SEQ ID NO: 22)	LCDR2	YRSGLLS (SEQ ID NO: 25)
	HCDR3	SGYGNVFDY (SEQ ID NO: 23)	LCDR3	QQGNTLPPT (SEQ ID NO: 26)
mAb67	HCDR1	DYHMN (SEQ ID NO: 27)	LCDR1	RASESVSIIGTNLIH (SEQ ID NO: 30)
	HCDR2	DINPDIGGTSYNQNFKG (SEQ ID NO: 28)	LCDR2	HASNLET (SEQ ID NO: 31)
	HCDR3	WDFDSFAN (SEQ ID NO: 29)	LCDR3	LQSRKIPYT (SEQ ID NO: 32)
mAb103	HCDR1	TYGVI (SEQ ID NO: 33)	LCDR1	TLSSQHSTYTIE (SEQ ID NO: 35)
	HCDR2	WINTYSGVPTYADDFKG (SEQ ID NO: 16)	LCDR2	LKKDGSHTGD (SEQ ID NO: 36)
	HCDR3	KKTLTTVTPWFAY (SEQ ID NO: 34)	LCDR3	GVGNTIKEQFVYV (SEQ ID NO: 37)

Примітка: послідовності CDR антитіл у таблиці були визначені відповідно до системи нумерації Кабата.

4. Отримання химерного антитіла IgG1 людини

Послідовності генів, що кодують варіабельну ділянку, були отримані шляхом ампліфікації та секвенування молекул-кандидатів mAb47, mAb63, mAb67 та mAb103, отриманих шляхом скринінгу гібридом, праймер "голова-хвіст" був сконструйований з використанням послідовностей, отриманих шляхом секвенування, фрагменти генів VH/VK були сконструйовані для кожного антитіла за допомогою ПЛР з використанням секвенованого гену, як матриці та гомологічної рекомбінації з вектором експресії pHr (з сигнальним пептидом та фрагментом гена константної ділянки hlgG/hkappa/hlambda (CHI-Fc/CL)) для конструювання повнорозмірної експресійної плазмиди рекомбінантного химерного антитіла VH-CHI-Fc-pHr/VL-CL-pHr, та для подальшого отримання химерних антитіл Ch47, Ch63, Ch67 та Ch103.

Приклад 3: Гуманізація мишачих моноклональних анти-CEA антитіл людини

Шляхом порівняння бази даних генів зародкової лінії варіабельної ділянки важкого та легкого ланцюга антитіла IMGT людини та програмного забезпечення MOE, як матриці були вибрані гени зародкової лінії варіабельної ділянки важкого та легкого ланцюга з високим ступенем гомології, та CDR мишачого антитіла були прищеплені у відповідні гуманізовані матриці з утворенням послідовності варіабельної ділянки в послідовності FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Амінокислотні залишки CDR антитіл в наступних прикладах були визначені та анотовані за системою нумерації Кабата.

1. Гуманізація мишачого антитіла mAb47

Як матриці були вибрані гени зародкової лінії варіабельних ділянок важкого та легкого ланцюгів з високим ступенем гомології; наприклад, для мишачого антитіла mAb47 як гуманізовані матриці легкого ланцюга були вибрані IGKV6-21*01 та IGKJ2*01, та як гуманізовані матриці важкого ланцюга були вибрані IGHV7-4-1*02 та IGHJ6*01. CDR мишачого антитіла mAb47 були прищеплені у відповідні гуманізовані матриці для гуманізації, та конструкція

гуманізованих зворотних мутацій для мишачого антитіла mAb47 є наведеною в Таблиці 4 нижче:

Таблиця 4

Конструкція гуманізації для мишачого антитіла mAb47

Варіабельна ділянка легкого ланцюга гуманізованого антитіла mAb47		Варіабельна ділянка важкого ланцюга гуманізованого антитіла mAb47	
h47VL1	Прищеплені (IGKV6-21*01+IGKJ2*01)	h47VH1	Прищеплені (IGHV7-4-1*02+IGHJ6*01)
h47VL2	Прищеплені (IGKV6-21*01+IGKJ2*01)+L 46P, K49Y, F71Y	h47VH2	Прищеплені (IGHV7-4-1*02+IGHJ6*01)+E46K
h47VL3	Прищеплені (IGKV6-21*01+IGKJ2*01)+L 46P, L47W, K49Y, F71Y	h47VH3	Прищеплені (IGHV7-4-1*02+IGHJ6*01)+R38K, E46K
h47VL4	Прищеплені (IGKV6-21*01+IGKJ2*01)+L 46P, L47W, K49Y, D70S, F71Y	h47VH4	Прищеплені (IGHV7-4-1*02+IGHJ6*01)+R38K, E46K

Примітка: положення амінокислот у таблиці пронумеровані із застосуванням системи нумерації Кабата; наприклад, L46P означає, що L у положенні 46 мутує у зворотному напрямку до P, відповідно до системи нумерації Кабата; "Прищеплені" означає, що CDR мишачих антитіл прищеплені до послідовностей ділянки FR зародкової лінії людини. Крім того, мутацію D61S додатково вводили у варіабельну ділянку важкого ланцюга h47VH3 (тобто, вводили амінокислотну мутацію в антитіло HCDR2 так, що послідовність антитіла HCDR2 була змінена з WINTYSGVPTYADDFKG (SEQ ID NO: 16) на WINTYSGVPTYASDFKG (SEQ ID NO: 38)) для отримання варіабельної ділянки важкого ланцюга h47VH4 зі збереженням гарної активності антитіла.

- 5 Специфічні послідовності гуманізованого мишачого антитіла mAb47 є наведеними в Таблиці 5:

Таблиця 5

Послідовності варіабельної ділянки гуманізованого мишачого антитіла mAb47

Варіабельна ділянка №	Послідовності варіабельної ділянки гуманізованого антитіла mAb47
h47VH1	EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYFTFTYGM ^{SV} VRQAPGQGLEWMGWI NTYSGVPTYADDFKGRFVFS ^{LD} TSVSTAYLQISS ^{LA} EDTAVYYCARRGNYGR WDFDVWGQGTTTVTVSS (SEQ ID NO: 39)
h47VH2	EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYFTFTYGM ^{SV} VRQAPGQGLKWMGWI NTYSGVPTYADDFKGRFVFS ^{LD} TSVSTAYLQISS ^{LA} EDTAVYYCARRGNYGR WDFDVWGQGTTTVTVSS (SEQ ID NO: 40)
h47VH3	EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYFTFTYGM ^{SV} VKQAPGQGLKWMGWI NTYSGVPTYADDFKGRFVFS ^{LD} TSVSTAYLQISS ^{LA} EDTAVYYCARRGNYGR WDFDVWGQGTTTVTVSS (SEQ ID NO: 41)
h47VH4	EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYFTFTYGM ^{SV} VKQAPGQGLKWMGWI NTYSGVPTYASDFKGRFVFS ^{LD} TSVSTAYLQISS ^{LA} EDTAVYYCARRGNYGR WDFDVWGQGTTTVTVSS (SEQ ID NO: 42)
h47VL1	EIVLTQSPDFQS ^{VT} PKEKVTITCSVSSTISS ^{NL} HWYQQKPDQSPKLLIKGTSNL ^A SGVPSRFS ^{GS} SGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQ ^{WS} IYPLTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 43)
h47VL2	EIVLTQSPDFQS ^{VT} PKEKVTITCSVSSTISS ^{NL} HWYQQKPDQSPKPLIYGTSNL ^A SGVPSRFS ^{GS} SGSGTDYTLTINSLEAEDAATYYCQ ^{WS} IYPLTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 44)
h47VL3	EIVLTQSPDFQS ^{VT} PKEKVTITCSVSSTISS ^{NL} HWYQQKPDQSPK ^{PW} IYGTSNL ^A ASGVPSRFS ^{GS} SGSGTDYTLTINSLEAEDAATYYCQ ^{WS} IYPLTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 45)
h47VL4	EIVLTQSPDFQS ^{VT} PKEKVTITCSVSSTISS ^{NL} HWYQQKPDQSPK ^{PW} IYGTSNL ^A ASGVPSRFS ^{GS} SGSGTSYTLTINSLEAEDAATYYCQ ^{WS} IYPLTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 46)

Примітка: ділянки CDR (визначені за системою нумерації Кабата) є підкресленими в таблиці, та сайти мутацій є виділеними жирним курсивом.

2. Гуманізація мишачого антитіла mAb63

Як матриці були вибрані гени зародкової лінії варіабельних ділянок важкого та легкого ланцюгів з високим ступенем гомології; наприклад, для мишачого антитіла mAb63, як гуманізовані матриці легкого ланцюга були вибрані IGKV 1-39*01 та IGKJ4*01, та як гуманізовані матриці важкого ланцюга були вибрані IGHV1-46*01 та IGHJ1*01. CDR мишачого антитіла mAb63 були прищеплені у відповідні гуманізовані матриці для гуманізації, та конструкція гуманізованих зворотних мутацій для мишачого антитіла mAb63 є наведеною в Таблиці 6 нижче:

10

Таблиця 6

Конструкція гуманізації для мишачого антитіла mAb63

Варіабельна ділянка легкого ланцюга гуманізованого антитіла mAb63		Варіабельна ділянка важкого ланцюга гуманізованого антитіла mAb63	
h63VL1	Прищеплені (IGKVI-39*01+IGKJ4*01)	h63VH1	Прищеплені (IGHV1-46*01+IGHJ1*01)
h63VL2	Прищеплені (IGKVI-39*01+IGKJ4*01)+I2V, F71Y	h63VH2	Прищеплені (ЮHV1-46*01+IGHJ1 *01)+M69L, R71V, T73K
h63VL3	Прищеплені (IGKVI-39*01+IGKJ4*01)+I2V, K42G, P44V, F71Y	h63VH3	Прищеплені (IGHV1-46*01+IGHJ1*01)+M48I, V67A, M69L, R71V, T73K, L82F
		h63VH4	Прищеплені (IGHV1-46*01+IGHJ1 *01)+M48I, R66K, V67A, M69L, R71V, T73K, L82F, S 82A R

Примітка: положення амінокислот у таблиці пронумеровані із застосуванням системи нумерації Кабата; наприклад, S82AR означає, що S у положенні 82A мутує у зворотному напрямку до R, відповідно до системи нумерації Кабата; "Прищеплені" означає, що CDR мишачих антитіл прищеплені до послідовностей ділянки FR зародкової лінії людини. Крім того, мутацію N54S додатково вводили у варіабельну ділянку важкого ланцюга h63VH1 (тобто, вводили амінокислотну мутацію в антитіло HCDR2 так, що послідовність антитіла HCDR2 була змінена з DIFPKNGNTDYNRKFKD (SEQ ID NO: 22) на DIFPKSGNTDYNRKFKD (SEQ ID NO: 47)) для отримання варіабельної ділянки важкого ланцюга h63VH5 зі збереженням гарної активності антитіла.

Специфічні послідовності гуманізованого та мutowаного мишачого антитіла mAb63 є наведеними у Таблиці 7:

Таблиця 7

Послідовності варіабельної ділянки гуманізованого мишачого антитіла mAb63

Варіабельна ділянка №	Послідовності варіабельної ділянки гуманізованого антитіла mAb63
h63VH1	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDFYMNWVRQAPGQGLEWMGDIFP KNGNTDYNRKFKDRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDТАVYYCARSГYGNVFD YWGGQTLTVSS (SEQ ID NO: 48)
h63VH2	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDFYMNWVRQAPGQGLEWMGDIFP KNGNTDYNRKFKDRVTLTVDKSTSTVYMESSLRSEDТАVYYCARSГYGNVFD YWGGQTLTVSS (SEQ ID NO: 49)
h63VH3	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDFYMNWVRQAPGQGLEWIGDIFP KNGNTDYNRKFKDRATLTVDKSTSTVYMEFSSLRSEDТАVYYCARSГYGNVFD YWGGQTLTVSS (SEQ ID NO: 50)
h63VH4	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDFYMNWVRQAPGQGLEWIGDIFP KNGNTDYNRKFKDKATLTVDKSTSTVYMEFRSLRSEDТАVYYCARSГYGNVFD YWGGQTLTVSS (SEQ ID NO: 51)
h63VH5	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDFYMNWVRQAPGQGLEWMGDIFP KSGNTDYNRKFKDRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDТАVYYCARSГYGNVFD YWGGQTLTVSS (SEQ ID NO: 52)
h63VL1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSQDINIYLNWYQQKPGKAPKLLIYYRSGLLS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 53)
h63V L2	DVQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSQDINIYLNWYQQKPGKAPKLLIYYRSGLLS GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 54)
h63VL3	DVQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSQDINIYLNWYQQKPGGAVKLLIYYRSGLLS GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 55)

Примітка: ділянки CDR (визначені за системою нумерації Кабата) є підкресленими в таблиці, та сайти мутацій є виділеними жирним курсивом.

3. Гуманізація мишачого антитіла mAb67

Як матриці були вибрані гени зародкової лінії варіабельних ділянок важкого та легкого ланцюгів з високим ступенем гомології; наприклад, для мишачого антитіла mAb67, як гуманізовані матриці легкого ланцюга були вибрані IGKV4-1*01 та IGKJ4*01, IGKV3-15*01 та IGKJ4*01, або IGKV1-39*01 та IGKJ4*01, та як гуманізовані матриці важкого ланцюга були вибрані IGHV1-3*01 та IGHJ1*01, або IGHV5-51*01 та IGHJ1*01. CDR мишачого антитіла mAb67 були прищеплені у відповідні гуманізовані матриці для гуманізації, та конструкція гуманізованих зворотних мутацій для мишачого антитіла mAb67 є наведеною в Таблиці 8 нижче:

10

Таблиця 8

Конструкція гуманізації для мишачого антитіла mAb67

Варіабельна ділянка легкого ланцюга гуманізованого антитіла mAb67		Варіабельна ділянка важкого ланцюга гуманізованого антитіла mAb67	
h67VL1	Прищеплені (IGKV4-1*01+IGKJ4*01)	h67VH1	Прищеплені (IGHV1-3*01+IGHJ1*01)
h67VL2	Прищеплені (IGKV3-15*01+IGKJ4*01)	h67VH2	Прищеплені (IGHV5-51*01+IGHJ1*01)
h67VL3	Прищеплені (IGKV3-15*01+IGKJ4*01)+A43P, I58V	h67VH3	Прищеплені (IGH V5-51 *01+IGH J 1*01)+R3 8K, Q66K, A71V
h67VL4	Прищеплені (IGKVI-39*01+IGKJ4*01)		
h67VL5	Прищеплені (IGKVI-39*01+IGKJ4*01)+Q3V, A43P		

Примітка: положення амінокислот у таблиці пронумеровані із застосуванням системи нумерації Кабата; наприклад, A43P означає, що А у положенні 43 мутує у зворотному напрямку до Р, відповідно до системи нумерації Кабата; "Прищеплені" означає, що CDR мишачих антитіл прищеплені до послідовностей ділянки FR зародкової лінії людини.

Специфічні послідовності гуманізованого мишачого антитіла mAb67 є наведеними у Таблиці 9:

Таблиця 9

Послідовності варіабельної ділянки гуманізованого мишачого антитіла mAb67

Варіабельна ділянка №	Послідовності варіабельної ділянки гуманізованого антитіла mAb67
h67VH1	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYHMNWWVRQAPGQRL EWMGDINPDIGGTSYNQNFKGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDNAV YYCARWDFDSFANWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 56)
h67VH2	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYHMNWWVRQMPGKGLE WMGDINPDIGGTSYNQNFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAM YYCARWDFDSFANWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 57)
h67VH3	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYHMNWWKQMPGKGLE WMGDINPDIGGTSYNQNFKGKVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTAM YYCARWDFDSFANWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 58)
h67VLI	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVSIIGTNLIHWYQQKPGQPPK LLIYHASNLETGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCLQSRKI PYTFGGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 59)
h67VL2	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASESVSIIGTNLIHWYQQKPGQAPR LLIYHASNLETGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCLQSRKIPY TFGGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 60)
h67VL3	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASESVSIIGTNLIHWYQQKPGQPPRL LIYHASNLETGVPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCLQSRKIPY TFGGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 61)
h67VL4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVSIIGTNLIHWYQQKPGKAPK LLIYHASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQSRKIP YTFGGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 62)
h67VL5	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVSIIGTNLIHWYQQKPGKPPK LLIYHASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQSRKIP YTFGGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 63)

Примітка: ділянки CDR (визначені за системою нумерації Кабата) є підкресленими в таблиці, та сайти мутацій є виділеними жирним курсивом.

4. Гуманізація мишачого антитіла mAb103

5 Як матриці були вибрані гени зародкової лінії варіабельних ділянок важкого та легкого ланцюгів з високим ступенем гомології; наприклад, для мишачого антитіла mAb103, як гуманізовані матриці легкого ланцюга були вибрані IGLV4-69*01 та IGLJ2*01, та як гуманізовані матриці важкого ланцюга були вибрані IGHV7-4-1*02 та IGHJ1*01. CDR мишачого антитіла mAb103 були прищеплені у відповідні гуманізовані матриці для гуманізації, та конструкція гуманізованих зворотних мутацій для мишачого антитіла mAb103 є наведеною в Таблиці 10 нижче:

Таблиця 10

Конструкція гуманізації для мишачого антитіла mAb103

Варіабельна ділянка легкого ланцюга гуманізованого антитіла mAb103		Варіабельна ділянка важкого ланцюга гуманізованого антитіла mAb67	
h103VL1	Прищеплені (IGLV4-69*01+IGLJ2*01)+K49E	h103VH1	Прищеплені (IGHV7-4-1*02+IGHJ1*01)
h103VL2	Прищеплені (IGLV4-69*01+IGLJ2*01)+H36Y, K49E	h103VH2	Прищеплені (IGHV7-4-1*02+IGHJ1*01)+R38K, E46K
h103VL3	Прищеплені (IGLV4-69*01+IGLJ2*01)+H36Y, L47V, K49E	H103VH3	Прищеплені (IGHV7-4-1*02+IGHJ1*01)+V2I, R38K, E46K
h103VL4	Прищеплені (IGLV4-69*01+IGLJ2*01)+L4V, H36Y, L47V, K49E		
h103VL5	Прищеплені (IGLV4-69*01+IGLJ2*01)+H36Y, G43P, L47V, K49E, Y87I		
h103VL6	Прищеплені (IGLV4-69*01+IGLJ2*01)+L4V, H36Y, G43P, L47V, K49E, Y87I		
h103VL7	Прищеплені (IGLV4-69*01+IGLJ2*01)+L4V, H36Y, G43P, L47V, K49E, E70D, Y87I		

Примітка: положення амінокислот у таблиці пронумеровані із застосуванням системи нумерації Кабата, наприклад, K49E означає, що K в положенні 49 мутує в зворотному напрямку до E, відповідно до системи нумерації Кабата; "Прищеплені" означає, що CDR мишачих антитіл прищеплені до послідовностей ділянки FR зародкової лінії людини.

10

Крім того, мутацію D61S додатково вводили у важкий ланцюг h103VH1 (тобто, вводили амінокислотну мутацію в антитіло HCDR2 так, що послідовність антитіла HCDR2 була змінена з WINTYSGVPTYADDFKG (SEQ ID NO: 16) на WINTYSGVPTYASDFKG (SEQ ID NO: 38)); та мутація D56E була введена у легкий ланцюг h103VL3 (тобто, вводили амінокислотну мутацію в антитіло LCDR2 так, що послідовність антитіла LCDR2 була змінена з LKKDGSHTGD (SEQ ID NO: 36) на LKKDGSHTGE (SEQ ID NO: 64)), зі збереженням гарної активності антитіла.

15

Специфічні послідовності гуманізованого мишачого антитіла mAb103 є наведеними у Таблиці 11:

Таблиця 11
Послідовності варіабельної ділянки гуманізованого мишачого антитіла mAb103

Варіабельна ділянка №	Послідовності варіабельної ділянки гуманізованого антитіла mAb103
h103VH1	EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYFTFTYGVIWVRQAPGQGLE WMGWINTYSGVPTYADDFKGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAV YYCARKKTLTTVTPWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 65)
h103VH2	EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYFTFTYGVIWVKQAPGQGLK WMGWINTYSGVPTYADDFKGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAV YYCARKKTLTTVTPWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 66)
h103VH3	EIQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYFTFTYGVIWVKQAPGQGLKW MGWINTYSGVPTYADDFKGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYY CARKKTLTTVTPWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 67)
h103VH4	EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYFTFTYGVIWVRQAPGQGLE WMGWINTYSGVPTYASDFKGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCARKKTLTTVTPWFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 68)
h103VL1	ELVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSQHSTYTIIEWHQQQPEKGPRLM ELKKDGSHTGDGIPDRFSGSSSGAERYLTISLQSEDEADYYCGVGN TIKEQFVYVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 69)
h103VL2	ELVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSQHSTYTIIEWYQQQPEKGPRLM ELKKDGSHTGDGIPDRFSGSSSGAERYLTISLQSEDEADYYCGVGN TIKEQFVYVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 70)
h103VL3	ELVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSQHSTYTIIEWYQQQPEKGPRLM ELKKDGSHTGDGIPDRFSGSSSGAERYLTISLQSEDEADYYCGVGN TIKEQFVYVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 71)
h103VL4	ELVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSQHSTYTIIEWYQQQPEKGPRLM ELKKDGSHTGDGIPDRFSGSSSGAERYLTISLQSEDEADYYCGVGN TIKEQFVYVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 72)
h103VL5	ELVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSQHSTYTIIEWYQQQPEKPPRYVM ELKKDGSHTGDGIPDRFSGSSSGAERYLTISLQSEDEADYICGVGNT IKEQFVYVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 73)
h103VL6	ELVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSQHSTYTIIEWYQQQPEKPPRYVM ELKKDGSHTGDGIPDRFSGSSSGAERYLTISLQSEDEADYICGVGNT IKEQFVYVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 74)
h103VL7	ELVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSQHSTYTIIEWYQQQPEKPPRYVM ELKKDGSHTGDGIPDRFSGSSSGADRYLTISLQSEDEADYICGVGNT IKEQFVYVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 75)
h103VL8	ELVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSQHSTYTIIEWYQQQPEKGPRLM ELKKDGSHTGEGIPDRFSGSSSGAERYLTISLQSEDEADYYCGVGN 45 TIKEQFVYVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 76)

Примітка: ділянки CDR (визначені за системою нумерації Кабата) є підкресленими в таблиці, та сайти мутацій є виділеними жирним курсивом.

5. Отримання гуманізованих антитіл

- Вектори експресії легкого ланцюга та важкого ланцюга антитіла були сконструйовані відповідним чином; комбінацію перехресного спарювання проводили на легкому ланцюгу та важкому ланцюзі гуманізованого антитіла, культуральний супернатант збирали та очищували після трансфекції клітин 293E з отриманням повнорозмірного гуманізованого антитіла. Константна ділянка важкого ланцюга гуманізованого антитіла може бути вибрана з групи, що складається з константних ділянок IgG1, IgG2, IgG3 та IgG4, та їх варіантів; ілюстративно, константна ділянка важкого ланцюга IgG1 людини (як представлено у SEQ ID NO: 77) була поєднана з вищезазначеною гуманізованою варіабельною ділянкою важкого ланцюга з утворенням повнорозмірного важкого ланцюга антитіла. Константна ділянка легкого ланцюга гуманізованого антитіла може бути вибрана з групи, що складається з константних ділянок ланцюгів κ та λ людини або їх варіантів; ілюстративно, константна ділянка легкого ланцюга κ

людини (як представлено у SEQ ID NO: 78) або константна ділянка легкого ланцюга λ людини (як представлено у SEQ ID NO: 79) була поєднана з вищезазначеною гуманізованою варіабельною ділянкою легкого ланцюга з утворенням повнорозмірного легкого ланцюга антитіла. Послідовності константної ділянки типових антитіл є наступними: Константна ділянка важкого ланцюга IgG1 людини:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 77

Константна ділянка легкого ланцюга κ -ланцюга людини:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDDSTYLSLSLTFLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 78

Константна ділянка легкого ланцюга λ -ланцюга людини:

GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSK
QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

SEQ ID NO: 79

Ілюстративно, вищезазначена варіабельна ділянка важкого ланцюга гуманізованого антитіла, отриманого з mAb47, як наведено в Таблиці 5, була приєднана до аміно-кінця константної ділянки важкого ланцюга IgG1 людини, що має послідовність представлену в SEQ ID NO: 77, з утворенням повнорозмірного важкого ланцюга антитіла та варіабельна ділянка легкого ланцюга гуманізованого антитіла, як наведено в Таблиці 5, була приєднана до аміно-кінця константної ділянки легкого ланцюга κ людини, що має послідовність представлену в SEQ ID NO: 78, з утворенням повнорозмірного легкого ланцюга антитіла, що призводить до ряду гуманізованих антитіл mAb47, наведених у Таблиці 12 нижче:

Таблиця 12

Гуманізовані антитіла mAb47

VL	VH	h47VH1	h47VH2	h47VH3	h47VH4
h47VL1		Hu47-1	Hu47-5	Hu47-9	Hu47-13
h47VL2		Hu47-2	Hu47-6	Hu47-10	Hu47-14
h47VL3		Hu47-3	Hu47-7	Hu47-11	Hu47-15
h47VL4		Hu47-4	Hu47-8	Hu47-12	Hu47-16

Примітка: в таблиці, наприклад, "Hu47-14" означає, що варіабельна ділянка легкого ланцюга гуманізованого антитіла під номером Hu47-14 являє собою h47VL2, та варіабельна ділянка важкого ланцюга являє собою h47VH4; та послідовність константної ділянки важкого ланцюга є представленою в SEQ ID NO: 77, та послідовність константної ділянки легкого ланцюга є представленою в SEQ ID NO: 78.

