



УДК 577.27 : 577.112.853.083+616-006.66

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ И ИММУНОХИМИЧЕСКАЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА ОНКОПРЕЦИПИТИНОВ КРУСТАЦИНА
И ЦИПРЕИНА, СПЕЦИФИЧЕСКИ РЕАГИРУЮЩИХ
С РАКОВОЭМБРИОНАЛЬНЫМ АНТИГЕНОМ**

*Павленко А. Ф., Курика А. В., Чикаловец И. В.,
Белогорцева Н. И., Оводов Ю. С.*

*Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВНЦ
Академии наук СССР, Владивосток*

Показано, что онкопреципитины крастацин из *Pagurus prideauxii* и ципреин из *Cypraea caputserpentis* являются веществами с мол. массами 36 ± 1 и $44 \pm 1,4$ кДа соответственно. Крастацин является белком, а ципреин — гликопротеином (18% углеводов). Взаимодействие крастацина и ципреина с раковоэмбриональным антигеном (РЭА) носит характер, свойственный реакции между антигенами и антителами, т. е. более специфический, чем обычное взаимодействие углеводов с полимерами лектинами, и ингибируется углеводами только в достаточно высоких концентрациях. Константы ассоциации комплексов РЭА — крастацин и РЭА — ципреин равны $0,6 \cdot 10^8$ и $1,3 \cdot 10^9$ M^{-1} соответственно. Методом иммуноферментного анализа показано, что антитела против РЭА связывают антитела к крастацину и ципреину.

В настоящее время известно, что для возникновения спонтанных и индуцированных злокачественных опухолей у человека и животных необходимы 3—4 независимых изменения в геноме [1]. Наличие огромного количества клеток в многоклеточном организме приводит к тому, что при частоте мутаций 10^{-9} на одно деление в организме возникает много мутантных клеток. Однако большинство из них элиминируется иммунной системой и лишь незначительное число способно дожить до второго мутационного изменения. Только благодаря эффективному иммунному ответу неопластические заболевания встречаются достаточно редко в популяциях животных [2]. Иммунный ответ обусловлен появлением на трансформированных клетках новых антигенов. Однако остается непонятной крайне низкая частота злокачественных опухолей у беспозвоночных и новорожденных позвоночных, у которых отсутствует или слабо развита иммунная система. В то же время хорошо известно, что беспозвоночные обладают способностью различать свое и не свое [3], у них имеется много рецепторспецифических белков, которые взаимодействуют с различными молекулами по типу реакции антитела с антигеном и выполняют разнообразные биологические функции.

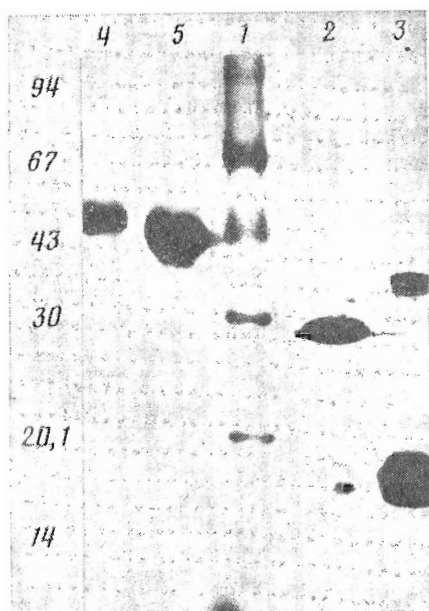
Недавно мы сообщили о наличии у беспозвоночных нового класса веществ — онкопреципитинов, специфично реагирующих с раковоэмбриональным антигеном (РЭА) [4]. Возможно, у беспозвоночных именно онкопреципитины осуществляют молекулярный надзор за появлением и уничтожением неопластических клеток. Показано, что онкопреципитины комплексно взаимодействуют только с РЭА [4], одним из представителей онкофетальных антигенов, являющихся наиболее общими маркерами злокачественного роста [5, 6].