Ілюстративно, вищезазначена варіабельна ділянка важкого ланцюга гуманізованого антитіла, отриманого з mAb63, як наведено в Таблиці 7, була приєднана до аміно-кінця константної ділянки важкого ланцюга IgG1 людини, що має послідовність представлену в SEQ ID NO: 77, з утворенням повнорозмірного важкого ланцюга антитіла та варіабельна ділянка легкого ланцюга гуманізованого антитіла, як наведено в Таблиці 7, була приєднана до аміно-кінця константної ділянки легкого ланцюга κ людини, що має послідовність представлену в SEQ ID

NO: 78, з утворенням повнорозмірного легкого ланцюга антитіла, що призводить до ряду гуманізованих антитіл mAb63 наведених в Таблиці 13 нижче:

Таблиця 13

Гуманізовані антитіла mAb63

VL	VH	h63VH1	h63VH2	h63VH3	h63VH4	h63VH5
h63VL1		Hu63-1	Hu63-4	Hu63-7	Hu63-10	Hu63-13
h63VL2		Hu63-2	Hu63-5	Hu63-8	Hu63-11	Hu63-14
h63VL3		Hu63-3	Hu63-6	Hu63-9	Hu63-12	Hu63-15

Примітка: в таблиці, наприклад, "Hu63-13" означає, що варіабельна ділянка легкого ланцюга гуманізованого антитіла під номером Hu63-13 являє собою h63VL1, та варіабельна ділянка важкого ланцюга являє собою h63VH5; та послідовність константної ділянки важкого ланцюга є представленою в SEQ ID NO: 77, та послідовність константної ділянки легкого ланцюга є представленою в SEQ ID NO: 78.

- 5 Ілюстративно, вищезазначена варіабельна ділянка важкого ланцюга гуманізованого антитіла, отриманого з mAb67, як наведено в Таблиці 9, була приєднана до аміно-кінця константної ділянки важкого ланцюга IgG1 людини, що має послідовність представлену в SEQ ID NO: 77, з утворенням повнорозмірного важкого ланцюга антитіла та варіабельна ділянка легкого ланцюга гуманізованого антитіла, як наведено в Таблиці 9, була приєднана до аміно-кінця константної ділянки легкого ланцюга к людини, що має послідовність представлену в SEQ ID
- 10 NO: 78, з утворенням повнорозмірного легкого ланцюга антитіла, що призводить до ряду гуманізованих антитіл mAb67 наведених в Таблиці 14 нижче:

Таблиця 14

Гуманізовані антитіла mAb67

VL	VH	h67VH1	h67VH2	h67VH3
h67VL1		Hu67-1	Hu67-6	Hu67-11
h67VL2		Hu67-2	Hu67-7	Hu67-12
h67VL3		Hu67-3	Hu67-8	Hu67-13
h67VL4		Hu67-4	Hu67-9	Hu67-14
h67VL5		Hu67-5	Hu67-10	Hu67-15

Примітка: в таблиці, наприклад, "Hu67-14" означає, що варіабельна ділянка легкого ланцюга гуманізованого антитіла під номером Hu67-14 являє собою h67VL4, та варіабельна ділянка важкого ланцюга являє собою h67VH3; та послідовність константної ділянки важкого ланцюга є представленою в SEQ ID NO: 77, та послідовність константної ділянки легкого ланцюга є представленою в SEQ ID NO: 78.

- 15 Ілюстративно, вищезазначена варіабельна ділянка важкого ланцюга гуманізованого антитіла, отриманого з mAb103, як наведено в Таблиці 11, була приєднана до аміно-кінця константної ділянки важкого ланцюга IgG1 людини, що має послідовність представлену в SEQ ID NO: 77, з утворенням повнорозмірного важкого ланцюга антитіла та варіабельна ділянка легкого ланцюга гуманізованого антитіла, як наведено в Таблиці 11, була приєднана до аміно-кінця константної ділянки легкого ланцюга λ людини, що має послідовність представлену в SEQ
- 20 ID NO: 79, з утворенням повнорозмірного легкого ланцюга антитіла, що призводить до ряду гуманізованих антитіл mAb103 наведених в Таблиці 15 нижче:

Таблиця 15

Гуманізовані антитіла mAb103

VL	VH	h103VH1	h103VH2	h103VH3	h103VH4
h103VLI		Hu103-1	Hu103-9	Hu103-17	Hu103-25
h103VL2		Hu103-2	Hu103-10	Hu103-18	Hu103-26
h103VL3		Hu103-3	Hu103-11	Hu103-19	Hu103-27
h103VL4		Hu103-4	Hu103-12	Hu103-20	Hu103-28
h103VL5		Hu103-5	Hu103-13	Hu103-21	Hu103-29
h103VL6		Hu103-6	Hu103-14	Hu103-22	Hu103-30
h103VL7		Hu103-7	Hu103-15	Hu103-23	Hu103-31
h103VL8		Hu103-8	Hu103-16	Hu103-24	Hu103-32

Примітка: в таблиці, наприклад, "Hu103-32" означає, що варіабельна ділянка легкого ланцюга гуманізованого антитіла під номером Hu103-32 являє собою h103VL8, та варіабельна ділянка важкого ланцюга являє собою h103VH4; та послідовність константної ділянки важкого ланцюга є представленою в SEQ ID NO: 77, та послідовність константної ділянки легкого ланцюга є представленою в SEQ ID NO: 79.

Ілюстративно, повнорозмірні послідовності легкого/важкого ланцюга гуманізованих антитіл є наведеними в Таблиці 16 нижче:

Послідовності легкого та важкого ланцюга гуманізованих антитіл

Антитіло	Послідовність важкого ланцюга	Послідовність легкого ланцюга
Hu63-13	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF TDFYMNWVRQAPGQGLEWMGDIFFPKSGN TDYNRKFKDRVTMTTRDTSTSTVYMESSL RSEDTAVYYCARSGYGYNYVFDYWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQINSTYRVV SVLTIVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL LVKGFYPSDLAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD DSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFPSCSVMH EALHNHTTQKSLSLSPGK SEQ ID NO: 80	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRTSQDINLYLNWY QQKPGKAPKLLIYYRSGL LSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQG NTLPPTFGGGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGT SVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVTACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC SEQ ID NO: 81
Hu47-14	EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTF TTYGMSWVKQAPGQGLKWMGWENTYSG VPTYASDFKGRFVPSLDTSVSTAYLQISSLK AEDTAVYYCARRGNVGRWDFDVWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQINSTYRVV SVLTIVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL LVKGFYPSDLAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD DSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFPSCSVMH EALHNHTTQKSLSLSPGK SEQ ID NO: 82	EIVLTQSPDFQSVTPKEKV TITCSVSSTISSNLHWYQ QKPDQSPKPLIYGTSLNA SGVPSRFSGSGSGTDYTL TINSLEAEDAATYYCQQ WSTYPLTFGGQGTKLEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVTACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC SEQ ID NO: 83
Hu67-14	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT DYHNMWVKQMPFGKGLEWMGDINPDIGG TSYNQNFKGKVTISVDKSISTAYLQWSSLK ASDTAMYYCARWDFDSFANWGQGTIVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL FSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVTVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQINSTYRVVSV LTIVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL LVKGFYPSDLAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFPSCSVMH EALHNHTTQKSLSLSPGK SEQ ID NO: 84	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASESVSIIGTNLIH WYQQKPGKAPKLLIYHA SNLETGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYC LQSRKIPYTFGGGTKVEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASIVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSSTYSLSSTLTLS KADYEKHKVTACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC SEQ ID NO: 85

Hu103-32	EVQLVQSGSEELKKFGASVKVSCKASGYTF TTYGVWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGV PTYASDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKA EDTAVYYCARKKTLTTVTPWFAYWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KYDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTIVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL LVKGFYPSSDIKAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MH EALHNHYTQKSLSLSPGK SEQ ID NO: 86	ELVLTQSPSASASLGASV KLTCTLSSQHSITYIEWY QQQPEKGPRIYVMELEKDD GSHSTGEGIPDRFSGSSSG AERYLTISSLSQSEDEADY YCGVGNTIKEQFVYVFG GGTKLTVLGOPKANPTVT LFPPSSSEELQANKATLVCL ISDFYPGAVTVAWKADGSPV KAGVEITKPSKQSNMKYAA SSYLSLTPEQWKSRRSTSC QVTHEGSTVEKTVAPTECS SEQ ID NO: 87
----------	--	---

Примітка: в таблиці послідовності константної ділянки виділені курсивом, та послідовності варіабельної ділянки позначені вертикальними літерами.

На даний час, відомі дві молекули ADC-мішені CEA це SAR-408701 та лабетузамаб говітекан (також відомий як Lmab-CL2A-SN38), в яких послідовності легкого та важкого ланцюгів антитіл є наступними

Послідовність важкого ланцюга антитіла в SAR-408701 (Sanofi):

EVQLQESGPGGLVKPGGSLSLSCAASGFVTFSSYDMSWVRQTPERGLEWVAYISSGGGITYA
PSTVKGRFTVSRDNAKNTLYLQMNSLTSEDTAVYYCAAHYFGSSGPFAYWGQGTLVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKYDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTIVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSSDIKAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 88

Послідовність легкого ланцюга антитіла в SAR-408701 (Sanofi для скорочення)

DIQMTQSPASLSASVGDRTTTCRASENFISYLAWYQQKPGKSPKLLVYNTRITLAEGVPS
RFGSGSGGTDFSLTISSLPEDFATYYCQHHYGTPTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLS
KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 89

5

Послідовність важкого ланцюга антитіла Лабетузамаб в Lmab-CL2A-SN38 (Lmab для скорочення)

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFDFTTYWMSWVRQAPGKGLEWIGEHPDSSTIN
YAPSLKDRFTISRDNKNTLFLQMDSLRPEDTGVYFCASLYFGFPWFAYWGQGTPTVTS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 90

Послідовність легкого ланцюга Лабетузумабу в Lmab-CL2A-SN38 (Lmab)
DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGTSVAWYQQKPKGKAPKLLIYWTSTRHTGVPS
RFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIAITYYCQQYSLYRSFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 91

- 5 Вищезазначені антитіла були клоновані, експресовані та очищені за допомогою звичайних способів клонування генів та рекомбінантної експресії.

Приклад 4: Отримання сполук

- Експериментальні процедури без умов, зазначених в прикладах за представленим винаходом, як правило, проводять відповідно до стандартних умов або відповідно до умов, рекомендованих виробником вихідних матеріалів або комерційних продуктів. Реагенти без зазначення походження є комерційно доступними стандартними реагентами.

- 10 Структура сполук була визначеною за допомогою ядерного магнітного резонансу (ЯМР) або мас-спектрометрії (МС). Спектри ЯМР були вимірними з використанням приладу для ядерного магнітного резонансу Bruker AVANCE-400 з дейтерованим диметилсульфоксидом (DMSO-d₆), дейтерованим хлороформом (CDCl₃) та дейтерованим метанолом (CD₃OD) як розчинники та тетраметилсиланом (ТМ) як внутрішній стандарт.

15 Хімічні зсуви дані в одиницях 10⁻⁶ (м.ч.).

Аналіз МС проводили з використанням мас-спектрометра FINNIGAN LCQAd (ESI) (виробник: Thermo, модель: Finnigan LCQ advantage MAX).

- 20 Аналіз UPLC проводили з використанням системи рідинної хромато-мас-спектрометрії Waters Acquity UPLC SQD.

Аналіз BEPX проводили з використанням рідинного хроматографа високого тиску Agilent 1200DAD (хроматографічна колонка 150×4,6 мм Sunfire C18) та рідинного хроматографа високого тиску Waters 2695-2996 (хроматографічна колонка 150×4,6 мм Gemini C18).

- 25 Аналіз УФ-BEPX проводили з використанням ультрафіолетового спектрофотометра Thermo nanodrop2000. Швидкість інгібування проліферації та значення IC₅₀ вимірювали за допомогою пристрою для зчитування мікропланшетів PHERA starFS (БМГ, Німеччина)

Силікагелеві пластини Huanghai HSGF254 або Qingdao GF254 зі специфікаціями від 0,15 мм до 0,2 мм були прийняті для аналізу тонкошарової хроматографії (ТШХ) та від 0,4 мм до 0,5 мм для розділення та очищення за допомогою ТШХ.

- 30 Силікагель Yantai Yellow Sea розміром 200-300 меш, як правило, використовується як носій у колонковій хроматографії.

Відомі вихідні матеріали за представленим винаходом можуть бути синтезовані з використанням або відповідно до способів, відомих в даній галузі, або можуть бути придбані у ABCR GmbH & Co.KG, Acros Organics, Aldrich Chemical Company, Accela ChemBio Inc, Chembee Chemicals тощо.

- 35 В прикладах, реакції проводили в атмосфері аргону або азоту, якщо не зазначено інше.

Атмосфера аргону або азоту означає, що реакційна колба є з'єднаною з балоном, що містить приблизно 1 л аргону або азоту.

- 40 Атмосфера водню означає, що реакційна колба є з'єднаною з балоном, що містить приблизно 1 л водню.

Гідрогенізатор Parr 3916EKX, гідрогенізатор Qinglan QL-500 або гідрогенізатор HC2-SS використовували для реакцій гідрування під тиском.

Реакція гідрування, як правило, включала 3 цикли вакуумування та продування воднем.

Для мікрохвильової реакції використовували мікрохвильовий реактор CEM Discover-S908860.

В прикладах, розчин реакції стосується водного розчину, якщо не зазначено інше.

В прикладах, температура реакції являє собою кімнатну температуру, якщо не зазначено
5 інше.

Кімнатна температура являє собою оптимальну температуру реакції, яка коливається від 20 °C до 30 °C.

Отримання буферу PBS з pH 6,5 в прикладах: в колбу додавали 8,5 г KH_2PO_4 , 8,56 г $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 5,85 г NaCl та 1,5 г ЕДТА, та об'єм доводили до 2 л. Всі добавки розчиняли
10 ультразвуком, та розчин добре перемішували шляхом струшування з отриманням бажаного буферу.

Система елюенту для колонкової хроматографії та система проявляючого розчинника для тонкошарової хроматографії, що використовуються для очищення сполук, включають: А: систему дихлорметану та ізопропанолу, В: систему дихлорметану та метанолу та С: систему
15 петролейного ефіру та етилацетату. Об'ємне співвідношення розчинників регулювали відповідно до полярності сполуку або шляхом додавання невеликої кількості триетиламіну та кислотного або основного реагенту.

Деякі зі сполук представленого винаходу характеризуються за допомогою Q-TOF LC/MS.

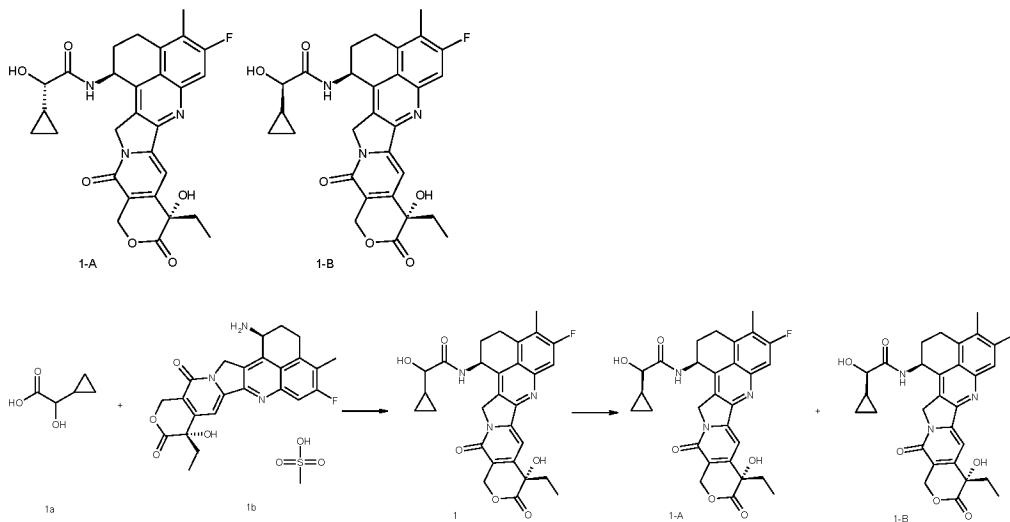
В аналізі Q-TOF LC/MS використовували квадрупольний часпролітний мас-спектрометр
20 Agilent 6530 з точним визначенням маси та надвисокоєфективний рідинний хроматограф Agilent 1290-Infinity (хроматографічна колонка Agilent Poroshell 300SB-C8 5 мкм, 2,1×75 мм).

Лікарська частина Y-D кон'югату антитіло-лікарський засіб за представленим винаходом, є описаною в PCT/CN2019/107873, та синтез та випробування відповідних сполук є включеними в даний документ шляхом посилання. Необмежуючі приклади синтезу є включеними як
25 посилання наступним чином:

1. Синтез токсинних лікарських засобів за представленим винаходом

(S)-2-циклопропіл-N-((1S,9S)-9-етил-5-фтор-9-гідрокси-4-метил-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагідро-1H,12H-бензо[де]пірано[3',4':6,7]індолізино[1,2-b]хінолін-1-іл)-2-гідроксиацетамід 1-A

(R)-2-циклопропіл-N-((1S,9S)-9-етил-5-фтор-9-гідрокси-4-метил-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагідро-1H,12H-бензо[де]пірано[3',4':6,7]індолізино[1,2-b]хінолін-1-іл)-2-гідроксиацетамід 1-B
30



35

До 1b (4 мг, 7,53 мкмоль) додавали 2 мл етанолу та 0,4 мл N,N-диметилформаміду. Систему тричі продували аргонем, та суміш охолоджували до 0-5 °C на бані крига-вода, з подальшим додаванням по краплях 0,3 мл N-метилморфоліну. Реакційну суміш перемішували, поки вона не ставала прозорою. До реакційної суміші послідовно додавали 2-циклопропіл-2-гідроксиацетову
40 кислоту 1a (2,3 мг, 19,8 мкмоль, отримана, як описано в заявці на патент "WO2013106717"), 1-гідроксибензотриазол (3 мг, 22,4 мкмоль) та 1-(3-диметиламінопропіл)-3-етилкарбодііміду гідрохлорид (4,3 мг, 22,4 мкмоль). Після додавання, реакційну суміш перемішували при 0-5 °C протягом 1 год. Баню крига-вода видаляли, реакційну суміш нагрівали до 30 °C, перемішували протягом 2 годин та концентрували при зниженому тиску. Отриману неочищену сполуку 1
45 очищували за допомогою високоєфективної рідинної хроматографії (умови розділення: хроматографічна колонка: XBridge Prep C18 OBD 5 мкм 19×250 мм; рухома фаза: А-вода (10

ммоль NH_4OAc), В-ацетонітрил, градієнтне елюювання, швидкість потоку: 1мл/хв.), та відповідні фракції збирали та концентрували при зниженому тиску з отриманням названого продукту (1-А: 1,5 мг, 1-В: 1,5 мг).

МС m/z (ESI): 534.0 $[M+1]$.

Однокомпонентна сполука 1-В (більш короткий час утримання)

Аналіз UPLC: час утримання: 1,06 хв.; чистота: 88 % (хроматографічна колонка: ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 мкм 2,1×50 мм; рухома фаза: А-вода (5 ммоль NH_4OAc), В-ацетонітрил).

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6): δ 8,37 (д, 1H), 7,76 (д, 1H), 7,30 (с, 1H), 6,51 (с, 1H), 5,58-5,56 (м, 1H), 5,48 (д, 1H), 5,41 (с, 2H), 5,32-5,29 (м, 2H), 3,60 (т, 1H), 3,19-3,13 (м, 1H), 2,38 (с, 3H), 2,20-2,14 (м, 1H), 1,98 (кв, 2H), 1,87-1,83 (м, 1H), 1,50-1,40 (м, 1H), 1,34-1,28 (м, 1H), 0,86 (т, 3H), 0,50-0,39 (м, 4H).

Однокомпонентна сполука 1-А (більш довший час утримання)

Аналіз UPLC: час утримання: 1,10 хв.; чистота: 86 % (хроматографічна колонка: ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 мкм 2,1×50 мм; рухома фаза: А-вода (5 ммоль NH_4OAc), В-ацетонітрил).

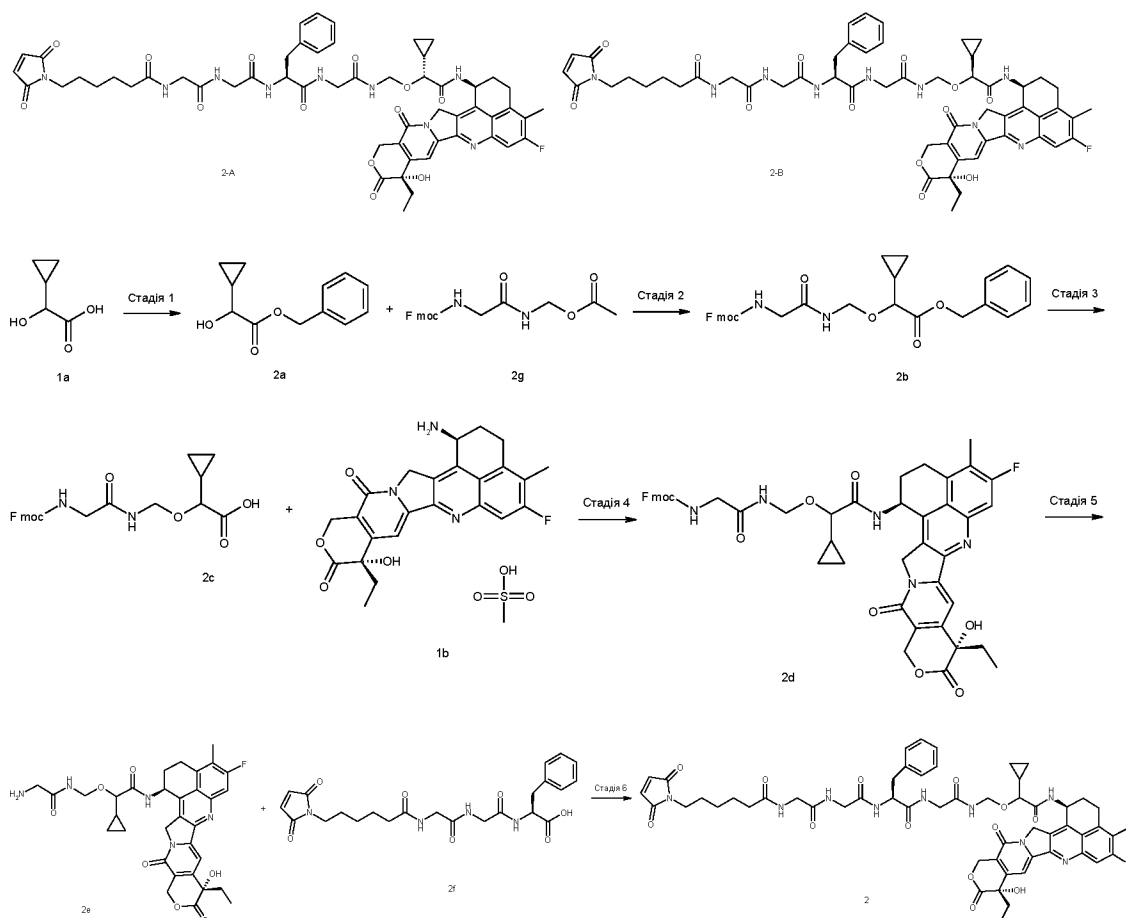
^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6): δ 8,35 (д, 1H), 7,78 (д, 1H), 7,31 (с, 1H), 6,52 (с, 1H), 5,58-5,53 (м, 1H), 5,42 (с, 2H), 5,37 (д, 1H), 5,32 (т, 1H), 3,62 (т, 1H), 3,20-3,15 (м, 2H), 2,40 (с, 3H), 2,25-2,16 (м, 1H), 1,98 (кв, 2H), 1,87-1,82 (м, 1H), 1,50-1,40 (м, 1H), 1,21-1,14 (м, 1H), 0,87 (т, 3H), 0,47-0,35 (м, 4H).

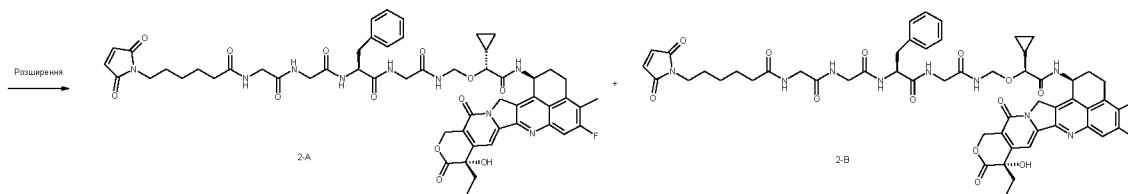
2. Синтез лікарських засобів лінкерного токсину за представленим винаходом N-((2R,10S)-10-бензил-2-циклопропіл-1-(((1S,9S)-9-етил-5-фтор-9-гідрокси-4-метил-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагідро-1H,12H-бензо[де]пірано[3',4':6,7]індолізино[1,2-6]хінолін-1-іл)аміно)-1,6,9,12,15-пентаоксо-3-окса-5,8,11,14-тетраазагексадекан-16-іл)-6-(2,5-диоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)гексанамід 2-А

N-((2S,10S)-10-бензил-2-циклопропіл-1-(((1S,9S)-9-етил-5-фтор-9-гідрокси-4-метил-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагідро-1H,12H-бензо[де]пірано[3',4':6,7]індолізино[1,2-6]хінолін-1-іл)аміно)-1,6,9,12,15-пентаоксо-3-окса-5,8,11,14-тетраазагексадекан-16-іл)-6-(2,5-диоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)гексанамід 2-В

Стадія 1

Бензил 2-циклопропіл-2-гідроксиацетат 2a





1а (1,3 г, 11,2 ммоль; отримана, як описано в заявці на патент "WO2013/106717") розчиняли у 50 мл ацетонітрилу, та послідовно додавали карбонат калію (6,18 г, 44,8 ммоль), бензилбромід (1,33 мл, 11,2 ммоль) та йодид тетрабутиламонію (413 мг, 1,1 ммоль). Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 48 год. та фільтрували через целіт, та осад на фільтрі промивали етилацетатом (10 мл). Фільтрати об'єднували та концентрували при зниженому тиску, та отриманий залишок очищували за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі з проявляючою системою розчинників С отримавши названий продукт 2а (2 г, вихід 86,9 %).

Стадія 2

Бензил

10-циклопропіл-1-(9Н-флуорен-9-іл)-3,6-диоксо-2,9-диокса-4,7-діазаундекан-11-оат 2b

До реакційної колби додавали 2а (120,9 мг, 0,586 ммоль) 2g (180 мг, 0,489 ммоль, отримана, як описано в заявці на патент "CN105829346A"), та додавали 4 мл тетрагідрофурану. Систему тричі продували аргонном, та реакційну суміш охолоджували на бані крига-вода до 0-5 °С, з подальшим додаванням трет-бутоксиду калію (109 мг, 0,98 ммоль). Крижану баню видаляли та реакційну суміш нагрівали до кімнатної температури та перемішували протягом 40 хв., потім додавали 10 мл крижаної води та екстагували етилацетатом (20 мл×2) та хлороформом (10 мл×5). Органічні фази об'єднували та концентрували. Отриманий залишок розчиняли в 4 мл діоксану та додавали 2 мл води, бікарбонат натрію (49,2 мг, 0,586 ммоль) та 9-флуоренілметилхлорформіат (126 мг, 0,49 ммоль). Суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 2 год. Додавали 20 мл води, з подальшою екстракцією етилацетатом (10 мл×3). Органічну фазу промивали насиченим розчином хлориду натрію (20 мл), сушили над безводним сульфатом натрію та фільтрували. Фільтрат концентрували при зниженому тиску. Отриманий залишок очищували за допомогою колонкової хроматографії на силікагелі з проявляючою системою розчинників С отримуючи названий продукт 2b (48 мг, вихід 19 %).

MCm/z(ESI): 515,0 [M+1].

Стадія 3

10-Циклопропіл-1Н-(9Н-флуорен-9-іл)-3,6-диоксо-2,9-диокса-4,7-діазаундекан-11-ова кислота 2c

2b (20 мг, 0,038 ммоль) розчиняли в 4,5 мл суміші розчинників тетрагідрофурану та етилацетату (об.юб.=2:1) та додавали паладій-на-вугіллі (12 мг, 10 % завантаження, суха основа). Систему тричі продували воднем, та реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 1 год. Реакційну суміш фільтрували через целіт та осад на фільтрі промивали етилацетатом. Фільтрат концентрували з одержанням неочищеного названого продукту 2c (13 мг), який безпосередньо використовували на наступній стадії без очищення. MCm/z(ESI): 424,9 [M+1].

Стадія 4

(9Н-флуорен-9-іл)метил(2-(((1-циклопропіл-2-(((1S,9S)-9-етил-5-фтор-9-гідрокси-4-метил-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагідро-1Н,12Н-бензо[де]пірано[3',4':6,7]індолізино[1,2-6]інолін-1-іл)аміно)-2-оксоетокси)метил)аміно)-2-оксоетил)карбамат 2d

1b (10 мг, 18,8 мкмоль) додавали до реакційної колби, та додавали 1 мл N,N-диметилформаміду. Систему тричі продували аргонном, та суміш охолоджували на бані крига-вода до 0-5 °С, з подальшим додаванням по краплям триетиламіні, неочищеного 5c (13 мг, 30,6 мкмоль), та хлориду 4-(4,6-диметокси-1,3,5-триазин-2-іл)-4-метилморфолінія (16,9 мг, 61,2 мкмоль). Реакційну суміш перемішували на крижаній бані протягом 40 хв. Додавали 10 мл води з подальшим екстрагуванням етилацетатом (10 мл×3). Органічні фази об'єднували, промивали насиченим розчином натрію хлориду (10 мл×2), сушили над безводним сульфатом натрію та фільтрували. Фільтрат концентрували при зниженому тиску. Отриманий залишок очищували за допомогою тонкошарової хроматографії з проявляючою системою розчинників В з отриманням названого продукту 2d (19 мг, вихід 73,6 %). MC m/z (ESI): 842,1 [M+1].

Стадія 5

2-((2-Аміноацетамідо)метокси)-2-циклопропіл-N-((1S,9S)-9-етил-5-фтор-9-гідрокси-4-метил-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагідро-1H,12H-бензо[де]пірано[3',4':6,7]індолізіно [1,2-b] хінолін-1-іл)ацетамід 2e

2d (19 мг, 22,6 мкмоль) розчиняли у 2 мл дихлорметану, та додавали 1 мл диетиламіну. Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 2 год. та концентрували при зниженому тиску. Додавали 1 мл толуолу, з подальшою концентрацією при зниженому тиску; процедури повторювали двічі. Залишок суспендували з 3 мл н-гексану та залишали відстоюватись. Потім, супернатант видаляли, та тверда речовина була збережена. Твердий залишок концентрували при зниженому тиску та висушували за допомогою масляного насоса з отриманням неочищеного названого продукту 2e (17 мг), який безпосередньо використовували на наступній стадії без очищення. MS m/z (ESI): 638,0 [M+18].

Стадія 6

N-((2R,10S)-10-бензил-2-циклопропіл-1-(((15,9S)-9-етил-5-фтор-9-гідрокси-4-метил-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагідро-1H,12H-бензо[де]пірано[3',4':6,7]індолізіно[1,2-6]хінолін-1-іл)аміно)-1,6,9,12,15-пентаоксо-3-окса-5,8,11,14-тетраазагексадекан-16-іл)-6-(2,5-диоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)гексанамід 2-A

N-((2S,10S)-10-бензил-2-циклопропіл-1-(((15,9S)-9-етил-5-фтор-9-гідрокси-4-метил-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагідро-1H,12H-бензо[де]пірано[3',4':6,7]індолізіно[1,2-6]хінолін-1-іл)аміно)-1,6,9,12,15-пентаоксо-3-окса-5,8,11,14-тетраазагексадекан-16-іл)-6-(2,5-диоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)гексанамід 2-B

Неочищений 2e (13,9 мг, 22,4 мкмоль) розчиняли у 0,6 мл N,N-диметил формам іду. Систему тричі продували аргонном, та розчин охолоджували на бані крига-вода до 0-5 °C. Розчин 2f (21,2 мг, 44,8 мкмоль, отриманий, як описано в заявці на патент "EP2907824") додавали у 0,3 мл N,N-диметил формам іду, з подальшим додаванням хлориду 4-(4,6-диметокси-1,3,5-триазин-2-іл)-4-метилморфолін (18,5 мг, 67,3 мкмоль). Реакційну суміш перемішували на крижаній бані протягом 10 хв. Потім крижану баню видаляли та реакційну суміш нагрівали до кімнатної температури та перемішували протягом 1 год. Отримуючи сполуку 2. Реакційну суміш очищували за допомогою вискоєфективної рідинної хроматографії (умови розділення: хроматографічна колонка: XBridge Prep C18 OBD 5 мкм 19×250 мм; рухома фаза: А-вода (10 ммоль NH₄OAc), В-ацетонитрил, градієнт елювання, швидкість потоку: 18 мл/хв.). відповідні фракції збирали та концентрували при зниженому тиску з отриманням названого продукту (2-A: 2,4 мг, 2-B: 1,7 мг).

MS m/z (ESI): 1074,4 [M+1].

Однокомпонентна сполука 2-A (більш короткий час утримання):

Аналіз UPLC: час утримання: 1.14 хв.; чистота: 85 % (хроматографічна колонка: ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 мкм 2,1×50 мм; рухома фаза: А-вода (5 ммоль NH₄OAc), В-ацетонитрил).

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): δ 8,60 (т, 1H), 8,51-8,49 (д, 1H), 8,32-8,24 (м, 1H), 8,13-8,02 (м, 2H), 8,02-7,96 (м, 1H), 7,82-7,75 (м, 1H), 7,31 (с, 1H), 7,26-7,15 (м, 4H), 6,99 (с, 1H), 6,55-6,48 (м, 1H), 5,65-5,54 (м, 1H), 5,41 (с, 2H), 5,35-5,15 (м, 3H), 4,74-4,62 (м, 1H), 4,54-4,40 (м, 2H), 3,76-3,64 (м, 4H), 3,62-3,48 (м, 2H), 3,20-3,07 (м, 2H), 3,04-2,94 (м, 1H), 2,80-2,62 (м, 12H), 2,45-2,30 (м, 3H), 2,25-2,15 (м, 2H), 2,15-2,04 (м, 2H), 1,93-1,78 (м, 2H), 1,52-1,39 (м, 3H), 1,34-1,12 (м, 5H), 0,87 (т, 3H), 0,64-0,38 (м, 4H).

Однокомпонентна сполука 2-B (більш довший час утримання):

Аналіз UPLC: час утримання: 1,16 хв.; чистота: 89 % (хроматографічна колонка: ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 мкм 2,1×50 мм; рухома фаза: А-вода (5 ммоль NH₄OAc), В-ацетонитрил).

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): δ 8,68-8,60 (м, 1H), 8,58-8,50 (м, 1H), 8,32-8,24 (м, 1H), 8,13-8,02 (м, 2H), 8,02-7,94 (м, 1H), 7,82-7,75 (м, 1H), 7,31 (с, 1H), 7,26-7,13 (м, 3H), 6,99 (с, 1H), 6,55-6,48 (м, 1H), 5,60-5,50 (м, 1H), 5,41 (с, 2H), 5,35-5,15 (м, 2H), 4,78-4,68 (м, 1H), 4,60-4,40 (м, 2H), 3,76-3,58 (м, 4H), 3,58-3,48 (м, 1H), 3,20-3,10 (м, 2H), 3,08-2,97 (м, 2H), 2,80-2,72 (м, 2H), 2,45-2,30 (м, 3H), 2,25-2,13 (м, 2H), 2,13-2,04 (м, 2H), 2,03-1,94 (м, 2H), 1,91-1,78 (м, 2H), 1,52-1,39 (м, 3H), 1,34-1,12 (м, 4H), 0,91-0,79 (м, 3H), 0,53-0,34 (м, 4H).

Приклад 5: Отримання кон'югату антитіло-лікарський засіб (ADC)

Аналіз навантаження лікарського засобу базового розчину ADC Мета та принцип дослідження

Базовий розчин ADC являє собою лікарський засіб, перехресно зшитий з антитілом, та механізм лікування захворювань з його допомогою полягає в транспортуванні молекул токсину в клітини, в залежності від здатності антитіла націлювати дію з метою знищення клітин. Навантаження лікарського засобу відіграє вирішальну роль в ефективності лікарського засобу.

Навантаження лікарського засобу базового розчину ADC визначали з використанням УФ-способу. Процедури дослідження

Кювети, що містять натрій-сукцинатний буфер, поміщали в еталонну лунку та лунку для зразка та віднімали оптичну щільність холостого розчину. Потім кювету, що містить досліджуваний розчин, поміщали в лунку для зразка та визначали оптичну щільність при 280 нм та 370 нм.

Розрахунок результатів: здатність до навантаження базового розчину ADC визначали за допомогою ультрафіолетової спектрофотометрії (прилад: ультрафіолетовий спектрофотометр Thermo nanodrop2000), виходячи з принципу, згідно з яким загальна оптична щільність базового розчину ADC при певній довжині хвилі являє собою суму значень оптичної щільності лікарського засобу та моноклонального антитіла на зазначеній довжині хвилі, а саме:

$$(1) A_{280 \text{ нм}} = \varepsilon_{\text{mAb-280}} b L / \text{mab} + \varepsilon_{\text{лікарський засіб-280}} b C_{\text{лікарський засіб}}$$

$\varepsilon_{\text{лікарський засіб-280}}$: середній молярний коефіцієнт екстинкції лікарського засобу при 280 нм становить 5100;

$C_{\text{лікарський засіб}}$: концентрація лікарського засобу;

$\varepsilon_{\text{mAb-280}}$: середній молярний коефіцієнт екстинкції базового розчину моноклонального антитіла при 280 нм становить 214,600;

C_{mab} : концентрація базового розчину моноклонального антитіла;

b : довжина оптичного шляху становить 1 см.

Подібним чином, рівняння для загальної оптичної щільності зразка при 370 нм може бути представлене як:

$$(2) A_{370 \text{ нм}} = \varepsilon_{\text{mAb-370}} b d_{\text{mab}} + \varepsilon_{\text{лікарський засіб-370}} b C_{\text{лікарський засіб}}$$

$\varepsilon_{\text{лікарський засіб-370}}$: середній молярний коефіцієнт екстинкції лікарського засобу при 370 нм становив 19,000;

$C_{\text{лікарський засіб}}$: концентрація лікарського засобу;

$\varepsilon_{\text{mAb-370}}$: молярний коефіцієнт екстинкції базового розчину моноклонального антитіла при 370 нм становить 0;

C_{mAb} : концентрація базового розчину моноклонального антитіла;

b : довжина оптичного шляху становить 1 см.

Навантаження лікарського засобу може бути розрахованим, використовуючи обидва рівняння (1) та (2), та також коефіцієнти екстинкції моноклонального антитіла та лікарського засобу при обох довжинах хвиль та їх концентраціях.

Навантаження лікарського засобу = $C_{\text{лікарський засіб}} / C_{\text{mab}}$.

1. Отримання кон'югату антитіло-лікарський засіб (ADC) за представленим винаходом

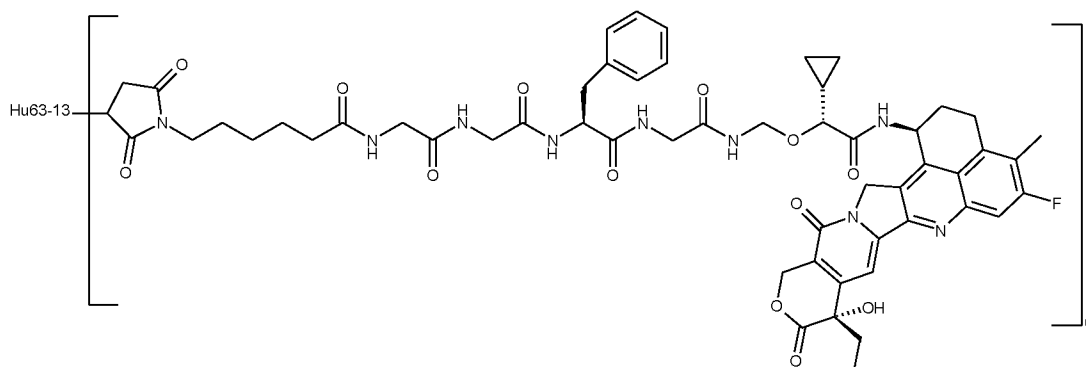
Сполука токсину 1-В являє собою інгібітор ДНК-топоізомерази I, та комплекс, утворений сполукою токсину, топоізомеразою I та ДНК, може викликати одноланцюгові розриви в ДНК, запобігаючи реплікації ДНК та ефективно інгібуючи клітинну проліферацію в клітинах.

ADC отримували наступним чином: гуманізоване антитіло (вибране з групи, що складається з Hu63-13, Hu47-14, Hu67-14 та Hu103-32) поміщали в 0,05 М водного буферу PBS (з концентрацією антитіла 10 мг/мл) при pH 6,5 та 10 мМ водного розчину трис(2-карбоксіетил)фосфіну (TCEP) (Innochem, CAS: 51805-45-9, Cat # B45573) додавали в молярній кількості, яка в 5,3 рази перевищувала кількість антитіла; суміші давали реагувати у струшуючому інкубаторі при постійній температурі 37 °C протягом 3 годин. Зазначену реакційну суміш охолоджували на крижаній бані до 25 °C.

Сполуку токсину 2-А розчиняли в диметилсульфоксиді в молярній кількості, яка в 15 разів перевищувала кількість антитіла, та отриманий розчин додавали до вищезазначеної реакційної суміші, яку потім залишали реагувати на шейкері при кімнатній температурі протягом 3 годин до завершення реакції. Реакційну суміш знесолювали та очищували на гелевій колонці з сефадексом G25 (фаза елювання: 0,05 М буфер PBS з pH 6,5, що містить 0,01 М EDTA) з отриманням цільового кон'югату антитіло-лікарський засіб молекули із співвідношенням лікарського засобу до антитіла (DAR, значення n) 6-8. Спеціалісти в даній галузі техніки можуть отримувати кон'югати з різними значеннями DAR, шляхом регулювання умов реакції та реагентів. Наприклад, молекули ADC з молярним співвідношенням лікарського засобу до антитіла (DAR, значення n) 3-5 були отримані шляхом регулювання молярного співвідношення антитіла до TCEP до сполуки токсину шляхом додавання 10 мМ водного розчину трис(2-карбоксіетил)фосфіну (TCEP) у молярній кількості, яка у 2,5 рази перевищує кількість антитіла, та додавання сполуки токсину 2-А у молярній кількості, яка у 10 разів перевищує кількість антитіла. Конкретні отримані ADC є наступними:

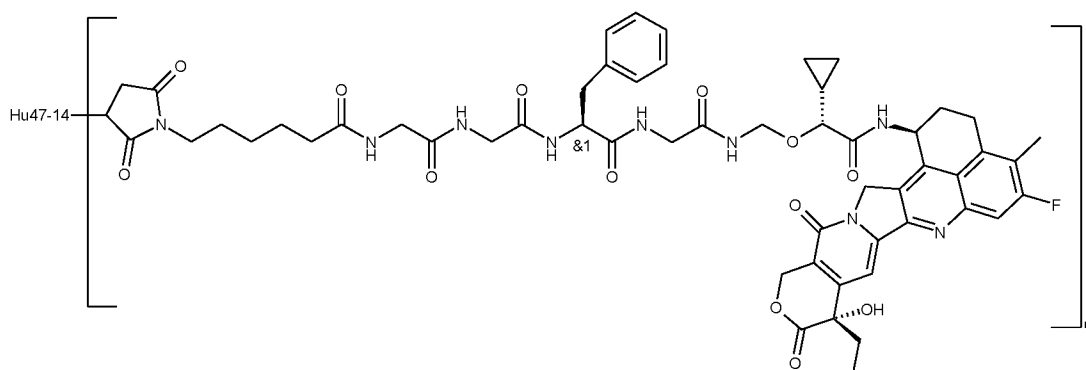
Зразки ADC	Вміст антитіла	DAR значення (n)
Hu47-14-2-A	Hu47-14	6,6
Hu63-13-2-A	Hu63-13	6,29
Hu67-14-2-A	Hu67-14	6,41
Hu103-32-2-A	Hu103-32	6,94
Hu63-13-2-A	Hu63-13	3,97
Hu67-14-2-A	Hu67-14	4,28
Hu103-32-2-A	Hu103-32	4,8

Hu63-13-2-A

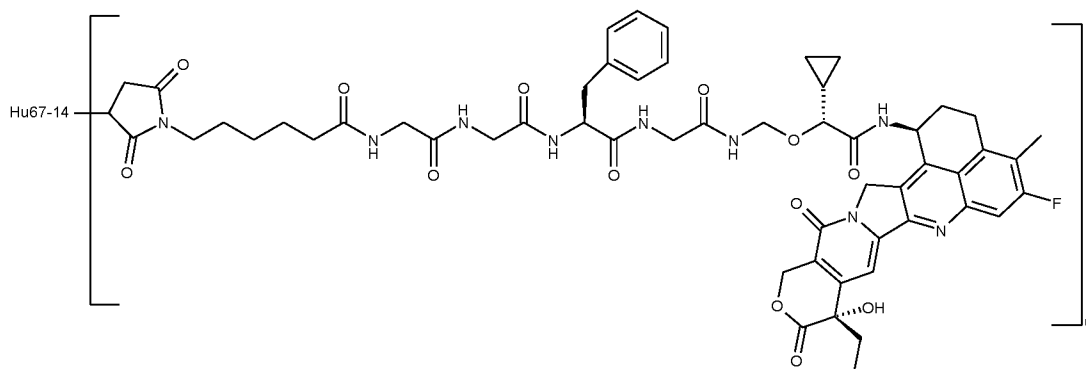


5

Hu47-14-2-A



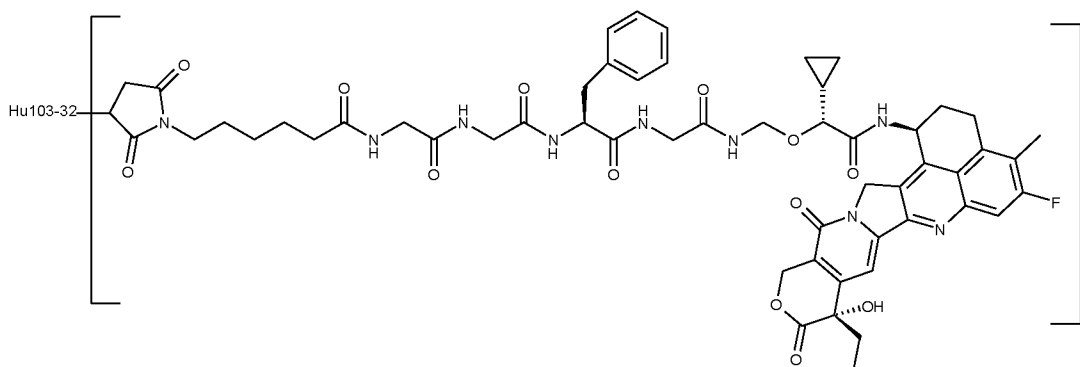
Hu67-14-2-A



10

Hu103-32-2-A

або



В представленому винаході також отримують ADC з іншими значеннями DAR, як цього вимагають приклади дослідження, деталі дивіться в наступних прикладах досліджень.

5 2. Отримання контрольного ADC Lmab-CL2A-SN38 (ADC-4)

Для оцінки відмінності між сконструйованим ADC у представленому винаході та контрольною молекулою ADC Lmab-CL2A-SN38, синтезували токсин CL2A-SN38 з посиланням на структуру, описану в WHO Drug Information Vol. 30, No. 1, 2016 та спосіб, описаний у Mol pharm. 2015 Jun 1; 12(6): 1836-47, та кон'югували Lmab з утворенням молекул ADC Lmab-CL2A-SN38 з різними значеннями DAR, регулюючи умови реакції, як описано вище при отриманні ADC. Отримані молекули ADC зберігали при -20 °C для подальшого застосування.