Из нескольких обнаруженных нами онкопреципитинов [4] два были выделены в индивидуальном состоянии: крастацин из рака-отшельника *Pagurus prideauxii* и ципреин из каури *Cypraea caputserpentis*.

Гомогенность полученных препаратов крастацина и ципреина подтверждена SDS-электрофорезом в градиенте пористости полиакриламидного геля (рис. 1) и ультрацентрифугированием; в качестве единствен-

Сокращения: РЭА — раковоэмбриональный антиген, SDS — додецилсульфат натрия, ИФА — иммуноферментный анализ.

Рис. 1. SDS-электрофорез в градиенте пористости полиакриламидного геля: 1 — стандартные белки (слева приведена молекулярная масса в килодальтонах); 2 — крастацин; 3 — крастацин, восстановленный β -меркаптоэтанолом; 4 — ципреин; 5 — ципреин, восстановленный β -меркаптоэтанолом



ной N-концевой аминокислоты для крастацина определен фенилаланин, для ципреина — серин. Для крастацина, кроме того, установлена N-концевая последовательность аминокислот: Phe-Asp-Ala-Pro-Asp-Met-Val-Phe-Thr-Glu-. О гомогенности препаратов свидетельствуют также данные иммуноэлектрофореза (рис. 2а, б).

Таблица 1

Основные физико-химические характеристики крастацина и ципреина

Характеристика	Крастацин	Ципреин
Молекулярная масса, М, кДа по данным гель-фильтрации	46±1	39±1
SDS-электрофореза:		
для невосстановленного белка	36±1	44±1,4
для восстановленного β -меркаптоэтанолом	17±1	46,1±1,5
Константа седиментации, $s_{20, w}^0$, S	4,64	3,29
pH-стабильность	5,0–9,0	3,0–9,0
Электрофоретическая подвижность в агаре, при pH 8,6	α -Глобулины	β , γ -Глобулины
ϵ , М ⁻¹ ·см ⁻¹	70 000	48 400
N-Концевая аминокислота	Phe	Ser
Белок, %	86,9	82,4
Нейтральные моносахариды, %	3,0	14,0
Гексозамины, %	0,0	3,6
Зола, %	5,0	0,5

Основные физико-химические свойства крастацина и ципреина приведены в табл. 1. Из результатов SDS-электрофореза (рис. 1) и определения N-концевой аминокислотной последовательности следует, что крастацин состоит из двух одинаковых субъединиц, связанных дисульфидными связями. Ципреин (табл. 1, рис. 1) является гликопротеином с общим содержанием углеводов ~18% и состоит из одной полипептидной цепи.

Как видно из табл. 2, в состав крастацина и ципреина входят аминокислоты, обычно встречающиеся в белках. Крастацин характеризуется повышенным содержанием двухосновных аминокислот: в 2,0–7,0 раз больше, чем содержание других аминокислот. В ципреине наряду с увеличенным содержанием Asp-Asn также повышено содержание оксиаминокислот, треонина и серина. Ципреин отличается от крастацина соотношением Thr/Trp, равным 2,7 (для крастацина — 0,5).