Приклади дослідження Приклад дослідження 1: Аналіз зв'язування FACS

Для виявлення зв'язування антитіла з протеїном CEA на клітинній поверхні, зв'язуючу активність антитіла визначали за допомогою FACS з використанням клітин, що експресують CEA на клітинній поверхні. Клітини збирали та центрифугували при 400 g при 4 °C протягом 5 хв. Додавали попередньо охолоджений PBS, що містить FBS в кінцевій концентрації 10 %, та центрифугували суміш при 400 g при 4 °C протягом 5 хв; процедури повторювали двічі. Клітини висівали в 96-лунковий планшет в кількості 105 клітин/лунку, та в кожен лунку додавали 100 мкл градієнтно розведеного розчину антитіла. Планшет інкубували при 4 °C протягом 60 хв., центрифугували та супернатант видаляли. Для ресуспендування клітин, в кожен лунку додавали по 250 мкл попередньо охолодженого PBS, що містить FBS в кінцевій концентрації 10 %, суспензію центрифугували при 400 g при 4 °C протягом 5 хв. з подальшим видаленням супернатанту; процедури повторювали двічі. Додавали 50 мкл розведеного 1:200 вторинного антитіла кози Alexa Fluor@488 антилюдського IgG (H+L) (Lifetechologies, Cat # A11013). Планшет інкубували в темряві при 4 °C протягом 45 хв., центрифугували та супернатант видаляли. Для ресуспендування клітин, в кожен лунку додавали по 250 мкл попередньо охолодженого PBS, що містить FBS в кінцевій концентрації 10 %, та суспензію центрифугували при 400 g при 4 °C протягом 5 хв.; процедури повторювали двічі. Для ресуспендування клітин, в кожен лунку додавали по 100 мкл попередньо охолодженого PBS. Планшет аналізували за допомогою проточного цитометра (BD, FACSverse) на значення сигналу флуоресценції. Більш високі значення вказують на більш високу зв'язуючу активність антитіла з протеїном на клітинній поверхні. Криві зв'язування будували з використанням програмного забезпечення для аналізу PRISM на основі результатів аналізу та значень EC₅₀ для зв'язуючої активності антитіла з протеїнами CEA клітинної поверхні людини (клітини раку шлунка MKN45, Nanjing Kebai Biotechnology Co., Ltd., Cat # CBP60488), сyноCEA-CHO та CEACAM1-CHO були отримані шляхом підгонки. Зв'язуюча активність гуманізованих антитіл є наведеною в Таблиця 17 та 18 нижче:

Таблиця 17

Зв'язуюча активність гуманізованих антитіл з протеїнами CEA клітинної поверхні різних видів

Антитіла	EC ₅₀ (hM)		
	MKN45	супоCEA-CHO	CEACAM1-CHO
Hu63-13	2,93	1,71	Зв'язування відсутнє
Hu47-14	4,19	2,70	Зв'язування відсутнє
Hu67-14	1,58	2,89	Зв'язування відсутнє
Hu103-32	1,79	1,24	Зв'язування відсутнє
Sanofi	2,64	17,27	Зв'язування відсутнє
Lmab	2,45	Зв'язування відсутнє	Зв'язування відсутнє

Результати зв'язуючої активності інших гуманізованих антитіл з протеїнами CEA клітинної поверхні (MKN45 та супоCEA-CHO) є наведеними в Таблиці 18 нижче:

5

Таблиця 18

Зв'язуюча активність гуманізованих антитіл з протеїнами CEA клітинної поверхні

Антитіла	EC ₅₀ (hM)		Антитіла	EC ₅₀ (hM)	
	MKN45	супоCEA-CHO		MKN45	супоCEA-CHO
Hu103-1	2,37	2,49	Hu47-6	2,50	0,30
Hu103-2	2,18	1,26	Hu47-10	2,27	0,27
Hu103-3	1,91	1,18	Hu63-1	4,23	1,24
Hu103-4	2,62	1,32	Hu63-2	3,73	2,64
Hu103-5	2,38	1,47	Hu63-3	3,56	2,01
Hu103-6	1,27	1,56	Hu63-4	5,18	1,95
Hu103-7	2,20	1,62	Hu63-5	3,70	2,14
Hu103-9	2,95	1,61	Hu63-6	3,71	2,88
Hu103-10	2,23	1,00	Hu63-8	3,24	2,43
Hu103-11	2,71	0,92	Hu63-9	4,87	2,47
Hu103-12	2,38	1,08	Hu63-10	4,95	1,88
Hu103-13	2,53	1,01	Hu163-11	4,35	2,29
Hu103-14	2,41	1,37	Hu63-12	4,04	2,23
Hu103-15	2,13	1,36	Hu67-1	2,46	4,57
Hu103-17	2,92	1,52	Hu67-4	3,25	3,06
Hu103-18	2,75	0,89	Hu67-5	2,86	3,50
Hu103-19	2,42	0,96	Hu67-7	3,88	7,20
Hu103-20	2,19	0,98	Hu67-9	3,75	3,72
Hu103-21	1,34	1,17	Hu67-10	3,19	5,37
Hu103-22	3,64	1,02	Hu67-11	2,26	4,66
Hu103-23	2,90	0,93	Hu67-12	3,20	5,31

Результати дослідження демонструють, що скринінговані гуманізовані антитіла за представленим винаходом зберігали зв'язуючу активність, подібну до активності мишачих антитіл, та всі вони могли зв'язуватися з протеїнами CEA людини на поверхні клітини; та що скринінговані гуманізовані антитіла за представленим винаходом можуть зв'язуватися з протеїнами CEA мавпи на клітинній поверхні, та зв'язуюча активність гуманізованих антитіл з протеїнами CEA мавпи була кращою, ніж у антитіла позитивного контролю.

Приклад дослідження 2: Дослідження на конкуренцію з розчинним CEA (sCEA)

Щоб перевірити, чи антитіла переважно зв'язуються з CEA на поверхні клітинної мембрани в присутності sCEA, градієнтно-розбавлене антитіло та певну розчинність sCEA (5 мкг/мл) попередньо інкубували протягом 30 хв., та потім клітини MKN45 збирали та висівали в 96-лунковий планшет. В кожну лунку додавали градієнтно-розбавлене антитіло, попередньо інкубований змішаний розчин антитіла та sCEA. Планшет інкубували при 4 °C протягом 60 хв. та центрифугували, та супернатант видаляли. Клітини двічі промивали попередньо охолодженим PBS, що містить FBS з кінцевою концентрацією 10 %. Додавали 50 мкл розведеного 1:200

- вторинного антитіла кози Alexa Fluor@488 антилюдського IgG (H+L) (Lifetechologies, Cat # A11013). Планшет інкубували в темряві при 4 °C протягом 45 хв., центрифугували та супернатант видаляли. Клітини двічі промивали 250 мкл попередньо охолодженого PBS з FBS при кінцевій концентрації 10 %. Для ресуспендування клітин, в кожну лунку додавали 100 мкл попередньо охолодженого PBS. Суспензію аналізували за допомогою проточного цитометра (FACS) (BD, FACSverse) на значення сигналів флуоресценції. Якщо співвідношення значення сигналу, отриманого за відсутності sCEA, до значення, отриманого в присутності sCEA, становить менше 2 для кожної концентрації антитіла, це вказує на те, що крива зв'язування антитіла не сильно змінюється у присутності sCEA, та, що антитіло, як і раніше, переважно зв'язується з CEA на поверхні клітинної мембрани. Результати дослідження є наведеними в таблицях 19 та 20, де співвідношення значень сигналу флуоресценції, отриманих за відсутності sCEA, до значень, отриманих в присутності sCEA для різних концентрацій Hu63-13, Hu47-14, Hu67-14, Hu103-32 та позитивні контрольні антитіла Lmab є наведеними в таблиці 19 нижче, та максимальні співвідношення значень сигналу флуоресценції, отриманих за відсутності sCEA, до значень отриманих в присутності sCEA є наведеними в таблиці 20 нижче:

Таблиця 19

Співвідношення значення сигналу флуоресценції, отриманого за відсутності sCEA, до значення, отриманого у присутності sCEA для гуманізованих антитіл

Концентрація антитіла (мкг/мл)	Співвідношення значень сигналу флуоресценції				
	Hu63-13	Hu47-14	Hu67-14	Hu103-32	Lmab
40	0,92	1,09	0,94	0,91	1,10
1,6	1,36	1,18	1,73	1,67	2,78
0,32	0,59	1,23	1,78	1,24	5,18
0,064	1,59	1,24	1,25	1,44	4,15
0,0128	1,43	1,09	1,50	1,28	2,72
0,00256	1,24	1,15	1,58	1,09	1,74
0,000512	1,02	1,07	1,08	0,86	1,20

Таблиця 20

Максимальні співвідношення значення сигналу флуоресценції, отриманого за відсутності sCEA, до значення отриманого в присутності sCEA для антитіл

Антитіла	Максимальне співвідношення сигналів флуоресценції	Антитіла	Максимальне співвідношення сигналів флуоресценції
Hu47-2	1,04	Hu103-1	1,30
Hu47-3	1,10	Hu103-2	1,17
Hu47-4	1,13	Hu103-3	1,14
Hu47-6	1,26	Hu103-4	1,17
Hu47-7	1,11	Hu103-5	1,15
Hu47-8	1,04	Hu103-6	1,15
Hu47-10	1,13	Hu103-7	1,07
Hu47-12	1,08	Hu103-9	1,57
Hu63-1	1,31	Hu103-10	1,19
Hu63-3	1,14	Hu103-11	1,16
Hu67-1	1,35	Hu103-12	1,24
Hu67-2	1,21	Hu103-13	1,16
Hu67-4	1,25	Hu103-14	1,10
Hu67-5	1,09	Hu103-15	1,23
Hu67-6	1,22	Hu103-17	1,12
Hu67-7	1,03	Hu103-18	1,22
Hu67-9	1,10	Hu103-19	1,36
Hu67-10	1,34	Hu103-20	1,22
Hu67-11	1,18	Hu103-21	1,27
Hu67-12	1,31	Hu103-22	1,33
Hu67-15	1,05	Hu103-23	1,31
mAb63	1,43	mAb103	1,02
mAb47	1,08	Sanofi	2,65

Результати дослідження демонструють, що всі співвідношення значення сигналу флуоресценції, отриманого за відсутності sCEA, до значення, отриманого в присутності sCEA, для різних концентрацій гуманізованих антитіл Hu63-13, Hu47-14, Hu67-14 та Hu103-32 є меншими, ніж 2; наприклад, максимальне співвідношення Hu63-13 становить 1,59, тоді як максимальне співвідношення для позитивного контролю Lmab становить 5,18. Скринінговані антитіла за представленим винаходом перевершують контрольне антитіло. Всі максимальні співвідношення значення сигналу флуоресценції, отриманого за відсутності sCEA, до значення, отриманого в присутності sCEA, для скринінгованих гуманізованих антитіл за представленим винаходом є меншими ніж 2 та меншими, ніж у антитіла позитивного контролю, що вказує на те, що скринінговані гуманізовані антитіла за представленим винаходом, як і раніше, переважно зв'язуються з CEA на поверхні клітинної мембрани в присутності sCEA та перевершують позитивне контрольне антитіло.

Приклад дослідження 3: Визначення афінності антитіл до розчинного CEA з використанням Biorad

Афінність досліджуваного гуманізованого антитіла до розчинного CEA людини та мавпи визначали з використанням приладу Biorad (GE, T200). Відповідно до способу, наведеного в інструкціях до набору для захоплення людських антитіл (GE, Cat # BR-1008-39), антитіла для захоплення людських антитіл ковалентно кон'югували з біосенсорним чіпом CM5 (GE, Cat # BR-1005-30) приладу Biorad для афінного захоплення певної кількості досліджуваного антитіла, потім серії градієнтів концентрації розчинних CEA антигенів пропускали через поверхню чіпа, та сигнали реакції реєстрували в режимі реального часу використовуючи Biorad, так що була отримана крива асоціації та дисоціації. Після завершення кожного циклу дисоціації, біочип промивали та регенерували регенеруючим розчином, приготованим у наборі для захоплення людських антитіл. Дані, отримані в ході дослідження, були зіставлені з моделлю Ленгмюра (1:1) з використанням програмного забезпечення BIAevaluation версії 4.1 для отримання значень афінності. Оскільки є бажаним, щоб зв'язуюча активність скринінгованих антитіл за

представленим винаходом з CEA на поверхні клітинної мембрани була вищою, ніж з розчинним CEA, бажаною є нижча афінність антитіл до розчинного CEA. Результати аналізу афінності гуманізованих антитіл до розчинного CEA є наведеними у таблиці 21 нижче:

Таблиця 21

Афінність гуманізованих антитіл до розчинного CEA людини

Антитіла	Human soluble CEA		
	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)
Hu63-13	2,99E+04	4,31E-03	1,44E-07
Hu47-14	1,31E+05	1,88E-01	1,43E-06
Hu67-14	3,76E+04	8,59E-03	2,28E-07
Hu103-32	3,33E+04	1,03E-03	3,11E-08
Sanofi	5,95E+04	3,08E-03	5,17E-08
Lmab	5,58E+04	3,31E-04	5,93E-09

Результати дослідження демонструють, що гуманізовані антитіла Hu63-13, Hu47-14 та Hu67-14 мають нижчу афінність до розчинного протеїну CEA, значно нижчу, ніж контрольні антитіла Sanofi та Lmab. Зазначене вказує на те, що Hu63-13, Hu47-14 та Hu67-14 нелегко нейтралізуються розчинним CEA у крові in vivo, та велика кількість антитіл може зв'язуватися з клітинами, які експресують CEA на поверхні клітинної мембрани.

Приклад дослідження 4: Ендоцитарна активність анти-CEA антитіла в CEA-високоекспресуючих клітинах MKN45

Після ендоцитозу клітинами кон'югату анти-CEA-антитіла в представленому винаході, кон'югат може вивільняти токсин, що вбиває клітини. Таким чином, ендоцитарна активність антитіла CEA у клітинах, що експресують CEA, може сприяти прояву активності ADC. Для оцінки ендоцитарної активності гуманізованих антитіл у клітинах MKN45, клітини MKN45 поміщали в 96-лунковий планшет (corning, Cat # 3795) та культивували протягом ночі; гуманізовані CEA антитіла Hu63-13, Hu47-14, Hu67-14 та Hu 103-32 попередньо інкубували наступного дня з реагентом для мічення iFL Green Human IgG (Invitrogen, Cat # Z25611) протягом 15 хв., протягом яких реагент iFL зв'язувався з Fc гуманізованих антитіл; потім в планшет для культури клітин додавали комплекси антитіл з iFL, культуральний розчин видаляли через 6 год. та 24 год.; клітини двічі промивали PBS, розщеплювали та збирали, та інтенсивність флуоресцентних сигналів у клітинах визначали за допомогою FACS. iFL, зв'язаний з Fc антитіл, переносили в клітини після ендоцитозу антитіл, та флуоресцентні сигнали можна було виявити лише в кислому середовищі після ендоцитозу iFL клітинами; отже, виявлені сильніші сигнали вказують на більш високу ендоцитотичну активність антитіл. Ендоцитарна активність гуманізованих антитіл є наведеною на фігурі 1: всі гуманізовані антитіла можуть бути ендоцитовані клітинами MKN45, та з часом було ендоцитовано більше антитіл.

Приклад дослідження 5: Цитотоксичність ADC для ракових клітин з різними рівнями експресії CEA

Після кон'югації гуманізованих антитіл CEA з токсином 2-A оцінювали цитотоксичність кожного ADC по відношенню до ліній ракових клітин з різними рівнями експресії CEA. CEA-високоекспресуючі клітини MKN45, CEA-помірноекспресуючі клітини LS174T та CEA-експресуючі негативні клітини HCT116 поміщали у 96-лункові планшети; Наступного дня до клітин додавали градієнтно розведені зразки ADC та культивували клітини при 37 °C протягом 5 днів. В кожному лунку додавали по 50 мкл реагенту Cell Titer-Glo (Promega, Cat # G9242) та після інкубування протягом 10 хв. у темряві сигнали люмінесценції реєстрували за допомогою детектора візуалізації клітин (BioTek, Cytation5). Крива інгібування була побудована з результатами виявлення за допомогою програмного забезпечення для аналізу PRISM та підігнана для отримання значення IC₅₀ для інгібуючої активності ADC проти проліферації клітин. Цитотоксичність кожного ADC є представленою наступним чином:

Цитотоксичність ADC до клітин з різними рівнями експресії CEA

Зразки ADC	DAR	IC ₅₀ (нМ)			Співвідношення IC ₅₀	
		MKN45 (з високою експресією CEA)	LS174T (з помірною експресією CEA)	HCT116 (без експресії CEA)	HCT116/LS174T	HCT116/MKN45
Hu47-14-2-A	6,6	6,58	10,3	106,3	10,32	16,16
Hu63-13-2-A	6,29	3,933	13,08	87,64	6,70	22,28
Hu67-14-2-A	6,41	3,331	9,236	71,83	7,78	21,56
Hu103-32-2-A	6,94	2,998	2,374	78,1	32,90	26,05
Lmab-CL2A-SN38	7	0,665	0,3456	0,4276	1,24	0,64
Hu63-13-2-A	3,97	34,02	19,76	165,1	8,36	4,85
Hu67-14-2-A	4,28	9,388	15,58	71,95	4,62	7,66
Hu103-32-2-A	4,8	2,863	3,076	83,58	27,17	29,19
Lmab-CL2A-SN38	4,15	1,595	0,6618	1,059	1,60	0,66

Молекули ADC, конюговані з токсином 2-A, демонструють цитотоксичність, яка залежить від рівня експресії CEA: чим вищий рівень експресії CEA, тим більш токсичні ADC для клітин. Тим часом, ADC з високими значеннями DAR та низькими значеннями DAR мають більш сильну цитотоксичність по відношенню до клітин, що експресують CEA, та більш слабку цитотоксичність по відношенню до клітин, які не експресують CEA. Контрольна молекула ADC Lmab-CL2A-SN38 має подібну цитотоксичність по відношенню до всіх трьох клітинних ліній, демонструючи неспецифічну цитотоксичність. Співвідношення IC₅₀ може опосередковано відбивати безпеку молекули ADC. Більше співвідношення вказує на те, що молекула ADC є менш токсичною для клітин, які не експресують CEA, та може бути безпечнішою *in vivo*.

Приклад дослідження 6: Байстендер ефект та цитотоксичність ADC

Після ендоцитозу ADC у клітину, токсин вивільняється з ADC, продукуючи токсичну дію на клітину. Після загибелі та лізису клітини, токсин вивільняється з клітини та може далі проникати у прилеглі клітини, продукуючи на них токсичну дію.

Для оцінки байстендер ефекту та цитотоксичності ADC, CEA-експресуючу клітинну лінію MKN45 та CEA-експресуючу клітинну лінію HCT116 культивували в 6-лунковому планшеті для культивування клітин протягом 24 год., та потім додавали зразок ADC з кінцевою концентрацією 4 нМ. Клітини культивували в клітинному інкубаторі при 37 °C протягом додаткових 5 днів. Клітини розщеплювали панкреатином та збирали та додавали моноклональне CEA антитіло FITC (ThermoFisher, Cat # MA 1-80578) з кінцевою концентрацією 10 мкг/мл. Клітини інкубували на кризі в темряві протягом 1 год., двічі промивали PBS та підраховували на проточному цитометрі. Клітини, які продукували флуоресцентні сигнали, являли собою клітини MKN45, що експресують CEA, та клітини, які не продукували сигнал, являли собою клітини HCT116, які не експресують CEA. Результати байстендер ефекту та цитотоксичності зразків ADC є наведеними на фігурі 2: всі молекули ADC мають сильні байстендерні ефекти та цитотоксичність. При спільному культивуванні MKN45 та HCT116, молекули ADC можуть інгібувати проліферацію обох типів клітин, в той час, як при культивуванні окремо, HCT116 молекули ADC, зв'язані з 2-A, принципово не є токсичними для клітин. Контрольна молекула ADC Lmab-CL2A-SN38 є дуже токсичною, як для клітин, що спільно культивуються, так і для клітин, що культивуються окремо.

Значення DAR молекул ADC, що використовуються в дослідженнях, були наступними: Hu63-13-2-A DAR 6,29; Hu47-14-2-A DAR 6,6; Hu67-14-2-A DAR 6,41; Lmab-CL2A-SN38 DAR 7,0.

Приклад дослідження 7: *In vivo* інгібуюча активність молекул ADC проти пухлин

Ефективність молекул ADC *in vivo* оцінювали з використанням моделей пухлин ксенотрансплантатів LS174T та MKN45. Безтимусних мишей BALB/c (ступінь SPF, Shanghai Slac Laboratory Animal Co., Ltd., сертифікат №: 201833814, ліцензія №: SCXK (Jiangsu) 2016-0010) утримували в умовах 12/12-годинного циклу світло/темрява 23±1 °C при вологості 40-50 %, корм (стандартний стерилізований корм для мишей) та вода *ad libitum*. Перед початком дослідження, мишей акліматизували протягом 10 днів у лабораторних умовах, та потім інокулювали підшкірно у правий бік клітинами LS174T (5×10⁵ клітин/миша) або клітинами MKN45 (4×10⁶ клітин/миша). Пухлини давали вирости до розміру близько 150 мм³, та потім мишей випадково розподіляли на групи по 8 особин. Після групування, мишам дослідних груп внутрішньочеревно вводили зразки

ADC у дозі 1 мг/кг або 3 мг/кг, та мишам контрольної групи внутрішньочеревно одноразово вводили PBS. Розміри пухлин у мишей спостерігали, вимірювали та записували. Об'єм пухлини (V) розраховували як: $V = 1/2 \times L_{\text{довгий}} \times L_{\text{короткий}}^2$; відносний об'єм пухлини (RTV) = V_t/V_0 ; швидкість інгібування пухлини (%) = $(C_{\text{RTV}} - T_{\text{RTV}})/C_{\text{RTV}}$ (%); де V_0 та V_t являють собою об'єми пухлини на початку та наприкінці дослідження, відповідно; та C_{RTV} та T_{RTV} являють собою відносні об'єми пухлин контрольної групи та дослідних груп, відповідно, наприкінці дослідження.

З точки зору ефективності *in vivo*, в порівнянні з PBS в контрольній групі, всі молекули ADC мають ефекти інгібування збільшення об'єму та ваги пухлин дозозалежним чином: інгібуючі ефекти на пухлини у групи 3-мрк є кращими, ніж у групи 1-мрк. В моделі пухлини ксенотрансплантату LS174T, результати є наведеними на фігурі 3 (зміна об'єму пухлини) та фігурі 4 (вага пухлини в останній день): серед груп 3-мрк, Hu63-13-2-A має найкращий інгібуючий ефект на пухлини, за нею слідує Hu47-14-2-A, та потім Hu67-14-2-A, та Lmab-CL2A-SN38 має найгірший інгібуючий ефект на пухлини. В моделі пухлини ксенотрансплантату MKN45, результати є наведеними на фігурі 5 (зміна об'єму пухлини) та фігурі 6 (вага пухлини в останній день): серед груп 3-мрк, Hu67-14-2-A має найкращий інгібуючий ефект на пухлини, за нею слідує Hu103-32-2-A та потім Hu63-13-2-A, та Lmab-CL2A-SN38 має найгірший інгібуючий ефект на пухлини. Швидкості інгібування пухлини *in vivo* молекулами ADC є наведеними у таблицях 23 та 24 нижче: швидкості інгібування пухлин ADC демонструють значний ефект дози; зокрема, в моделі пухлини ксенотрансплантату LS174T, серед груп з низькими дозами (1 мрк), Hu63-13-2-A має найвищу швидкість інгібування пухлини (55,95 %), за нею слідує Hu67-14-2-A (43, 71 %), та Hu47-14-2-A має найнижчу швидкість інгібування пухлини (23,04 %); серед груп з високими дозами (3 мрк), Hu63-13-2-A має найвищу швидкість інгібування пухлини (77,13 %), за нею слідує Hu47-14-2-A (66,87 %), та потім Hu67-14-2-A (47,66 %), та Lmab-CL2A-SJsl38 має найнижчу швидкість інгібування пухлини (33,44 %); в моделі пухлини ксенотрансплантату MKN45, серед груп з низькими дозами (1 мрк), Hu67-14-2-A має найвищу швидкість інгібування пухлини (15,88 %), за нею слідує Hu103-32-2-A (11,39 %), та Hu63-13-2-A має найнижчу швидкість інгібування пухлини (9,89 %); серед груп з високими дозами (3 мрк), Hu67-14-2-A має найвищу швидкість інгібування пухлини (79,51 %), за нею слідує Hu103-32-2-A (74,66 %), та потім Hu63-13-2-A (60,26 %), та Lmab-CL2A-SN38 має найнижчу швидкість інгібування пухлини (13,51 %).

Таблица 23

Швидкості інгібування пухлини ADC *in vivo*

Група	DAR	Доза	Швидкість інгібування пухлини (%)	Значення Р (порівняно з контрольною групою)
Порожня контрольна група	NA	NA	NA	NA
Hu63-13-2-A	6,3	1 мрк	55,95 %*	0,0159
Hu63-13-2-A	6,3	3 мрк	77,13 %**	0,0013
Hu47-14-2-A	6,6	1 мрк	23,04 %	0,4590
Hu47-14-2-A	6,6	3 мрк	66,87 %**	0,0052
Hu67-14-2-A	6,13	1 мрк	43,71 %	0,0561
Hu67-14-2-A	6,13	3 мрк	47,66 %	0,0794
Lmab-CL2A-SN38	7,0	3 мрк	33,44 %	0,1791

Примітка: * означає, що $P < 0,05$, ** означає, що $P < 0,01$, та NA означає, що не застосовувалось.

Таблиця 24

Швидкість інгібування пухлини ADC in vivo в моделі пухлини ксенотрансплантату MKN45

Група	DAR	Доза	Швидкість інгібування пухлини (%)	Значення Р (порівняно з контрольною групою)
Порожня контрольна група	NA	NA	NA	NA
Hu63-13-2-A	6,3	1 мрк	9,89 %	0,6492
Hu63-13-2-A	6,3	3 мрк	60,26 %*	0,0124
Hu67-14-2-A	6,13	1 мрк	15,88 %	0,5336
Hu67-14-2-A	6,13	3 мрк	79,51 %**	0,0087
Hu103-32-2-A	6,94	1 мрк	11,39 %	0,5219
Hu103-32-2-A	6,94	3 мрк	74,66 %**	0,0033
Lmab-CL2A-SN38	7,0	3 мрк	13,51 %	0,4980

Примітка: * означає, що $P < 0,05$, ** означає, що $P < 0,01$, та NA означає, що не застосовувалось.

Приклад дослідження 8: Фармакокінетичне дослідження молекул АБС in Vivo

5 Фармакокінетичне дослідження in vivo проводили на щурах SD. Щурів SD (Shanghai Sippr-BK Laboratory Animal Co. Ltd.) рандомізували на групи по 3 особи та лікарські засоби вводили внутрішньовенно у дозі 3 мг/кг. 0,3 мл зразків цільної крові збирали у груп введення в наступні моменти часу: перед введенням та через 5 хв., 8 год., 1 день, 2 дні, 4 дні, 7 днів, 10 днів, 14 днів, 21 день та 28 днів після введення, та антикоагулянт не додавався. Зібраний зразок цільної крові залишали при 4 °C протягом 30 хв та центрифугували при 1000 g протягом 15 хв., супернатант збирали, поміщали в пробірку для ВП та зберігали при -80 °C. Концентрацію крові в сироватці визначали за способом ІФА, та фармакокінетичні параметри досліджуваних лікарських засобів розраховували за допомогою програмного забезпечення Winnolin. результати є наведеними наступним чином:

Таблиця 25

Фармакокінетичні параметри молекул ADC in vivo

Зразки	Hu63-13-2-A (DAR6,8)		Hu47-14-2-A (DAR 6,72)		Hu67-14-2-A (DAR 6,7)		Hu103-32-2-A (DAR6.91)	
	Непошкоджений ADC	Антитіла	Непошкоджений ADC	Антитіла	Непошкоджений ADC	Антитіла	Непошкоджений ADC	Антитіла
Параметри	Середнє значення	Середнє значення	Середнє значення	Середнє значення	Середнє значення	Середнє значення	Середнє значення	Середнє значення
t1/2(год.)	169,7	192,7	158,5	188,8	170,8	180,6	135,19	157,87
t1/2 (д)	7,1	8,0	6,6	7,9	7,1	7,5	5,63	6,58
Cmax(мкг/мл)	62,9	67,6	51,5	55,2	50,8	49,6	64,94	66,35
AUC _{0-t} (мкг/мл*год.)	4280	4949	3283	3444	4037	4038	3609	3235
AUC _{0-∞} (мкг/мл*год.)	4600	5451	3456	3741	4309	4356	3699	3357
Vz(мл/кг)	159,8	153,0	198,3	218,8	171,9	179,9	160,09	206,29
CL(мл/день/кг)	15,7	13,2	20,9	19,3	16,8	16,6	19,70	21,75
MRT 0-∞ (год.)	212,1	239,0	184,7	216,6	226,6	237,7	144,63	160,14

Всі молекули ADC мають гарні фармакокінетичні властивості, та період напіввиведення антитіл є трохи більшим, ніж у молекул ADC. Період напіввиведення Hu63-13-2-A in vivo становить 7,1 днів, та період напіввиведення антитіла становить 8 днів; період напіввиведення Hu47-14-2-A in vivo становить 6,6 днів, та період напіввиведення антитіла становить 7,9 днів; період напіввиведення Hu67-14-2-A in vivo становить 7,1 днів, та період напіввиведення антитіла становить 7,5 днів; період напіввиведення Hu103-32-2-A in vivo становить 5,63 днів, та період напіввиведення антитіла становить 6,58 днів.

Приклад дослідження 9: Дослідження стабільності молекул ADC в плазмі in Vitro

Для оцінки стабільності молекул ADC у плазмі in vitro, молекули ADC додавали до плазми людини та мавпи в концентрації 100 мкг/мл, та суміші залишали відстоюватись при 37 °C протягом 21 дня. Зразки суміші відбирали один раз на тиждень та аналізували за допомогою PX/MC/MC (Shimadzu, система надвисокоєфективної рідинної хроматографії LC-30AD; Applied Biosystems, потрійний квадрупольний тандемний мас-спектрометр API4000) на вміст вільного токсину в плазмі. Результати виявлення є наведеними наступним чином:

Таблиця 26

Відсоток токсинів у плазмі

Відсоток токсинів у плазмі (%)												
Днів	Hu63-13-2-A (DAR 7,24)			Hu47-14-2-A (DAR 6,85)			Hu67-14-2-A (DAR 6,7)			Hu103-32-2-A (DAR 6,05)		
	BSA	Люди-на	Мавпа	BSA	Люди-на	Мавпа	BSA	Люди-на	Мавпа	BSA	Люди-на	Мавпа
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,93	0,38
14	0	0,21	0	0	0,28	0	0	0,18	0,21	0	0,78	0,92
21	0	0,32	0,4	0	0,34	0,29	0	0,4	0,24	0	1,13	0,96

Результат виявлення 0 вказує на те, що вміст вільного токсину в плазмі є нижчим нижньої межі виявлення та не може бути виявленим. Всі молекули ADC мають гарну стабільність в плазмі людини та мавпи. Вміст вільного токсину в плазмі людини та мавпи для Hu63-13-2-A становив 0,32 % та 0,4 % відповідно, після інкубування при 37 °C протягом 21 дня; вміст вільного токсину в плазмі людини та мавпи для Hu47-14-2-A становив 0,34 % та 0,29 %, відповідно; вміст вільного токсину в плазмі людини та мавпи для Hu67-14-2-A становив 0,4 % та 0,24 %, відповідно; вміст вільного токсину в плазмі людини та мавпи для Hu103-32-2-A становив 1,13 % та 0,96 %, відповідно.

Приклад дослідження 10: Дослідження на інгібування in vitro проліферації пухлинних клітин за допомогою сполук

I. Мета

Зазначене дослідження було призначене для перевірки інгібуючої активності фармацевтичних сполук за представленим винаходом щодо проліферації in vitro клітин U87MG (Cell Bank, Chinese Academy of Sciences, Cat # TCHul38) та пухлинних клітин SK-BR-3 (клітини раку молочної залози людини, ATCC, Cat # HTB-30). Клітини обробляли in vitro сполукою в різних концентраціях. Після 6 днів культивування, проліферацію клітин досліджували з використанням CTG реагентів (CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay, Promega, Cat # G7573), та активність сполуки in vitro оцінювали відповідно до значення IC₅₀.

II. Спосіб

Дослідження на інгібування проліферації клітин U87MG in vitro було взято як приклад для ілюстрації способу за представленим винаходом для дослідження інгібуючої активності сполук за представленим винаходом щодо проліферації пухлинних клітин in vitro. Спосіб також був застосований, але не обмежуючись цим, до дослідження на інгібуючу активність щодо проліферації in vitro інших пухлинних клітин.

1. Культура клітин: клітини U87MG та SK-BR-3 культивували в середовищі EMEM (GE, Cat # SH30024.01), що містить 10 % FBS, та в середовищі McCoy's 5A (Gibco, Cat # 16600-108), що містить 10 % FBS, відповідно.

2. Отримання клітин: клітини U87MG та SK-BR-3, що ростуть у логарифмічній фазі, одноразово промивали PBS (фосфатний буфер, Shanghai BasalMedia Technologies Co., LTD.), та потім розщеплювали 2-3 мл трипсину (0,25 % трипсин-ЕДТА (ix), Gibco, Life Technologies) протягом 2-3 хв. Після повного розщеплення клітин, додавали 10-15 мл середовища для

культивування клітин для елюювання розщеплених клітин. Суміші центрифугували при 1000 об./хв. протягом 5 хв., супернатанти відкидали. Потім клітини ресуспендували в 10-20 мл середовища для культивування клітин з одержанням суспензії одиночних клітин.

3. Висівання клітин: кожну суспензію одиночних клітин U87MG та SK-BR-3 ретельно перемішували та доводили до щільності клітин $2,75 \times 10^3$ клітин/мл та $8,25 \times 10^3$ клітин/мл, відповідно. Скориговані клітинні суспензії ретельно перемішували та додавали в 96-лункові планшети для культивування клітин у кількості 180 мкл/лунку. В периферійні лунки 96-лункового планшета додавали лише 200 мкл середовища. Планшет інкубували в інкубаторі протягом 24 годин (37 °C, 5 % CO₂).

4. Отримання сполуки: сполуку розчиняли у ДМСО (диметилсульфоксид, Shanghai Titan Scientific Co., Ltd.) для отримання базового розчину з вихідною концентрацією 10 mM. Низькомолекулярні сполуки отримували у вихідній концентрації 500 nM в наступний спосіб.

В першу колонку 96-лункового планшета з U-подібним дном додавали різні дослідні зразки в концентрації 100 мкМ (30 мкл), та в кожну лунку другої колонки через одинадцятую колонку додавали по 20 мкл ДМСО. Зразки в першій колонці (10 мкл) додавали до 20 мкл ДМСО у другій колонці, суміші добре перемішували. В третю колонку додавали 10 мкл сумішей і так далі до десятої колонки. Лікарські засоби в планшеті (5 мкл на лунку) переносили в середовище EMEM (95 мкл) та суміші добре перемішували для подальшого використання.

ADC отримували у вихідній концентрації 10 nM або 500 nM в наступний спосіб. Різні дослідні зразки при концентрації 100 nM або 5 мкМ (100 мкл) додавали в першу колонку 96-лункового планшета, та по 100 мкл PBS додавали в кожну лунку другої колонки через одинадцятую колонку. Зразки з першої колонки (50 мкл) додавали до 100 мкл PBS у другій колонці, суміші добре перемішували. В третю колонку додавали по 50 мкл сумішей і так далі, в 3-кратному розведенні, десяту колонку.

5. Додавання зразка: дослідні зразки, отримані в різних концентраціях (20 мкл), додавали в культуральний планшет, при цьому для кожного зразка встановлювали дві лунки-дублікати. Планшет інкубували в інкубаторі протягом 6 днів (37 °C, 5 % CO₂).

6. Прояв забарвлення: 96-лунковий планшет для культивування клітин виймали та в кожну лунку додавали по 90 мкл розчину CTG з подальшим інкубуванням протягом 10 хв. при кімнатній температурі.

7. Зчитування планшету: 96-лунковий планшет для культивування клітин виймали та досліджували на хемілюмінесценцію у пристрої для зчитування мікропланшетів (BMG labtech, PHERAstar FS).

III. Аналіз даних

Дані обробляли та аналізували з використанням Microsoft Excel та Graphpad Prism 5. Результати дослідження є представленими в таблиці нижче.

Таблиця 27

Значення IC₅₀ невеликих молекулярних фрагментів, за представленим винаходом, при інгібуванні проліферації in vitro клітин SK-BR-3 та клітин U87

Сполука №	IC ₅₀ (nM)	
	SK-BR-3	U87
Більш короткий час утримання 1-B	0,33	0,86
Більш довший час утримання 1-A	8,11	2,31

Висновок: невеликі молекулярні фрагменти, за представленим винаходом, мають значну інгібуючу активність щодо проліферації клітин SK-BR-3 та клітин U87, та хіральні центри мають певний вплив на інгібуючу активність сполук.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Jiangsu Hengrui Medicine Co., Ltd.
Shanghai Hengrui Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> АНАЛОГ КОМ'ЮНАТИ АНТИ-СЕА АНТИВИЛО-ЕНКАТЕКАН ТА ЙОГО ФАРМАЦЕВТИЧНЕ
ЗАСТОСУВАННЯ

<130> 702139CPET

<160> 32

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 667

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> РЕЗУЛЬТ

<223> Послідовність протеїну СЕА-Ніс людини (hCEA-His)

<400> 1

Lys Leu Thr Ile Glu Ser Thr Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu
1 5 10 15
Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln His Leu Phe Gly Tyr Ser
20 25 30
Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Ile Gly Tyr
35 40 45
Val Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Tyr Ser Gly Arg
50 55 60
Glu Ile Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Ile Ile Gln
65 70 75 80
Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu His Val Ile Lys Ser Asp Leu Val
85 90 95
Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe Arg Val Tyr Pro Glu Leu Pro Lys
100 105 110
Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro Val Gln Asp Lys Asp Ala
115 120 125
Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Ala Thr Tyr Leu Trp
130 135 140
Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser
145 150 155 160
Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn Val Thr Arg Asn Asp Thr
165 170 175
Ala Ser Tyr Lys Cys Glu Thr Gln Asn Pro Val Ser Ala Arg Arg Ser
180 185 190
Asp Ser Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro Thr Ile
195 200 205
Ser Pro Leu Asn Thr Ser Tyr Arg Ser Gly Glu Asn Leu Asn Leu Ser
210 215 220
Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Phe Val Asn
225 230 235 240
Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Gln Leu Phe Ile Pro Asn Ile Thr
245 250 255
Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Thr Cys Gln Ala His Asn Ser Asp Thr

```

      260      265      270
Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Glu Pro
  275      280      285
Pro Lys Pro Phe Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Glu
  290      295      300
Asp Ala Val Ala Leu Thr Cys Glu Pro Glu Ile Glu Asn Thr Thr Tyr
  305      310      315      320
Leu Trp Trp Val Asn Asn Glu Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Glu
      325      330      335
Leu Ser Asn Asp Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr Arg Asn
      340      345      350
Asp Val Gly Pro Tyr Glu Cys Gly Ile Glu Asn Glu Leu Ser Val Asp
      355      360      365
His Ser Asp Pro Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Asp Pro
      370      375      380
Thr Ile Ser Pro Ser Tyr Thr Tyr Tyr Arg Pro Gly Val Asn Leu Ser
      385      390      395      400
Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Glu Tyr Ser Trp Leu
      405      410      415
Ile Asp Gly Asn Ile Glu Glu His Thr Glu Glu Leu Phe Ile Ser Asn
      420      425      430
Ile Thr Glu Lys Asn Ser Gly Leu Tyr Thr Cys Glu Ala Asn Asn Ser
      435      440      445
Ala Ser Gly His Ser Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Thr Val Ser Ala
      450      455      460
Glu Leu Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro Val Glu
      465      470      475      480
Asp Lys Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Ala Glu Asn Thr
      485      490      495
Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Gly Glu Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg
      500      505      510
Leu Glu Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn Val Thr
      515      520      525
Arg Asn Asp Ala Arg Ala Tyr Val Cys Gly Ile Glu Asn Ser Val Ser
      530      535      540
Ala Asn Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asp Val Leu Tyr Gly Pro Asp
      545      550      555      560
Thr Pro Ile Ile Ser Pro Pro Asp Ser Ser Tyr Leu Ser Gly Ala Asn
      565      570      575
Leu Asn Leu Ser Cys His Ser Ala Ser Asn Pro Ser Pro Glu Tyr Ser
      580      585      590
Trp Arg Ile Asn Gly Ile Pro Glu Glu His Thr Glu Val Leu Phe Ile
      595      600      605
Ala Lys Ile Thr Pro Asn Asn Asn Gly Thr Tyr Ala Cys Phe Val Ser
      610      615      620
Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Ser Ile Thr Val
      625      630      635      640
Ser Ala Ser Gly Thr Ser Pro Gly Leu Ser Ala His His His His His
      645      650      655
His

```

<210> 2

<211> 663

<212> FRT

<213> Матрица послідовностей

<220>

<221> ПЕПТИД

<223> Последовательность протеина CEA-Fc людини (hCEA-Fc)

<400> 2

```

Lys Leu Thr Ile Glu Ser Thr Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu
1      5      10      15
Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln His Leu Phe Gly Tyr Ser
20      25      30
Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Ile Gly Tyr
35      40      45
Val Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Tyr Ser Gly Arg
50      55      60
Gln Ile Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Ile Ile Gln
65      70      75      80
Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu His Val Ile Lys Ser Asp Leu Val
85      90      95
Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe Arg Val Tyr Pro Gln Leu Pro Lys
100     105     110
Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro Val Glu Asp Lys Asp Ala
115     120     125
Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Gln Thr Gln Asp Ala Thr Tyr Leu Trp
130     135     140
Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser
145     150     155     160
Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn Val Thr Arg Asn Asp Thr
165     170     175
Ala Ser Tyr Lys Cys Glu Thr Gln Asn Pro Val Ser Ala Arg Arg Ser
180     185     190
Asp Ser Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro Thr Ile
195     200     205
Ser Pro Leu Asn Thr Ser Tyr Arg Ser Gly Glu Asn Leu Asn Leu Ser
210     215     220
Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Phe Val Asn
225     230     235     240
Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn Ile Thr
245     250     255
Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Thr Cys Gln Ala His Asn Ser Asp Thr
260     265     270
Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Glu Pro
275     280     285
Pro Lys Pro Phe Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Glu Asp Glu
290     295     300
Asp Ala Val Ala Leu Thr Cys Glu Pro Glu Ile Gln Asn Thr Thr Tyr
305     310     315     320
Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln
325     330     335
Leu Ser Asn Asp Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr Arg Asn
340     345     350
Asp Val Gly Pro Tyr Glu Cys Gly Ile Gln Asn Glu Leu Ser Val Asp
355     360     365
His Ser Asp Pro Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Asp Pro
370     375     380
Thr Ile Ser Pro Ser Tyr Thr Tyr Tyr Arg Pro Gly Val Asn Leu Ser
385     390     395     400
Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Leu
405     410     415
Ile Asp Gly Asn Ile Gln Gln His Thr Gln Glu Leu Phe Ile Ser Asn

```

```

      420      425      430
Ile Thr Glu Lys Asn Ser Gly Leu Tyr Thr Cys Gln Ala Asn Asn Ser
435      440      445
Ala Ser Gly His Ser Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Thr Val Ser Ala
450      455      460
Glu Leu Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro Val Glu
465      470      475      480
Asp Lys Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Glu Ala Gln Asn Thr
485      490      495
Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Gly Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg
500      505      510
Leu Gln Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn Val Thr
515      520      525
Arg Asn Asp Ala Arg Ala Tyr Val Cys Gly Ile Gln Asn Ser Val Ser
530      535      540
Ala Asn Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asp Val Leu Tyr Gly Pro Asp
545      550      555      560
Thr Pro Ile Ile Ser Pro Pro Arg Ser Ser Tyr Leu Ser Gly Ala Asn
565      570      575
Leu Asn Leu Ser Cys His Ser Ala Ser Asn Pro Ser Pro Gln Tyr Ser
580      585      590
Trp Arg Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln His Thr Gln Val Leu Phe Ile
595      600      605
Ala Lys Ile Thr Pro Asn Asn Asn Gly Thr Tyr Ala Cys Phe Val Ser
610      615      620
Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Ser Ile Thr Val
625      630      635      640
Ser Ala Ser Gly Thr Ser Pro Gly Leu Ser Ala Gln Pro Lys Ser Ser
645      650      655
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Gln Leu Leu Gly
660      665      670
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
675      680      685
Ile Ser Arg Thr Pro Gln Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
690      695      700
Gln Asp Pro Gln Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Gln Val
705      710      715      720
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Gln Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
725      730      735
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
740      745      750
Lys Gln Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
755      760      765
Gln Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Gln Pro Gln Val
770      775      780
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Gln Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
785      790      795      800
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
805      810      815
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Gln Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
820      825      830
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
835      840      845
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
850      855      860
His Gln Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
865      870      875      880
Pro Gly Lys

```

<210> 3
 <211> 660
 <212> PRT
 <213> Штука последовательности
 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> Последовательность протеина CEA-His имеет синонимы: (synoCEA-His)

<400> 3
 Gln Leu Thr Ile Glu Ser Arg Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly Lys Glu
 1 5 10 15
 Val Leu Leu Leu Ala His Asn Val Ser Gln Asn Leu Phe Gly Tyr Ile
 20 25 30
 Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Ala Ser Arg Arg Ile Gly Ser Cys
 35 40 45
 Val Ile Arg Thr Gln Gln Ile Thr Pro Gly Pro Ala His Ser Gly Arg
 50 55 60
 Glu Thr Ile Asp Phe Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val Thr Gln
 65 70 75 80
 Ser Asp Thr Gly Ser Tyr Thr Ile Gln Val Ile Lys Glu Asp Leu Val
 85 90 95
 Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe Arg Val Tyr Pro Gln Leu Pro Lys
 100 105 110
 Pro Tyr Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Ile Glu Asp Lys Asp Ala
 115 120 125
 Val Ala Leu Thr Cys Glu Pro Gln Thr Gln Asp Thr Thr Tyr Leu Trp
 130 135 140
 Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Glu Leu Ser
 145 150 155 160
 Ser Asp Asn Arg Thr Leu Thr Val Phe Asn Ile Pro Arg Asn Asp Thr
 165 170 175
 Thr Ser Tyr Lys Cys Glu Thr Gln Asn Pro Val Ser Val Arg Arg Ser
 180 185 190
 Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro Thr Ile
 195 200 205
 Ser Pro Leu Asn Thr Pro Tyr Arg Ala Gly Glu Tyr Leu Asn Leu Thr
 210 215 220
 Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Thr Ala Gln Tyr Phe Trp Phe Val Asn
 225 230 235 240
 Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Glu Leu Phe Ile Pro Asn Ile Thr
 245 250 255
 Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Met Cys Gln Ala His Asn Ser Ala Thr
 260 265 270
 Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Ala Ile Thr Val Tyr Ala Glu Leu
 275 280 285
 Pro Lys Pro Tyr Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Ile Glu Asp Lys
 290 295 300
 Asp Ala Val Thr Leu Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr Thr Tyr
 305 310 315 320
 Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Arg Leu Ser Val Ser Ser Arg Leu Glu
 325 330 335
 Leu Ser Asn Asp Asn Arg Thr Leu Thr Val Phe Asn Ile Pro Arg Asn
 340 345 350
 Asp Thr Thr Phe Tyr Glu Cys Glu Thr Gln Asn Pro Val Ser Val Arg
 355 360 365

```

Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro
370                               375                               380
Thr Ile Ser Pro Leu Asn Thr Pro Tyr Arg Ala Gly Glu Asn Leu Asn
385                               390                               395                               400
Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Ala Ala Gln Tyr Phe Trp Phe
405                               410                               415
Val Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Gln Leu Phe Ile Pro Asn
420                               425                               430
Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Met Cys Gln Ala His Asn Ser
435                               440                               445
Ala Thr Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Ala Ile Thr Val Tyr Val
450                               455                               460
Glu Leu Pro Lys Pro Tyr Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Ile Glu
465                               470                               475                               480
Asp Lys Asp Ala Val Thr Leu Thr Cys Glu Pro Val Ala Glu Asn Thr
485                               490                               495
Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Ser Val Ser Pro Arg
500                               505                               510
Leu Gln Leu Ser Asn Gly Asn Arg Ile Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr
515                               520                               525
Arg Asn Asp Thr Gly Pro Tyr Glu Cys Gly Ile Gln Asn Ser Glu Ser
530                               535                               540
Ala Lys Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Thr Tyr Gly Pro Asp
545                               550                               555                               560
Thr Pro Ile Ile Ser Pro Pro Asp Leu Ser Tyr Arg Ser Gly Ala Asn
565                               570                               575
Leu Asn Leu Ser Cys His Ser Asp Ser Asn Pro Ser Pro Gln Tyr Ser
580                               585                               590
Trp Leu Ile Asn Gly Thr Leu Arg Gln His Thr Gln Val Leu Phe Ile
595                               600                               605
Ser Lys Ile Thr Ser Asn Asn Asn Gly Ala Tyr Ala Cys Phe Val Ser
610                               615                               620
Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Asn Ile Ser Val
625                               630                               635                               640
Ser Ser Gly Asp Ser Ala Pro Gly Ser Ser Gly Leu Ser Ala His His
645                               650                               655
His His His His
660

```

<210> 4
 <211> 702
 <212> PRT
 <213> Единица послідовності

<220>
 <221> PEPTIDE
 <223> Послідовність протеїну CEA людини, експресована на поверхні клітин CHO (pCEA-CHO)

```

<400> 4
Met Glu Ser Pro Ser Ala Pro Pro His Arg Trp Cys Ile Pro Trp Gln
1                               5                               10                               15
Arg Leu Leu Leu Thr Ala Ser Leu Leu Thr Phe Trp Asn Pro Pro Thr
20                               25                               30
Thr Ala Lys Leu Thr Ile Glu Ser Thr Pro Phe Asn Val Ala Glu Gly
35                               40                               45
Lys Glu Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln His Leu Phe Gly

```

```

      60      85      60
Tyr Ser Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Ile
65      70      75      80
Gly Tyr Val Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Tyr Ser
      85      90      95
Gly Arg Gln Ile Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Ile
100      105      110
Ile Gln Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu His Val Ile Lys Ser Asp
115      120      125
Leu Val Asn Gln Gln Ala Thr Gly Gln Phe Arg Val Tyr Pro Gln Leu
130      135      140
Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro Val Gln Asp Lys
145      150      155
Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Gln Thr Gln Asp Ala Thr Tyr
160      165      170
Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln
175      180      185
Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn Val Thr Arg Asn
190      195      200
Asp Thr Ala Ser Tyr Lys Cys Gln Thr Gln Asn Pro Val Ser Ala Arg
205      210      215
Arg Ser Asp Ser Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro
220      225      230
Thr Ile Ser Pro Leu Asn Thr Ser Tyr Arg Ser Gly Gln Asn Leu Asn
235      240      245
Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Phe
250      255      260
Val Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Gln Leu Phe Ile Pro Asn
265      270      275
Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Thr Cys Gln Ala His Asn Ser
280      285      290
Asp Thr Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Thr Ile Thr Val Tyr Ala
295      300      305
Gln Pro Pro Lys Pro Phe Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Gln
310      315      320
Asp Gln Asp Ala Val Ala Leu Thr Cys Glu Pro Gln Ile Gln Asn Thr
325      330      335
Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg
340      345      350
Leu Gln Leu Ser Asn Asp Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr
355      360      365
Arg Asn Asp Val Gly Pro Tyr Glu Cys Gly Ile Gln Asn Gln Leu Ser
370      375      380
Val Asp His Ser Asp Pro Val Ile Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp
385      390      395
Asp Pro Thr Ile Ser Pro Ser Tyr Thr Tyr Tyr Arg Pro Gly Val Asn
400      405      410
Leu Ser Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser
415      420      425
Trp Leu Ile Asp Gly Asn Ile Gln Gln His Thr Gln Gln Leu Phe Ile
430      435      440
Ser Asn Ile Thr Gln Lys Asn Ser Gly Leu Tyr Thr Cys Gln Ala Asn
445      450      455
Asn Ser Ala Ser Gly His Ser Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Thr Val
460      465      470
Ser Ala Gln Leu Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Lys Pro
475      480      485
Val Gln Asp Lys Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Glu Pro Gln Ala Gln
490      495      500

```

```

      515              520              525
Asn Thr Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Gly Gln Ser Leu Pro Val Ser
530              535              540
Pro Arg Leu Gln Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Phe Asn
545              550              555              560
Val Thr Arg Asn Asp Ala Arg Ala Tyr Val Cys Gly Ile Gln Asn Ser
565              570              575
Val Ser Ala Asn Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asp Val Leu Tyr Gly
580              585              590
Pro Asp Thr Pro Ile Ile Ser Pro Pro Asp Ser Ser Tyr Leu Ser Gly
595              600              605
Ala Asn Leu Asn Leu Ser Cys His Ser Ala Ser Asn Pro Ser Pro Gln
610              615              620
Tyr Ser Trp Arg Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln His Thr Gln Val Leu
625              630              635              640
Phe Ile Ala Lys Ile Thr Pro Asn Asn Asn Gly Thr Tyr Ala Cys Phe
645              650              655
Val Ser Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Ser Ile
660              665              670
Thr Val Ser Ala Ser Gly Thr Ser Pro Gly Leu Ser Ala Gly Ala Thr
675              680              685
Val Gly Ile Met Ile Gly Val Leu Val Gly Val Ala Leu Ile
690              695              700

```

<210> 5

<211> 690

<212> PRT

<213> Естична послідовність

<220>

<221> NAME

<223> Послідовність протеїну CEA мазки сучолоїгус експресована на поверхні клітини CHO (суплсЕА-CHO)

<400> 5

```

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1              5              10              15
Val Gln Cys Gln Leu Thr Ile Glu Ser Arg Pro Phe Asn Val Ala Glu
20              25              30
Gly Lys Glu Val Leu Leu Leu Ala His Asn Val Ser Gln Asn Leu Phe
35              40              45
Gly Tyr Ile Trp Tyr Lys Gly Glu Arg Val Asp Ala Ser Arg Arg Ile
50              55              60
Gly Ser Cys Val Ile Arg Thr Gln Gln Ile Thr Pro Gly Pro Ala His
65              70              75              80
Ser Gly Arg Glu Thr Ile Asp Phe Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn
85              90              95
Val Thr Gln Ser Asp Thr Gly Ser Tyr Thr Ile Gln Val Ile Lys Glu
100              105              110
Asp Leu Val Asn Glu Glu Ala Thr Gly Gln Phe Arg Val Tyr Pro Glu
115              120              125
Leu Pro Lys Pro Tyr Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Ile Glu Asp
130              135              140
Lys Asp Ala Val Ala Leu Thr Cys Glu Pro Glu Thr Gln Asp Thr Thr
145              150              155              160
Tyr Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu
165              170              175

```

Gln Leu Ser Ser Asp Asn Arg Thr Leu Thr Val Phe Asn Ile Pro Arg
 180 185 190
 Asn Asp Thr Thr Ser Tyr Lys Cys Gln Thr Gln Asn Pro Val Ser Val
 195 200 205
 Arg Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro Asp Ala
 210 215 220
 Pro Thr Ile Ser Pro Leu Asn Thr Pro Tyr Arg Ala Gly Gln Tyr Leu
 225 230 235 240
 Asn Leu Thr Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Thr Ala Gln Tyr Phe Trp
 245 250 255
 Phe Val Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Gln Leu Phe Ile Pro
 260 265 270
 Asn Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Met Cys Gln Ala His Asn
 275 280 285
 Ser Ala Thr Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Ala Ile Thr Val Tyr
 290 295 300
 Ala Gln Leu Pro Lys Pro Tyr Ile Thr Ser Asn Asn Ser Asn Pro Ile
 305 310 315 320
 Gln Asp Lys Asp Ala Val Thr Leu Thr Cys Gln Pro Gln Thr Gln Asp
 325 330 335
 Thr Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Arg Leu Ser Val Ser Ser
 340 345 350
 Arg Leu Gln Leu Ser Asn Asp Asn Arg Thr Leu Thr Val Phe Asn Ile
 355 360 365
 Pro Arg Asn Asp Thr Thr Phe Tyr Gln Cys Gln Thr Gln Asn Pro Val
 370 375 380
 Ser Val Arg Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Leu Tyr Gly Pro
 385 390 395 400
 Asp Ala Pro Thr Ile Ser Pro Leu Asn Thr Pro Tyr Arg Ala Gly Gln
 405 410 415
 Asn Leu Asn Leu Ser Cys His Ala Ala Ser Asn Pro Ala Ala Gln Tyr
 420 425 430
 Phe Trp Phe Val Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Gln Leu Phe
 435 440 445
 Ile Pro Asn Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Met Cys Gln Ala
 450 455 460
 His Asn Ser Ala Thr Gly Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Ala Ile Thr
 465 470 475 480
 Val Tyr Val Gln Leu Pro Lys Pro Tyr Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn
 485 490 495
 Pro Ile Gln Asp Lys Asp Ala Val Thr Leu Thr Cys Gln Pro Val Ala
 500 505 510
 Gln Asn Thr Thr Tyr Leu Trp Trp Val Asn Asn Gln Ser Leu Ser Val
 515 520 525
 Ser Pro Arg Leu Gln Leu Ser Asn Gly Asn Arg Ile Leu Thr Leu Leu
 530 535 540
 Ser Val Thr Arg Asn Asp Thr Gly Pro Tyr Gln Cys Gly Ile Gln Asn
 545 550 555 560
 Ser Gln Ser Ala Lys Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Thr Tyr
 565 570 575
 Gly Pro Asp Thr Pro Ile Ile Ser Pro Pro Asp Leu Ser Tyr Arg Ser
 580 585 590
 Gly Ala Asn Leu Asn Leu Ser Cys His Ser Asp Ser Asn Pro Ser Pro
 595 600 605
 Gln Tyr Ser Trp Leu Ile Asn Gly Thr Leu Arg Gln His Thr Gln Val
 610 615 620
 Leu Phe Ile Ser Lys Ile Thr Ser Asn Asn Asn Gly Ala Tyr Ala Cys
 625 630 635 640

Phe Val Ser Asn Leu Ala Thr Gly Arg Asn Asn Ser Ile Val Lys Asn
645 650 655
Ile Ser Val Ser Ser Gly Asp Ser Ala Pro Gly Ser Ser Gly Leu Ser
660 665 670
Ala Arg Ala Thr Val Gly Ile Ile Ile Gly Met Leu Val Gly Val Ala
675 680 685
Leu Met
690

<210> 6
<211> 828
<212> ERT
<213> Енучка послідовність
<220>
<221> PENTMR
<223> Послідовність протеїну CEACAM1 людини, експресована на поверхні
клітин CHO (CEACAM1-CHO)

<400> 6
Met Gly His Leu Ser Ala Pro Leu His Arg Val Arg Val Pro Trp Gln
1 5 10 15
Gly Leu Leu Leu Thr Ala Ser Leu Leu Thr Phe Trp Asn Pro Pro Thr
20 25 30
Thr Ala Gln Leu Thr Thr Gln Ser Met Pro Phe Asn Val Ala Gln Gly
35 40 45
Lys Gln Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln Gln Leu Phe Gly
50 55 60
Tyr Ser Trp Tyr Lys Gly Gln Arg Val Asp Gly Asn Arg Gln Ile Val
65 70 75 80
Gly Tyr Ala Ile Gly Thr Gln Gln Ala Thr Pro Gly Pro Ala Asn Ser
85 90 95
Gly Arg Glu Thr Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile Gln Asn Val
100 105 110
Thr Gln Asn Asp Thr Gly Phe Tyr Thr Leu Gln Val Ile Lys Ser Asp
115 120 125
Leu Val Asn Gln Gln Ala Thr Gly Gln Phe His Val Tyr Pro Gln Leu
130 135 140
Pro Lys Pro Ser Ile Ser Ser Asn Asn Ser Asn Pro Val Gln Asp Lys
145 150 155 160
Asp Ala Val Ala Phe Thr Cys Gln Pro Gln Thr Gln Asp Thr Thr Tyr
165 170 175
Leu Trp Trp Ile Asn Asn Gln Ser Leu Pro Val Ser Pro Arg Leu Gln
180 185 190
Leu Ser Asn Gly Asn Arg Thr Leu Thr Leu Leu Ser Val Thr Arg Asn
195 200 205
Asp Thr Gly Pro Tyr Gln Cys Gln Ile Gln Asn Pro Val Ser Ala Asn
210 215 220
Arg Ser Asp Pro Val Thr Leu Asn Val Thr Tyr Gly Pro Asp Thr Pro
225 230 235 240
Thr Ile Ser Pro Ser Asp Thr Tyr Tyr Arg Pro Gly Ala Asn Leu Ser
245 250 255
Leu Ser Cys Tyr Ala Ala Ser Asn Pro Pro Ala Gln Tyr Ser Trp Leu
260 265 270
Ile Asn Gly Thr Phe Gln Gln Ser Thr Gln Gln Leu Phe Ile Pro Asn
275 280 285
Ile Thr Val Asn Asn Ser Gly Ser Tyr Thr Cys His Ala Asn Asn Ser
290 295 300

```

Val Thr Gly Cys Asn Arg Thr Thr Val Lys Thr Ile Ile Val Thr Glu
305          310          315          320
Leu Ser Pro Val Val Ala Lys Pro Gln Ile Lys Ala Ser Lys Thr Thr
325          330          335
Val Thr Gly Asp Lys Asp Ser Val Asn Leu Thr Cys Ser Thr Asn Asp
340          345          350
Thr Gly Ile Ser Ile Arg Trp Phe Phe Lys Asn Gln Ser Leu Pro Ser
355          360          365
Ser Gln Arg Met Lys Leu Ser Gln Gly Asn Thr Thr Leu Ser Ile Asn
370          375          380
Pro Val Lys Arg Gln Asp Ala Gly Thr Tyr Trp Cys Glu Val Phe Asn
385          390          395          400
Pro Ile Ser Lys Asn Gln Ser Asp Pro Ile Met Leu Asn Val Asn Tyr
405          410          415
Asn Ala Leu Pro Gln Glu Asn Gly Leu Ser Pro Gly Ala Ile Ala Gly
420          425          430
Ile Val Ile Gly Val Val Ala Leu Val Ala Leu Ile Ala Val Ala Leu
435          440          445
Ala Cys Phe Leu His Phe Gly Lys Thr Gly Arg Ala Ser Asp Gln Arg
450          455          460
Asp Leu Thr Glu His Lys Pro Ser Val Ser Asn His Thr Gln Asp His
465          470          475          480
Ser Asn Asp Pro Pro Asn Lys Met Asn Glu Val Thr Tyr Ser Thr Leu
485          490          495
Asn Phe Glu Ala Gln Gln Pro Thr Gln Pro Thr Ser Ala Ser Pro Ser
500          505          510
Leu Thr Ala Thr Glu Ile Ile Tyr Ser Glu Val Lys Lys Gln
515          520          525

```

<210> 7
 <211> 120
 <212> PPT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> DOMAIN
 <223> Послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга mAb47

```

<400> 7
Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Gln Leu Lys Lys Pro Gly Glu
1          5          10          15
Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
20          25          30
Gly Met Ser Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
35          40          45
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50          55          60
Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80
Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85          90          95
Ala Arg Arg Gly Asn Tyr Gly Arg Trp Asp Phe Asp Val Trp Gly Thr
100          105          110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115          120

```

<210> 8

<211> 108
 <212> FRT
 <213> Mus musculus

<220>

<221> DOMAIN

<223> Послідовність змінливої ділянки легкого ланцюга жAb47

<400> 3

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ala Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Gln Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Thr Ile Ser Ser Ser
 20 25 30
 Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gln Thr Ser Pro Lys Pro Trp
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Gln
 65 70 75 80
 Ala Gln Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ile Tyr Pro
 85 90 95
 Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Gln Leu Lys
 100 105

<210> 3

<211> 119

<212> FRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DOMAIN

<223> Послідовність змінливої ділянки важкого ланцюга жAb63

<400> 3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gln Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Phe
 20 25 30
 Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Gln Trp Ile
 35 40 45
 Gly Asp Ile Phe Pro Lys Asn Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Arg Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Phe Arg Ser Leu Thr Leu Gln Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Gly Tyr Gly Asn Tyr Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Ile Phe Thr Val Ser Ser
 115

<210> 10

<211> 107

<212> FRT

<213> Mus musculus

<220>
 <221> DOMAIN
 <223> Послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга κAb63

<400> 10
 Asp Val Gln Met Thr Gln Thr Pro Ser Ala Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Thr Ser Gln Asp Ile Asn Ile Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Arg Ser Gly Leu Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Gln Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Gln Ile Lys
 100 105

<210> 11
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> DOMAIN
 <223> Послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга κAb67

<400> 11
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gln Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Tyr Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 His Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Gln Trp Ile
 35 40 45
 Gly Asp Ile Asn Pro Asp Ile Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Arg Ser Leu Thr Ser Gln Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Arg Trp Asp Phe Asp Ser Phe Ala Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 12
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> DOMAIN
 <223> Послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга κAb67

```

<400> 12
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Met Ser Leu Gly
1      5      10      15
Lys Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ile Ile
      20      25      30
Gly Thr Asn Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
      35      40      45
Lys Leu Leu Ile Tyr His Ala Ser Asn Leu Gln Thr Gly Val Pro Ala
      50      55      60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp
      65      70      75      80
Pro Val Gln Gly Asp Asp Val Ala Leu Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg
      85      90      95
Lys Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Met Gln Ile Lys
      100      105      110

```

```

<210> 13
<211> 122
<212> PRT
<213> Mus musculus

```

```

<220>
<221> DOMAIN
<223> Послідовність змінливої ділянки важкого ланцюга mAb103

```

```

<400> 13
Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Gln Leu Lys Lys Pro Gly Gln
1      5      10      15
Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
      20      25      30
Gly Val Ile Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
      35      40      45
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
      50      55      60
Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Gln Thr Ser Ala Ser Thr Ala Phe
      65      70      75      80
Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Gln Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
      85      90      95
Ala Arg Lys Lys Thr Leu Thr Thr Val Thr Pro Trp Phe Ala Tyr Trp
      100      105      110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
      115      120

```

```

<210> 14
<211> 118
<212> PRT
<213> Mus musculus

```

```

<220>
<221> DOMAIN
<223> Послідовність змінливої ділянки легкого ланцюга mAb103

```

```

<400> 14
Asp Leu Val Val Thr Gln Ser Ser Ser Ala Ser Phe Ser Leu Gly Ala
1      5      10      15

```

Ser Ala Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr
 20 25 30
 Ile Gln Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Leu Lys Pro Pro Lys Tyr Val Met
 35 40 45
 Gln Leu Lys Lys Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Asp Arg Tyr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Asn Ile Gln Pro Gln Asp Gln Ala Ile Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asn
 85 90 95
 Thr Ile Lys Gln Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
 100 105 110
 Thr Val Leu
 115

<210> 18
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> DOMAIN
 <223> Послідовність: HCDR1 важкого ланцюга mAb47

<400> 18
 Thr Tyr Gly Met Ser
 1 5

<210> 16
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> DOMAIN
 <223> Послідовність: HCDR2 важкого ланцюга mAb47/mAb103

<400> 16
 Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 17
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> DOMAIN
 <223> Послідовність: HCDR3 важкого ланцюга mAb47

<400> 17
 Arg Gly Asn Tyr Gly Arg Trp Asp Phe Asp Val
 1 5 10

--

<210> 18
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> ДОМЕН
 <223> Послідовність LCDR1 легкого ланцюга mAb47

<400> 18
 Ser Val Ser Ser Thr Ile Ser Ser Ser Asn Leu His
 1 5 10

<210> 18
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> ДОМЕН
 <223> Послідовність LCDR2 легкого ланцюга mAb47

<400> 18
 Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5

<210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> ДОМЕН
 <223> Послідовність LCDR3 легкого ланцюга mAb47

<400> 20
 Gln Gln Trp Ser Ile Tyr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 21
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> ДОМЕН
 <223> Послідовність HCDR1 важкого ланцюга mAb63

<400> 21
 Asp Phe Tyr Met Asn
 1 5

<210> 22

<211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> DOMAIN
 <223> Послідовність HCDR2 важкого ланцюга mAb63

<400> 22
 Asp Ile Phe Pro Lys Asn Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Arg Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Asp

<210> 23
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> DOMAIN
 <223> Послідовність HCDR3 важкого ланцюга mAb63

<400> 23
 Ser Gly Tyr Gly Asn Tyr Val Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 24
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> DOMAIN
 <223> Послідовність LCDR1 легкого ланцюга mAb63

<400> 24
 Arg Thr Ser Gln Asp Ile Asn Ile Tyr Leu Asn
 1 5 10

<210> 25
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> DOMAIN
 <223> Послідовність LCDR2 легкого ланцюга mAb63

<400> 25
 Tyr Arg Ser Gly Leu Leu Ser
 1 5

<210> 26

<211> 3
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> DOMAIN
 <223> Послідовність LCOR3 легкого ланцюга mAb63

<400> 25
 Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Pro Thr
 1 5

<210> 27
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> DOMAIN
 <223> Послідовність HCDR1 важкого ланцюга mAb67

<400> 27
 Asp Tyr His Met Asn
 1 5

<210> 29
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> DOMAIN
 <223> Послідовність HCDR2 важкого ланцюга mAb67

<400> 29
 Asp Ile Asn Pro Asp Ile Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 29
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> DOMAIN
 <223> Послідовність HCDR3 важкого ланцюга mAb67

<400> 29
 Trp Asp Phe Asp Ser Phe Ala Asn
 1 5

<210> 30

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> DOMEN
 <223> Послідовність LCDB1 легкого ланцюга mAb67

<400> 30
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ile Ile Gly Thr Asn Leu Ile His
 1 5 10 15

<210> 31
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> DOMEN
 <223> Послідовність LCDB2 легкого ланцюга mAb67

<400> 31
 His Ala Ser Asn Leu Gln Thr
 1 5

<210> 32
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> DOMEN
 <223> Послідовність LCDB3 легкого ланцюга mAb67

<400> 32
 Leu Gln Ser Arg Lys Ile Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 33
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> DOMEN
 <223> Послідовність HCDR1 важкого ланцюга mAb103

<400> 33
 Thr Tyr Gly Val Ile
 1 5

<210> 34
 <211> 13
 <212> PRT

<210> Mus musculus

<220>

<221> DOMEN

<223> Последовательность HCDR3 важного ланцюга mAb103

<400> 34

Lys Lys Thr Leu Thr Thr Val Thr Pro Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 38

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DOMEN

<223> Последовательность LCDR1 легкого ланцюга mAb103

<400> 35

Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Glu
1 5 10

<210> 36

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DOMEN

<223> Последовательность LCDR2 легкого ланцюга mAb103

<400> 36

Leu Lys Lys Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp
1 5 10

<210> 37

<211> 13

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> DOMEN

<223> Последовательность LCDR3 легкого ланцюга mAb103

<400> 37

Gly Val Gly Asn Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val
1 5 10

<210> 38

<211> 17

<212> PRT

<213> Штучна последовательность

<220>
 <221> DOMAIN
 <223> Мутантна послідовність HCDR2 важкого ланцюга (D618) mAb47/mAb103

<400> 38
 Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Ser Asp Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 38
 <211> 120
 <212> FRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <221> DOMAIN
 <223> Послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга h47VH1
 гуманізованого антитіла mAb47

<400> 38
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Gln Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Gln Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Gly Asn Tyr Gly Arg Trp Asp Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 40
 <211> 120
 <212> FRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <221> DOMAIN
 <223> Послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга h47VH2
 гуманізованого антитіла mAb47

<400> 40
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Gln Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met

```

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50          65          80
Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65          70          75          80
Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85          90          95
Ala Arg Arg Gly Asn Tyr Gly Arg Trp Asp Phe Asp Val Trp Gly Gln
      100          105          110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      115          120

```

```

<210> 41
<211> 120
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

```

```

<220>
<221> DOMAIN
<223> Послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга h47VH3
гуманізованого антитіла hAb47

```

```

<400> 41
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1          5          10          15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
      20          25          30
Gly Met Ser Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
      35          40          45
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50          55          60
Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65          70          75          80
Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85          90          95
Ala Arg Arg Gly Asn Tyr Gly Arg Trp Asp Phe Asp Val Trp Gly Gln
      100          105          110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      115          120

```

```

<210> 42
<211> 120
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

```

```

<220>
<221> DOMAIN
<223> Послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга h47VH4
гуманізованого антитіла hAb47

```

```

<400> 42
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1          5          10          15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
      20          25          30
Gly Met Ser Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
      35          40          45

```

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Ser Asp Phe
 50 65 80
 Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Gly Asn Tyr Gly Arg Trp Asp Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 43
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <221> DOMAIN
 <223> Послідовність змінливої ділянки легкого ланцюга h47VL1
 гуманізованого антитіла hAb47

<400> 43
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Thr Ile Ser Ser Ser
 20 25 30
 Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 Ile Lys Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu
 65 70 75 80
 Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ile Tyr Pro
 85 90 95
 Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 44
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <221> DOMAIN
 <223> Послідовність змінливої ділянки легкого ланцюга h47VL2
 гуманізованого антитіла hAb47

<400> 44
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Thr Ile Ser Ser Ser
 20 25 30
 Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Pro Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu
 65 70 75 80
 Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ile Tyr Pro
 85 90 95
 Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 45
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Научна послідовність

<220>
 <221> DOMAIN
 <223> Послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга h47VL3
 гуманізованого антитіла mAb47

<400> 45
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Thr Ile Ser Ser Ser
 20 25 30
 Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Pro Trp
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu
 65 70 75 80
 Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ile Tyr Pro
 85 90 95
 Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 46
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Научна послідовність

<220>
 <221> DOMAIN
 <223> Послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга h47VL4
 гуманізованого антитіла mAb47

<400> 46
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Thr Ile Ser Ser Ser
 20 25 30
 Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Pro Trp
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu
 65 70 75 80
 Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ile Tyr Pro
 85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 47

<211> 17

<212> PRT

<213> Штука послідовності

<220>

<221> DOMAIN

<223> Мутантна послідовність HCDR2 важкого ланцюга (N548) mAb63

<400> 47

Asp Ile Phe Pro Lys Ser Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Arg Lys Phe Lys

1 5 10 15

Asp

<210> 48

<211> 119

<212> PRT

<213> Штука послідовності

<220>

<221> DOMAIN

<223> Послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга h63VH1 гуманізованого антитіла mAb63

<400> 48

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Phe

20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Asp Ile Phe Pro Lys Asn Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Arg Lys Phe

50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ser Gly Tyr Gly Asn Tyr Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 49

<211> 119

<212> PRT

<213> Штука послідовності

<220>

<221> DOMAIN

<223> Послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга h63VH2 гуманізованого антитіла mAb63

```

<400> 48
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1      5      10      15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Phe
20      25      30
Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Met
35      40      45
Gly Asp Ile Phe Pro Lys Asn Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Arg Lys Phe
50      55      60
Lys Asp Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65      70      75      80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85      90      95
Ala Arg Ser Gly Tyr Gly Asn Tyr Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100      105      110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

```

```

<210> 50
<211> 118
<212> FRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> DOMAIN
<223> Послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга h63VH3
гуманізованого антитіла mAb63

```

```

<400> 50
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1      5      10      15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Phe
20      25      30
Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Ile
35      40      45
Gly Asp Ile Phe Pro Lys Asn Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Arg Lys Phe
50      55      60
Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65      70      75      80
Met Glu Phe Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85      90      95
Ala Arg Ser Gly Tyr Gly Asn Tyr Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100      105      110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

```

```

<210> 51
<211> 118
<212> FRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> DOMAIN
<223> Послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга h63VH4
гуманізованого антитіла mAb63

```

```

<400> 51
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1      5      10      15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Phe
20      25      30
Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Ile
35      40      45
Gly Asp Ile Phe Pro Lys Asn Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Arg Lys Phe
50      55      60
Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65      70      75      80
Met Glu Phe Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85      90      95
Ala Arg Ser Gly Tyr Gly Asn Tyr Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100      105      110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 52
<211> 119
<212> PRT
<213> Екучена послідовність

<220>
<221> DOMAIN
<223> Послідовність записаної ділянки важкого ланцюга h53VH5
гуманізованого антитіла mAb53

<400> 52
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1      5      10      15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Phe
20      25      30
Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Met
35      40      45
Gly Asp Ile Phe Pro Lys Ser Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Arg Lys Phe
50      55      60
Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65      70      75      80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85      90      95
Ala Arg Ser Gly Tyr Gly Asn Tyr Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100      105      110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 53
<211> 107
<212> PRT
<213> Екучена послідовність

<220>
<221> DOMAIN
<223> Послідовність записаної ділянки легкого ланцюга h53VL1
гуманізованого антитіла mAb53

```

<400> 53

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Asp Ile Asn Ile Tyr
20           25           30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35           40           45
Tyr Tyr Arg Ser Gly Leu Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80
Gln Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Pro
85           90           95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100           105

```

<210> 54

<211> 107

<212> FRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> ДОМЕН

<223> Послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга h63VL2 гуманізованого антитіла mAb63

<400> 54

```

Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Asp Ile Asn Ile Tyr
20           25           30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35           40           45
Tyr Tyr Arg Ser Gly Leu Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80
Gln Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Pro
85           90           95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100           105

```

<210> 55

<211> 107

<212> FRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> ДОМЕН

<223> Послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга h63VL3 гуманізованого антитіла mAb63

<400> 55

```

Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15

```

```

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Asp Ile Asn Ile Tyr
    20                      25                      30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gly Ala Val Lys Leu Leu Ile
    35                      40                      45
Tyr Tyr Arg Ser Gly Leu Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                      55                      60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
    65                      70                      75                      80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Pro
    85                      90                      95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
    100                      105

```

<210> 86
 <211> 117
 <212> FRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <221> DOMAIN
 <223> Послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга h67VH1
 гуманізованого антитіла mAb67

```

<400> 86
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1      5      10      15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
    20      25      30
His Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
    35      40      45
Gly Asp Ile Asn Pro Asp Ile Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe
    50      55      60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
    65      70      75      80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
    85      90      95
Ala Arg Trp Asp Phe Asp Ser Phe Ala Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu
    100      105      110
Val Thr Val Ser Ser
    115

```

<210> 87
 <211> 117
 <212> FRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <221> DOMAIN
 <223> Послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга h67VH2
 гуманізованого антитіла mAb67

```

<400> 87
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1      5      10      15
Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
    20      25      30

```

```

His Met Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
  35              40              45
Gly Asp Ile Asn Pro Asp Ile Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe
  50              55              60
Lys Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
  65              70              75              80
Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
  85              90              95
Ala Arg Trp Asp Phe Asp Ser Phe Ala Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100              105              110
Val Thr Val Ser Ser
 115

```

<210> 53
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Енучна послідовність

<220>
 <221> ДОМЕН
 <223> Послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга h67VH3
 гуманізованого антитіла hAb67

```

<400> 53
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Gln
1      5              10              15
Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
  20              25              30
His Met Asn Trp Val Lys Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
  35              40              45
Gly Asp Ile Asn Pro Asp Ile Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe
  50              55              60
Lys Gly Lys Val Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
  65              70              75              80
Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
  85              90              95
Ala Arg Trp Asp Phe Asp Ser Phe Ala Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100              105              110
Val Thr Val Ser Ser
 115

```

<210> 53
 <211> 111
 <212> PPT
 <213> Енучна послідовність

<220>
 <221> ДОМЕН
 <223> Послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга h67VL1
 гуманізованого антитіла hAb67

```

<400> 53
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1      5              10              15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Ile Ile
  20              25              30

```

```

Gly Thr Asn Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35              40              45
Lys Leu Leu Ile Tyr His Ala Ser Asn Leu Gln Thr Gly Val Pro Asp
 50              55              60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65              70              75              80
Ser Leu Gln Ala Gln Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg
 85              90              95
Lys Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Gln Ile Lys
100              105              110

```

<210> 60

<211> 111

<212> FRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> DOMAIN

<223> Послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга h67VL2 гуманізованого антитіла mAb67

<400> 60

```

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1      5              10              15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Ile Ile
20      25              30
Gly Thr Asn Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35      40              45
Arg Leu Leu Ile Tyr His Ala Ser Asn Leu Gln Thr Gly Ile Pro Ala
50      55              60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65      70              75              80
Ser Leu Gln Ser Gln Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg
85      90              95
Lys Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Gln Ile Lys
100      105              110

```

<210> 61

<211> 111

<212> FRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> DOMAIN

<223> Послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга h67VL3 гуманізованого антитіла mAb67

<400> 61

```

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1      5              10              15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Ile Ile
20      25              30
Gly Thr Asn Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35      40              45
Arg Leu Leu Ile Tyr His Ala Ser Asn Leu Gln Thr Gly Val Pro Ala
50      55              60

```

```

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 5 70 75 80
Ser Leu Gln Ser Gln Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg
 85 90 95
Lys Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

```

<210> 62
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <221> DOMAIN
 <223> Послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга h67VL4
 гуманізованого антитіла mAb67

```

<400> 61
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Ile Ile
 20 25 30
Gly Thr Asn Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 35 40 45
Lys Leu Leu Ile Tyr His Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser
 50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg
 85 90 95
Lys Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

```

<210> 63
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <221> DOMAIN
 <223> Послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга h67VL5
 гуманізованого антитіла mAb67

```

<400> 63
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Ile Ile
 20 25 30
Gly Thr Asn Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro
 35 40 45
Lys Leu Leu Ile Tyr His Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser
 50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg
 85 90 95

```

Lys Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 64

<211> 11

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> DOMAIN

<223> Мутантна послідовність легкого ланцюга LCDR2 (D66E) mAb103

<400> 64

Leu Lys Lys Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Glu
1 5 10

<210> 66

<211> 122

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> DOMAIN

<223> Послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга h10GVH1
гуманізованого антитіла mAb103

<400> 66

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
20 25 30
Gly Val Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Lys Lys Thr Leu Thr Thr Val Thr Pro Trp Phe Ala Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 66

<211> 122

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> DOMAIN

<223> Послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга h10GVH1
гуманізованого антитіла mAb103

<400> 66

```

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1      5      10      15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
20     25     30
Gly Val Ile Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
35     40     45
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50     55     60
Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65     70     75     80
Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85     90     95
Ala Arg Lys Lys Thr Leu Thr Thr Val Thr Pro Trp Phe Ala Tyr Trp
100    105    110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115    120

```

```

<210> 67
<211> 122
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

```

```

<220>
<221> DOMAIN
<222> Послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга h103VH3
гуманізованого антитіла mAb103

```

```

<400> 67
Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1      5      10      15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
20     25     30
Gly Val Ile Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
35     40     45
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50     55     60
Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65     70     75     80
Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85     90     95
Ala Arg Lys Lys Thr Leu Thr Thr Val Thr Pro Trp Phe Ala Tyr Trp
100    105    110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115    120

```

```

<210> 63
<211> 122
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

```

```

<220>
<221> DOMAIN
<222> Послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга h103VH4
гуманізованого антитіла mAb103

```

```

<400> 63

```

```

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1      5      10      15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
20      25      30
Gly Val Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35      40      45
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Ser Asp Phe
50      55      60
Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65      70      75      80
Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85      90      95
Ala Arg Lys Lys Thr Leu Thr Thr Val Thr Pro Trp Phe Ala Tyr Trp
100     105     110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115     120

```

```

<210> 69
<211> 116
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

```

```

<220>
<221> DOMAIN
<223> Послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга h103VL1
гуманізованого антитіла mAb103

```

```

<400> 69
Glu Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
1      5      10      15
Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr
20      25      30
Ile Glu Trp His Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg Tyr Leu Met
35      40      45
Glu Leu Lys Lys Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp
50      55      60
Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser
65      70      75      80
Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asn
85      90      95
Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
100     105     110
Thr Val Leu
115

```

```

<210> 70
<211> 116
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

```

```

<220>
<221> DOMAIN
<223> Послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга h103VL2
гуманізованого антитіла mAb103

```

```

<400> 70

```

```

Glu Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
1      5      10      15
Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr
20     25     30
Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Gln Lys Gly Pro Arg Tyr Leu Met
35     40     45
Glu Leu Lys Lys Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp
50     55     60
Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser
65     70     75     80
Ser Leu Gln Ser Gln Asp Gln Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp
85     90     95
Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu
100    105    110
Thr Val Leu
115

```

```

<210> 71
<211> 115
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

```

```

<220>
<221> DOMAIN
<222> Послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга h10SVL3
гуманізованого антитіла mAb103

```

```

<400> 71
Glu Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
1      5      10      15
Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr
20     25     30
Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Gln Lys Gly Pro Arg Tyr Val Met
35     40     45
Glu Leu Lys Lys Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp
50     55     60
Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser
65     70     75     80
Ser Leu Gln Ser Gln Asp Gln Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp
85     90     95
Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu
100    105    110
Thr Val Leu
115

```

```

<210> 72
<211> 115
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

```

```

<220>
<221> DOMAIN
<222> Послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга h10SVL4
гуманізованого антитіла mAb103

```

```

<400> 72

```

```

Glu Leu Val Val Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
1      5      10      15
Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr
20     25     30
Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg Tyr Val Met
35     40     45
Glu Leu Lys Lys Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp
50     55     60
Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser
65     70     75     80
Ser Leu Gln Ser Gln Asp Gln Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asn
85     90     95
Thr Ile Lys Gln Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
100    105    110
Thr Val Leu
115

```

```

<210> 73
<211> 115
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

```

```

<220>
<221> DOMAIN
<223> Послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга h103VL6
гуманізованого антитіла mAb103

```

```

<400> 73
Glu Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
1      5      10      15
Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr
20     25     30
Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Pro Pro Arg Tyr Val Met
35     40     45
Glu Leu Lys Lys Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp
50     55     60
Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser
65     70     75     80
Ser Leu Gln Ser Gln Asp Gln Ala Asp Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asn
85     90     95
Thr Ile Lys Gln Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
100    105    110
Thr Val Leu
115

```

```

<210> 74
<211> 115
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

```

```

<220>
<221> DOMAIN
<223> Послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга h103VL6
гуманізованого антитіла mAb103

```

```

<400> 74

```

```

Gln Leu Val Val Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
1      5      10      15
Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr
      20      25      30
Ile Gln Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Gln Lys Pro Pro Arg Tyr Val Met
      35      40      45
Gln Leu Lys Lys Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp
      50      55      60
Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Gln Arg Tyr Leu Thr Ile Ser
      65      70      75      80
Ser Leu Gln Ser Gln Asp Gln Ala Asp Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asn
      85      90      95
Thr Ile Lys Gln Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
      100      105      110
Thr Val Leu
      115

```

<210> 76
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <221> DOMAIN
 <223> Послідовність: варіабельної ділянки легкого ланцюга h103VL7
 гуманізованого антитіла mAb103

```

<400> 76
Gln Leu Val Val Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
1      5      10      15
Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr
      20      25      30
Ile Gln Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Gln Lys Pro Pro Arg Tyr Val Met
      35      40      45
Gln Leu Lys Lys Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp
      50      55      60
Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Asp Arg Tyr Leu Thr Ile Ser
      65      70      75      80
Ser Leu Gln Ser Gln Asp Gln Ala Asp Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asn
      85      90      95
Thr Ile Lys Gln Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
      100      105      110
Thr Val Leu
      115

```

<210> 76
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <221> DOMAIN
 <223> Послідовність: варіабельної ділянки легкого ланцюга h103VL8
 гуманізованого антитіла mAb103

<400> 76

```

Glu Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
1      5      10      15
Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr
      20      25      30
Ile Gln Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Gln Lys Gly Pro Arg Tyr Val Met
      35      40      45
Glu Leu Lys Lys Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Gln Gly Ile Pro Asp
      50      55      60
Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Gln Arg Tyr Leu Thr Ile Ser
      65      70      75      80
Ser Leu Gln Ser Gln Asp Gln Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asn
      85      90      95
Thr Ile Lys Gln Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu
      100      105      110
Thr Val Leu
      115

```

<210> 77
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <221> ESMEN
 <222> Константна ділянка важкого ланцюга IgG1 людини

```

<400> 77
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1      5      10      15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
      20      25      30
Phe Pro Gln Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
      35      40      45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
      50      55      60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
      65      70      75      80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
      85      90      95
Lys Val Gln Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
      100      105      110
Pro Ala Pro Gln Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
      115      120      125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Gln Val Thr Cys
      130      135      140
Val Val Val Asp Val Ser His Gln Asp Pro Gln Val Lys Phe Asn Trp
      145      150      155      160
Tyr Val Asp Gly Val Gln Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Gln
      165      170      175
Gln Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
      180      185      190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Gln Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
      195      200      205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Gln Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
      210      215      220
Gln Pro Arg Gln Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Gln
      225      230      235      240

```

```

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
    245          250          255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Gln Trp Gln Ser Asn Gly Gln Pro Gln Asn
    260          265          270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
    275          280          285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
    290          295          300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
    305          310          315          320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    325          330

```

<210> 78
 <211> 107
 <212> FRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <221> DOWNEN
 <223> Послідовність ланцюга постійної ділянки легкого ланцюга людини

```

<400> 78
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1          5          10          15
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
    20          25          30
Tyr Pro Arg Gln Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
    35          40          45
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Gln Gln Asp Ser Lys Asp Ser
    50          55          60
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
    65          70          75          80
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
    85          90          95
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    100          105

```

<210> 78
 <211> 106
 <212> FRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <221> DOWNEN
 <223> Послідовність ланцюга постійної ділянки легкого ланцюга людини

```

<400> 78
Gly Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
1          5          10          15
Gln Gln Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
    20          25          30
Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro
    35          40          45
Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
    50          55          60

```

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Gln Gln Trp Lys
 65 70 75 80
 Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Gln Gly Ser Thr Val
 85 90 95
 Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 100 105

<210> 80
 <211> 449
 <212> PRI
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <221> SAMMKT
 <223> Послідовність вакцинного ланцюга Hu53-13

<400> 80
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Phe
 20 25 30
 Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Met
 35 40 45
 Gly Asp Ile Phe Pro Lys Ser Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Arg Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Gly Tyr Gly Asn Tyr Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Gln Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Gln Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Gln Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Gln Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys

<210> 81
 <211> 214
 <212> F8T
 <213> Екзучка послідовності
 <220>
 <221> ланцюг
 <223> Послідовність легкого ланцюга Hu63-13

<400> 81
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Asp Ile Asn Ile Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Arg Ser Gly Leu Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Gln Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Gln Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Gln Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 62
 <211> 450
 <212> 987
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <221> ланцюг
 <223> Послідовність важкого ланцюга Hc47-14

<400> 62
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Ser Asp Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Gly Asn Tyr Gly Arg Trp Asp Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Gln Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Gln Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Gln Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450

<210> 83
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Енучина послідовність

<220>
 <221> ланцюг
 <223> Послідовність ланцюга ланцюга Hs47-14

<400> 83
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Thr Ile Ser Ser Ser
 20 25 30
 Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Pro Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu
 65 70 75 80
 Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ile Tyr Pro
 85 90 95
 Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110
 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Gln Gln Leu Lys Ser
 115 120 125
 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140
 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160
 Gln Gln Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Gln Lys His Lys Val
 180 185 190
 Tyr Ala Cys Gln Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205
 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 84
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Енучина послідовність

<220>

<221> NAME

<223> Последовательность сахарного ланунара Mu87-14

<400> 84

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 His Met Asn Trp Val Lys Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Gln Trp Met
 35 40 45
 Gly Asp Ile Asn Pro Asp Ile Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Asn Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Val Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Trp Asp Phe Asp Ser Phe Ala Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 210 215 220
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 260 265 270
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Gln Tyr Lys
 305 310 315 320
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Gln Ser Asn
 370 375 380
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Gln Ala Leu
 420 425 430
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 38
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <221> ланцюг
 <223> Послідовність ланцюга ланцюга Hu67-14

<400> 35
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ile Ile
 20 25 30
 Gly Thr Asn Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr His Ala Ser Asn Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Pro Gln Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg
 85 90 95
 Lys Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Gln Ile Lys Arg
 100 105 110
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Gln Gln
 115 120 125
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Arg Gln Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160
 Gly Asn Ser Gln Gln Ser Val Thr Gln Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Gln Lys
 180 185 190
 His Lys Val Tyr Ala Cys Gln Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Gln Cys
 210 215

<210> 36
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <221> ланцюг
 <223> Послідовність важкого ланцюга Hu103-32

<400> 36
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Gln Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

```

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
      20      25      30
Gly Val Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Met
      35      40      45
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Pro Thr Tyr Ala Ser Asp Phe
      50      55      60
Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
      65      70      75      80
Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Gln Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95
Ala Arg Lys Lys Thr Leu Thr Thr Val Thr Pro Trp Phe Ala Tyr Trp
      100      105      110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
      115      120      125
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
      130      135      140
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Gln Pro Val Thr
      145      150      155      160
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
      165      170      175
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
      180      185      190
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
      195      200      205
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Gln Pro Lys Ser
      210      215      220
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Gln Leu Leu
      225      230      235      240
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
      245      250      255
Met Ile Ser Arg Thr Pro Gln Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
      260      265      270
His Gln Asp Pro Gln Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Gln
      275      280      285
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Gln Gln Gln Tyr Asn Ser Thr
      290      295      300
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
      305      310      315      320
Gly Lys Gln Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
      325      330      335
Ile Gln Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Gln Pro Gln
      340      345      350
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Gln Leu Thr Lys Asn Gln Val
      355      360      365
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
      370      375      380
Gln Trp Gln Ser Asn Gly Gln Pro Gln Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
      385      390      395      400
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
      405      410      415
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
      420      425      430
Met His Gln Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
      435      440      445
Ser Pro Gly Lys
      450

```

<210> 57

<211> 221
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <221> ланцюг
 <223> Послідовність легкого ланцюга Hs103-32

<400> 37
 Glu Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr
 20 25 30
 Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Gln Lys Gly Pro Arg Tyr Val Met
 35 40 45
 Glu Leu Lys Lys Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Glu Gly Ile Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Ser Gln Asp Gln Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asn
 85 90 95
 Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu
 100 105 110
 Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro
 115 120 125
 Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
 130 135 140
 Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp
 145 150 155 160
 Gly Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln
 165 170 175
 Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu
 180 185 190
 Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly
 195 200 205
 Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215 220

<210> 38
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <221> ланцюг
 <223> Послідовність важкого ланцюга антитіла Sarof1

<400> 38
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Val Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Arg Gly Leu Gln Trp Val
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ile Thr Tyr Ala Pro Ser Thr Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala His Tyr Phe Gly Ser Ser Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Glu Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450

<210> 55

<211> 214

<212> PRI

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> ЛАНЦЮГ

<223> Послідовність легкого ланцюга антитіла Sanofi

<400> 89

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1      5      10      15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Phe Ser Tyr
20     25     30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Val
35     40     45
Tyr Asn Thr Arg Thr Leu Ala Gln Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50     55     60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65     70     75     80
Gln Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Phe
85     90     95
Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Gln Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100    105    110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115    120    125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Gln Ala
130    135    140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145    150    155    160
Gln Ser Val Thr Gln Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165    170    175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Gln Lys His Lys Val Tyr
180    185    190
Ala Cys Gln Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195    200    205
Phe Asn Arg Gly Gln Cys
210

```

<210> 90

<211> 449

<212> CRT

<213> Екзона послідовність

<220>

<221> ланцюг

<223> Послідовність важкого ланцюга антитіла Lma6

<400> 90

```

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Asp Phe Thr Thr Tyr
20     25     30
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Gln Trp Ile
35     40     45
Gly Gln Ile His Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu
50     55     60
Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe
65     70     75     80
Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Gln Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys
85     90     95
Ala Ser Leu Tyr Phe Gly Phe Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100    105    110

```

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Gln Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 155 160 165
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 170 175 180
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 185 190 195
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Gln Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 200 205 210
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Gln Leu Leu Gly Gly Pro
 215 220 225
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 230 235 240
 Arg Thr Pro Gln Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Gln Asp
 245 250 255
 Pro Gln Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Gln Val His Asn
 260 265 270
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Gln Gln Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 275 280 285
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Gln
 290 295 300
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Gln Lys
 305 310 315
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Gln Pro Gln Val Tyr Thr
 320 325 330
 Leu Pro Pro Ser Arg Gln Gln Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 335 340 345
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Gln Trp Gln
 350 355 360
 Ser Asn Gly Gln Pro Gln Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 365 370 375
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 380 385 390
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Gln
 395 400 405
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 410 415 420
 Lys 425 430 435 440 445

<210> 31
 <211> 213
 <212> FRT
 <213> Буквы последовательности

 <220>
 <221> комментарий
 <223> Последовательность серого лаккина животного Lmab

<400> 31
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

```

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ser
      20          25          30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
      35          40          45
Tyr Trp Thr Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
      50          55          60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
      65          70          75          80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Leu Tyr Arg Ser
      85          90          95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
      100          105          110
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
      115          120          125
Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
      130          135          140
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Gln
      145          150          155          160
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
      165          170          175
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Gln Lys His Lys Val Tyr Ala
      180          185          190
Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
      195          200          205
Asn Arg Gly Glu Cys
      210

```

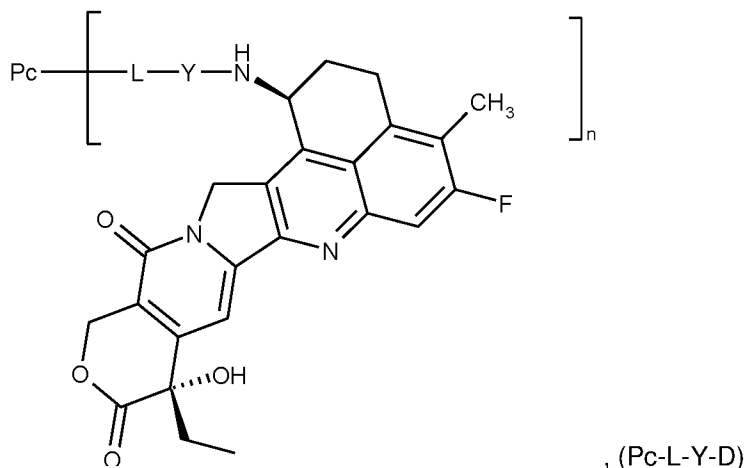
<210> 92
 <211> 4
 <212> FPI
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Тетрадепептидний лінкер

<400> 92
 Gly Gly Phe Gly
 1 4

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Кон'югат антитіло-лікарський засіб, що містить: анти-СЕА-антитіло, або його антигензв'язуючий фрагмент, кон'юговане з токсинним лікарським засобом за допомогою лінкера, де анти-СЕА-антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент містить варіабельну ділянку важкого ланцюга та варіабельну ділянку легкого ланцюга антитіла, при цьому кон'югат
- 10 (антитіло-лікарський засіб являє собою кон'югат антитіло-лікарський засіб загальної формули (Pc-L-Y-D):



в якій:
 $Y \in -O-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-;$

R^a та R^b є однаковими або різними та кожний є незалежно вибраним з групи, що складається з водню, дейтерію, галогену та C_{1-6} алкілу;

R^1 являє собою C_{1-6} галогеналкіл або C_{3-6} циклоалкіл;

R^2 є вибраним з групи, що складається з водню, C_{1-6} галогеналкілу та C_{3-6} циклоалкілу;

5 або R^1 та R^2 , разом з атомами вуглецю, що до нього приєднані, утворюють C_{3-6} циклоалкіл;

m являє собою 0 або 1;

n є десятковим або цілим числом від 1 до 10;

L є лінкерною одиницею;

10 R_c являє собою анти-CEA-антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга та варіабельну ділянку легкого ланцюга, де:

варіабельна ділянка важкого ланцюга включає HCDR1, HCDR2 та HCDR3, представлені у SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 та SEQ ID NO: 23, відповідно, та варіабельна ділянка легкого ланцюга включає LCDR1, LCDR2 та LCDR3, представлені у SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 та SEQ ID NO: 26, відповідно; або

15 варіабельна ділянка важкого ланцюга включає HCDR1, HCDR2 та HCDR3, представлені у SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 47 та SEQ ID NO: 23, відповідно, та варіабельна ділянка легкого ланцюга включає LCDR1, LCDR2 та LCDR3, представлені у SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 та SEQ ID NO: 26, відповідно.

2. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за п. 1, де анти-CEA-антитіло являє собою мишаче антитіло, химерне антитіло або гуманізоване антитіло.

20 3. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за п. 1 або 2, де анти-CEA-антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент містить варіабельну ділянку важкого ланцюга та варіабельну ділянку легкого ланцюга, де:

25 варіабельна ділянка важкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену у SEQ ID NO: 9, та варіабельна ділянка легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену у SEQ ID NO: 10.

4. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за будь-яким одним з пп. 1-3, де анти-CEA-антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент містить варіабельну ділянку важкого ланцюга та варіабельну ділянку легкого ланцюга, де:

30 варіабельна ділянка важкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену у SEQ ID NO: 48, 49, 50, 51 або 52, та варіабельна ділянка легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену у SEQ ID NO: 53, 54 або 55.

5. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за будь-яким одним з пп. 1-4, де анти-CEA-антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент містить варіабельну ділянку важкого ланцюга та варіабельну ділянку легкого ланцюга, де варіабельна ділянка важкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену у SEQ ID NO: 52; та варіабельна ділянка легкого ланцюга має амінокислотну послідовність, представлену у SEQ ID NO: 53.

6. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за будь-яким одним з пп. 1-5, де анти-CEA-антитіло являє собою гуманізоване антитіло, що містить каркасну ділянку, отриману з антитіла людини.

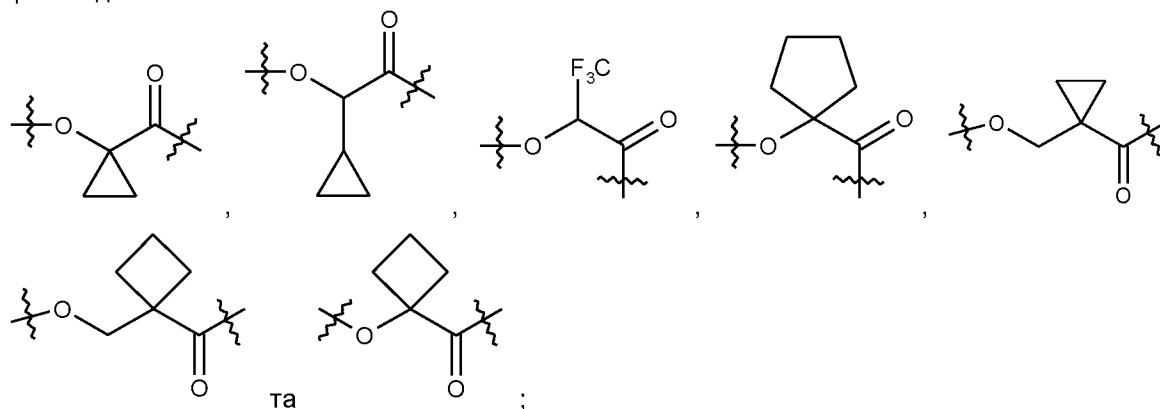
40 7. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за будь-яким одним з пп. 1-6, де анти-CEA-антитіло являє собою гуманізоване антитіло, що містить каркасну ділянку, отриману з антитіла людини, де каркасна ділянка варіабельної ділянки легкого ланцюга включає одну або більше зворотних мутацій амінокислот, вибраних з групи, що складається з 2V, 42G, 44V та 71Y, та/або каркасна ділянка варіабельної ділянки важкого ланцюга включає одну або більше зворотних мутацій амінокислот, вибраних з групи, що складається з 48I, 66K, 67A, 69L, 71V, 73K, 82F та 82A R;

45 де сайти зворотних мутацій є пронумерованими відповідно до схеми нумерації Кабата.
8. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за будь-яким одним з пп. 1-7, де анти-CEA-антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент містить константну ділянку важкого ланцюга та константну ділянку легкого ланцюга антитіла; при цьому константна ділянка важкого ланцюга є вибраною з групи, що складається з константних ділянок IgG1, IgG2, IgG3 та IgG4 людини та їх звичайних варіантів, та константна ділянка легкого ланцюга є вибраною з групи, що складається з константних ділянок κ та λ ланцюга антитіла людини та їх звичайних варіантів.

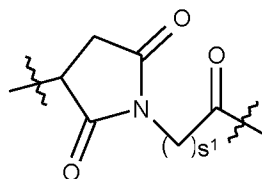
9. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за будь-яким одним з пп. 1-8, де антитіло містить константну ділянку важкого ланцюга, що має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 77, та константну ділянку легкого ланцюга, що має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 78 або SEQ ID NO: 79.

55 10. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за будь-яким одним з пп. 1-9, де анти-CEA-антитіло містить важкий ланцюг, що має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 80, та легкий ланцюг, що має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 81.

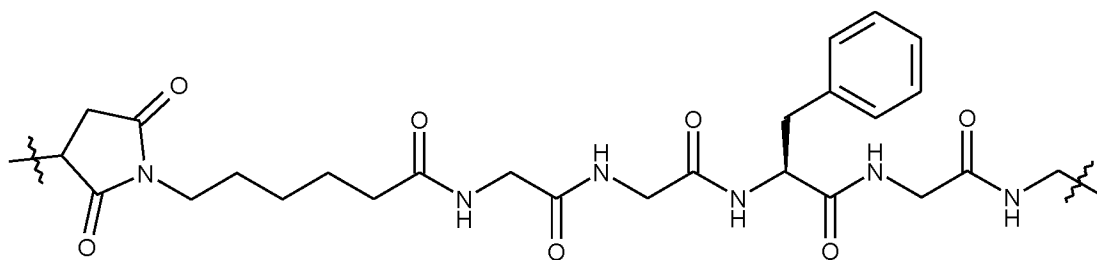
11. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за будь-яким одним з пп. 1-10, де n є цілим або десятковим числом від 2 до 8.
12. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за будь-яким одним з пп. 1-11, де n є цілим або десятковим числом від 4 до 6.
- 5 13. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за будь-яким одним з пп. 1-12, де Y є вибраним з групи, що складається з:



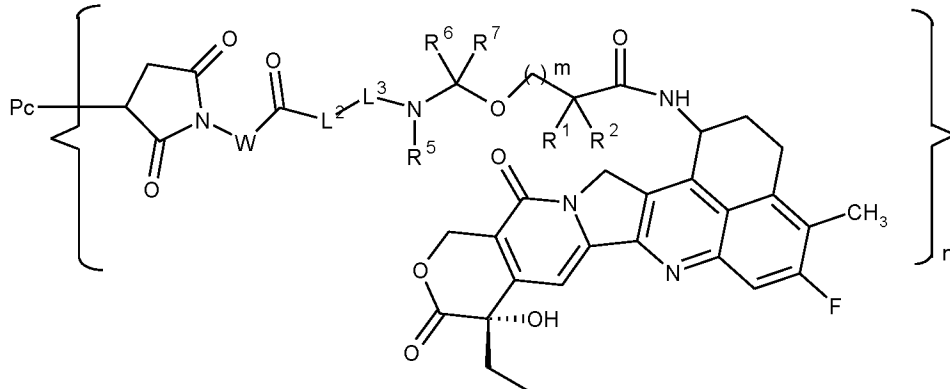
- де
10 О-кінець Y є з'єднаним з лінкерною одиницею L .
14. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за будь-яким одним з пп. 1-13, де лінкерна одиниця $-L-$ являє собою $-L^1-L^2-L^3-L^4-$, де
- L^1 є вибраним з групи, що складається з $-(\text{сукцинімідил-3-іл-N})-W-C(O)-$, $-\text{CH}_2-C(O)-NR^3-W-C(O)-$ та $-C(O)-W-C(O)-$, де W є вибраним з групи, що складається з C_{1-8} алкілу і C_{1-8} алкіл- C_{3-6} циклоалкілу;
- 15 L^2 є вибраним з групи, що складається з $-NR^4(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})^{p^1}\text{CH}_2\text{CH}_2C(O)-$, $-NR^4(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})^{p^1}\text{CH}_2C(O)-$, $-S(\text{CH}_2)^{p^1}C(O)-$ та хімічного зв'язку, де p^1 являє собою ціле число від 1 до 20;
- 20 L^3 являє собою пептидний залишок, що складається з від 2 до 7 амінокислот, де амінокислоти є вибраними з групи, що складається з амінокислотного залишку, утвореного з амінокислот з фенілаланіну, гліцину, валіну, лізину, цитруліну, серину, глутамінової кислоти та аспаргінової кислоти;
- L^4 є вибраним з групи, що складається з $-NR^5(\text{CR}^6\text{R}^7)_t-$, $-C(O)NR^5-$, $-C(O)NR^5(\text{CH}_2)_t-$ та хімічного зв'язку, де t являє собою ціле число від 1 до 6;
- 25 R^3 , R^4 та R^5 є однаковими або різними та кожний є незалежно вибраним з групи, що складається з водню, C_{1-6} алкілу, C_{1-6} галогеналкілу, дейтерованого C_{1-6} алкілу та C_{1-6} гідроксіалкілу;
- R^6 та R^7 є однаковими або різними та кожний є незалежно вибраним з групи, що складається з водню, галогену, C_{1-6} алкілу, C_{1-6} галогеналкілу, дейтерованого C_{1-6} алкілу та C_{1-6} гідроксіалкілу.
- 30 15. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за будь-яким одним з пп. 1-14, де лінкерна одиниця $-L-$ являє собою $-L^1-L^2-L^3-L^4-$, де



- L^1 являє собою , та s^1 являє собою ціле число від 2 до 8;
- L^2 являє собою хімічний зв'язок;
- L^3 являє собою тетрапептидний залишок;
- 35 L^4 являє собою $-NR^5(\text{CR}^6\text{R}^7)_t-$, де R^5 , R^6 та R^7 є однаковими або різними та кожний незалежно являє собою водень або C_{1-6} алкіл, та t являє собою 1 або 2;
- де кінець L^1 є з'єднаним з R^5 , та кінець L^4 є з'єднаним з Y .
16. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за п. 15, де L^3 являє собою тетрапептидний залишок гліцину-гліцину-фенілаланіну-гліцину (GGFG, SEQ ID NO: 92).
- 40 17. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за будь-яким одним з пп. 1-16, де $-L-$ являє собою



18. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за будь-яким одним з п. 1-17, де кон'югат антитіло-лікарський засіб являє собою кон'югат антитіло-лікарський засіб загальної формули (Pc-La-Y-D):



5

, (Pc-La-Y-D)

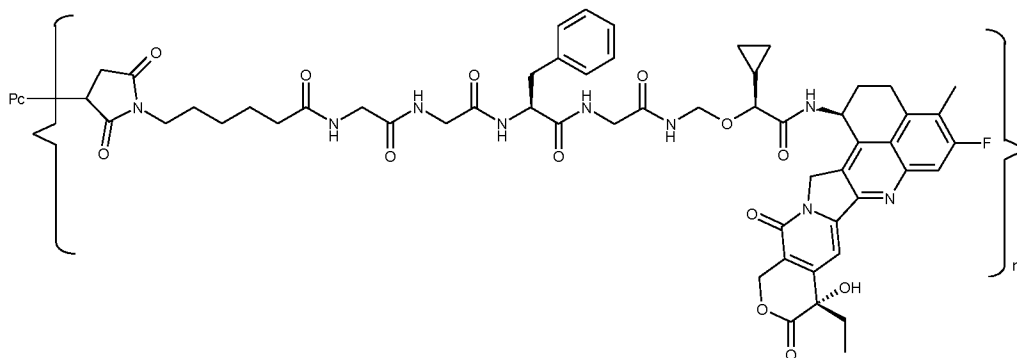
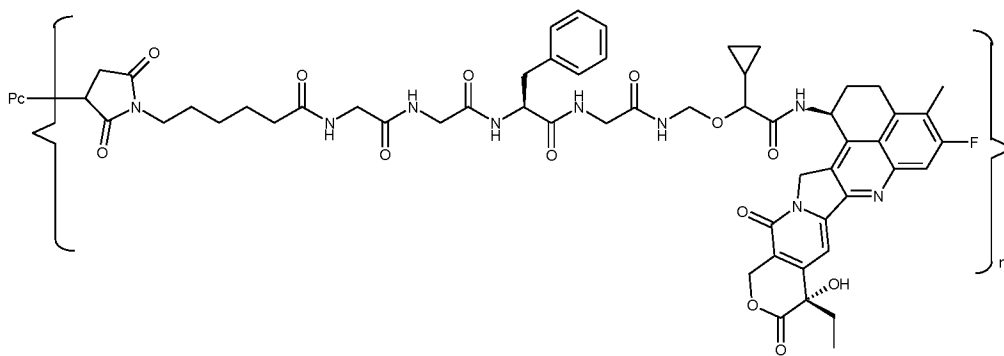
де:

W, L², L³, R⁵, R⁶ та R⁷ є такими, як визначено у п. 14;

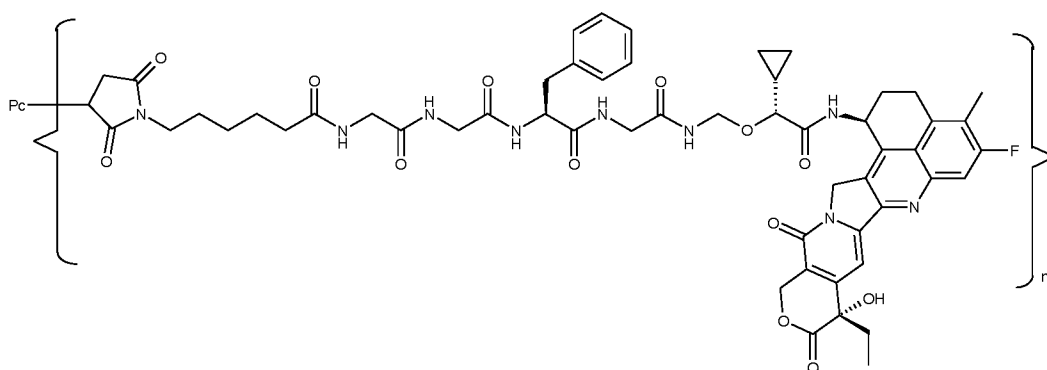
Pc, n, R¹, R² та m є такими, як визначено у п. 1.

10

19. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за будь-яким одним з пп. 1-18, де кон'югат антитіло-лікарський засіб є вибраним з групи, що складається з:

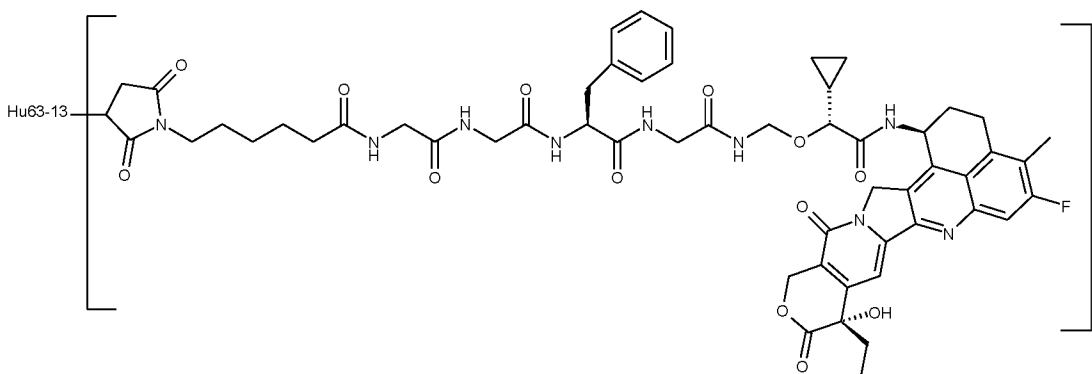


та



де P_c і n є такими, як визначено у п. 1.

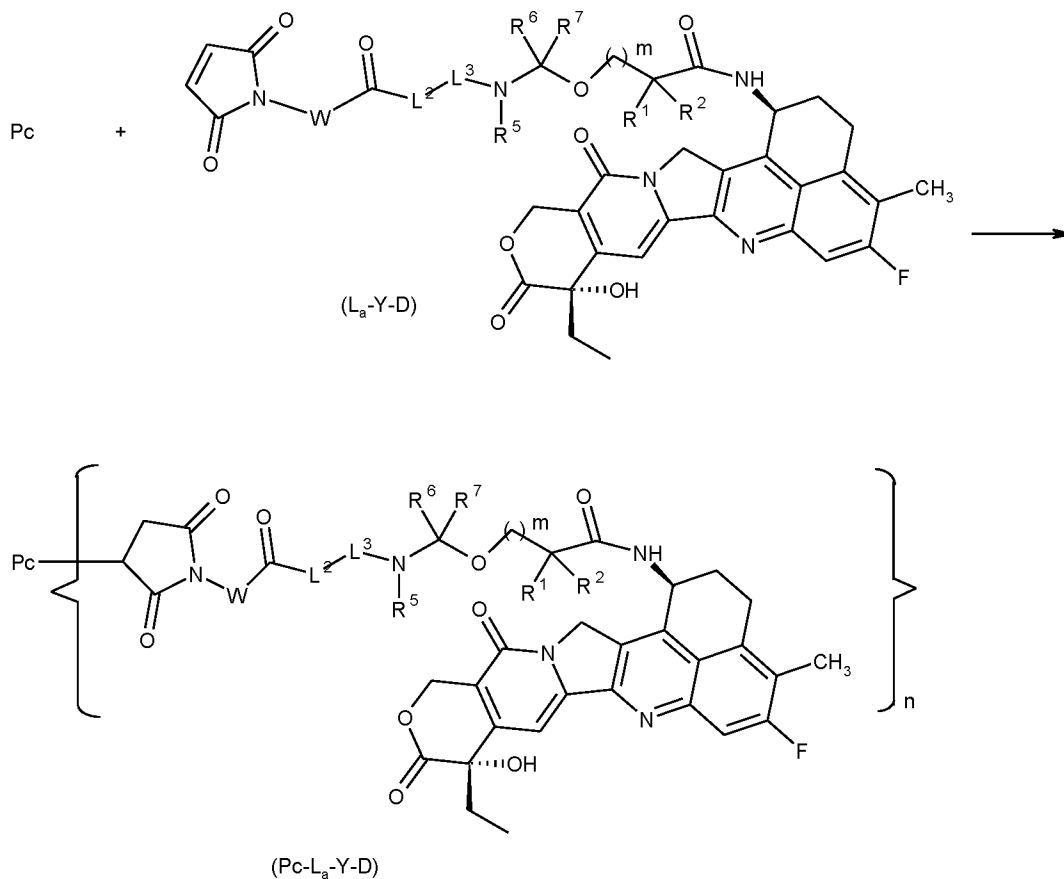
20. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за будь-яким одним з пп. 1-19, де кон'югат антитіло-лікарський засіб є наступним:



де n є таким, як визначено у п. 1;

Hu63-13 містить важкий ланцюг, що має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 80, та легкий ланцюг, що має послідовність, представлену в SEQ ID NO: 81.

21. Спосіб отримання кон'югата антитіло-лікарський засіб загальної формули (Pc-La-Y-D), що включає наступні стадії:



піддавання відновленого Pc та загальної формули (La-Y-D) реакції сполучення з отриманням сполуки загальної формули (Pc-La-Y-D);

де:

Pc являє собою анти-CEA-антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, визначені в будь-якому одному з пп. 1-10;

W, L², L³, R¹, R², R⁵-R⁷, m та n є такими, як визначену у п. 14.

22. Фармацевтична композиція, що містить кон'югат антитіло-лікарський засіб за будь-яким одним з пп. 1-20 та один або більше фармацевтично прийнятних ексципієнтів, розріджувачів або носіїв.

23. Лікарський засіб для лікування захворювання або стану, опосередкованого CEA, що містить кон'югат антитіло-лікарський засіб за будь-яким одним з пп. 1-20 або фармацевтичну композицію за п. 22.

24. Лікарський засіб за п. 23, де захворювання або стан, опосередкований CEA, являє собою рак з високою експресією CEA.

25. Лікарський засіб, виготовлений для лікування та/або попередження пухлини та раку, що містить кон'югат антитіло-лікарський засіб за будь-яким одним з пп. 1-20 або фармацевтичну композицію за п. 22, де пухлина та рак вибрані з групи, що включає: плоскоклітинну карциному голови та шиї, рак голови та шиї, рак мозку, нейрогліому, мультиформну гліобластому, нейробластому, карциному центральної нервової системи, нейроендокринну пухлину, рак горла, рак носоглотки, рак стравоходу, рак щитоподібної залози, злоякісну плевральну мезотеліому, рак легенів, рак молочної залози, рак печінки, гепатобіліарний рак, рак підшлункової залози, рак шлунка, рак шлунково-кишкового тракту, рак кишечника, рак товстої кишки, колоректальний рак, рак нирки, нирковоклітинну карциному, рак яєчників, рак ендометрію, рак шийки матки, рак сечового міхура, рак передміхурової залози, рак яєчка, рак шкіри, меланому, лейкомію, лімфому, рак кістки, хондросаркому, мієлому, множинну мієлому, мієлодиспластичний синдром, пухлину Крукенберга, мієлопроліферативну пухлину, плоскоклітинний рак, саркому Юїнга, системний амілоїдоз легких ланцюгів або клітинну карциному Меркеля.

26. Лікарський засіб за п. 25, де лімфома вибрана з групи, що складається з: лімфоми Ходжкіна, неходжкінської лімфоми, дифузної В-великоклітинної лімфоми, фолікулярної лімфоми,

- первинної медіастинальної В-великоклітинної лімфоми, мантийно-клітинної лімфоми, малої лімфоцитарної лімфоми, В-великоклітинної лімфоми багаті Т-клітинами/гістіоцитами та лімфоплазмацитарної лімфоми; рак легенів є вибраним з групи, що складається з: недрібноклітинного раку легенів та дрібноклітинного раку легенів; та лейкої є вибраною з групи, що складається з: хронічної мієлоїдної лейкої, гострої мієлоїдної лейкої, лімфоцитарної лейкої, лімфобластної лейкої, гострої лімфобластної лейкої, хронічної лімфобластної лейкої та мієлоїдноклітинної лейкої.

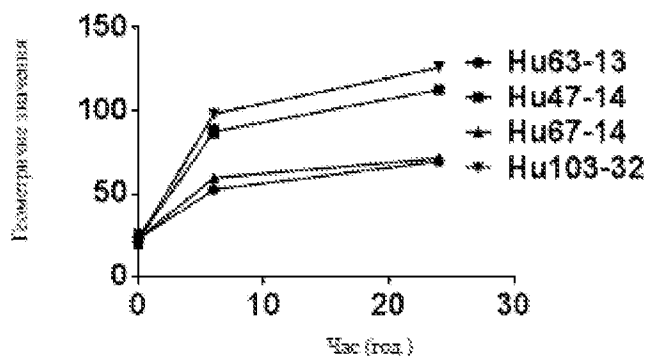


Fig. 1

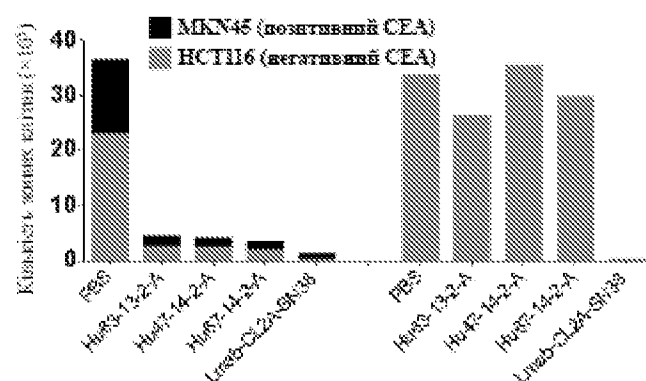


Fig. 2

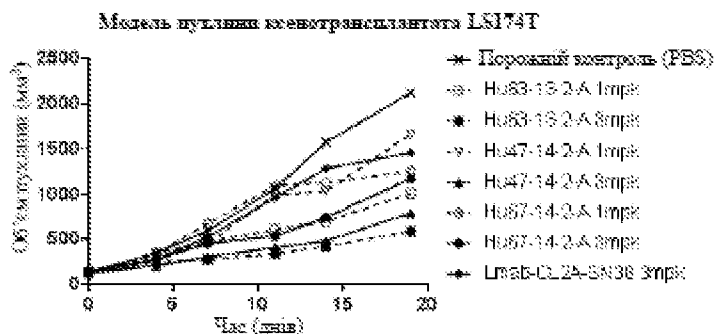


Fig. 3

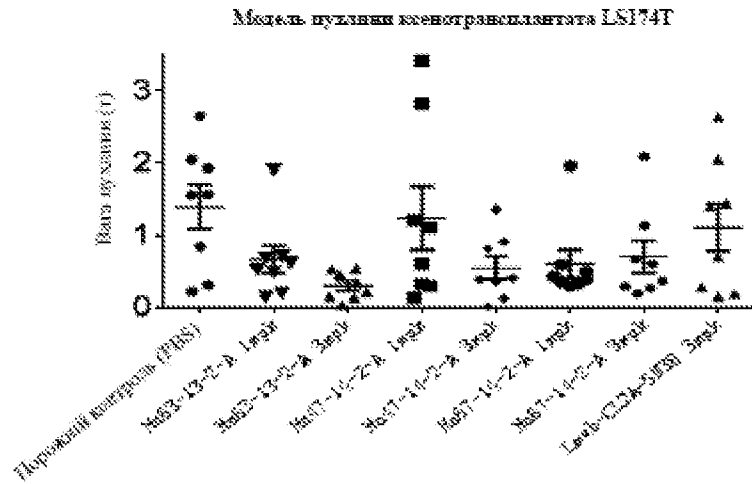


Fig. 4

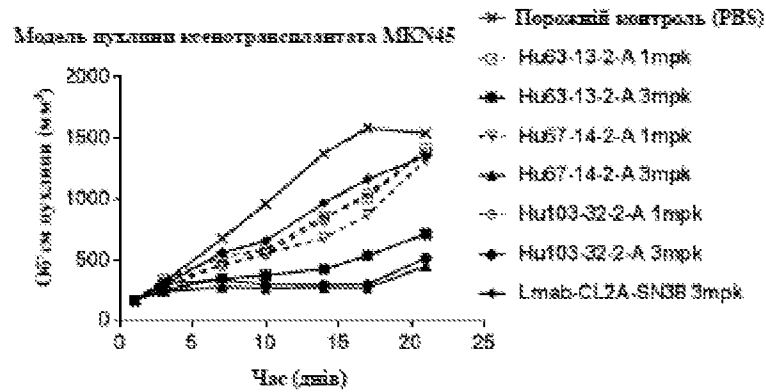


Fig. 5

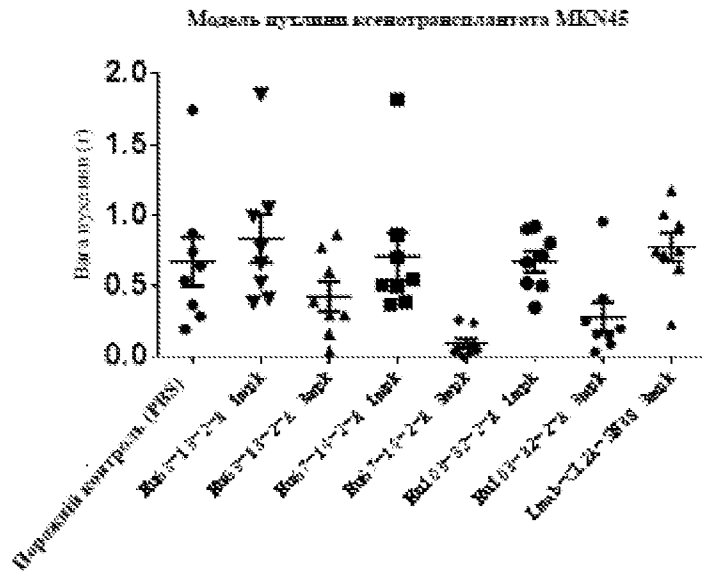


Fig. 6