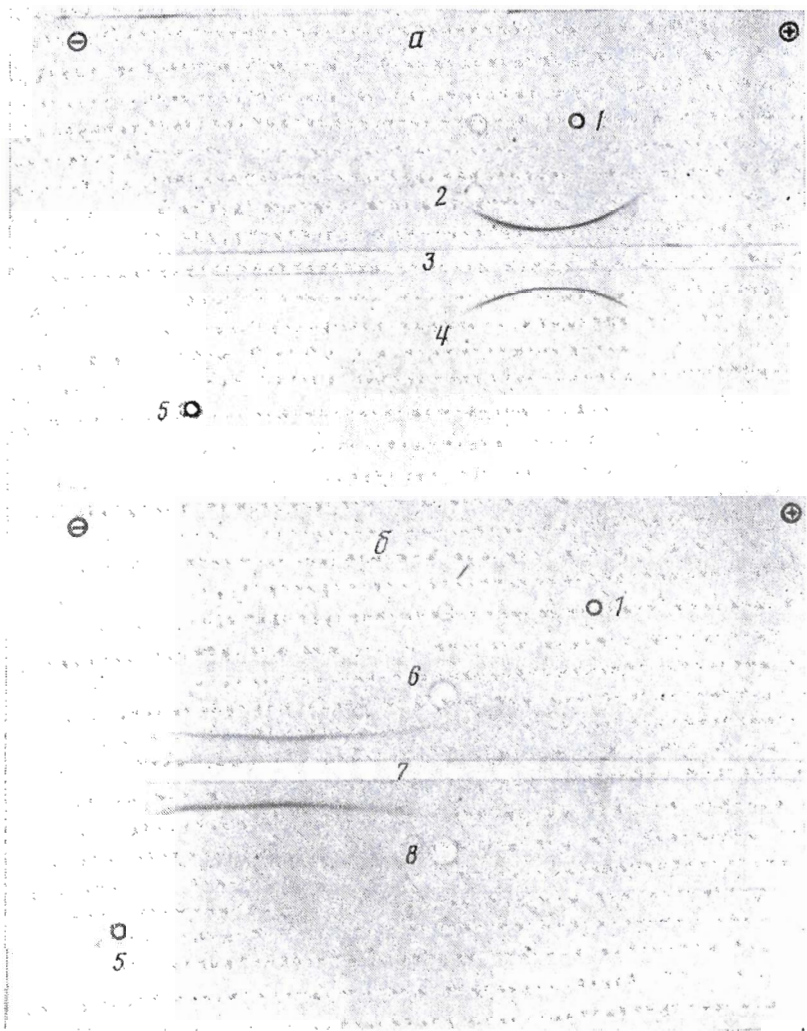


Рис. 2. Иммуноэлектрофорез крастаина (а) и ципрейна (б) в агаре: 1, 5 — положение синьки Эваса и γ -пирогонна соответственно в конце электрофореза; 2 — экстракт рака-отшельника; 3 — антисыворотка против крастаина; 4 — крастаин; 6 — экстракт моллюска; 7 — антисыворотка против ципрейна; 8 — ципреин

Из углеводов в крастаине методом ГЖХ-масс-спектрометрии идентифицирована только глюкоза, содержание которой составляло 3%, но неясно, входит ли она в состав этого белка. Ципреин имеет сложный моносахаридный состав, характерный для многих гликопротеинов. В виде ацетатов полнолюлов определены Fuc, Man, Gal, Glc, GlcN в соотношении 4 : 3 : 4, 5 : 3 : 2,6 соответственно.

Специфическая преципитация РЭА с крастаином и ципрейном усиливается в присутствии ионов кальция и магния и зависит от ионной силы раствора. С другой стороны, обработка крастаина и ципрейна катионитами приводит к полной потере их способности связывать антиген [4].

Хорошо известно, что многие лектины взаимодействуют с РЭА подобно антителам против этого антигена [8, 9]. Кроме РЭА они также взаимодействуют и с другими гликопротеинами, имеющими аналогичное с РЭА строение углеводных цепей [9]. В то же время крастаин и ципреин не взаимодействуют с различными гликопротеинами, близкими РЭА по строению углеводного компонента или имеющими с ним ряд общих антигенных детерминант, например с кислым α_1 -гликопротеином [4].

Аминокислотный состав краустина и ципрейна

Аминокислоты *	Краустина	Ципреин	Аминокислоты *	Краустина	Ципреин
Asp	48	47	Met	6	н. о.
Thr	12	41	Ile	10	11
Ser	12	39	Leu	12	23
Glu	42	20	Tyr	6	10
Pro	22	26	Phe	18	7
Gly	30	64	Lys	10	10
Ala	20	44	His	6	9
Cys	н. о.	н. о.	Arg	12	8
Val	12	32	Trp **	12	5

* Содержание аминокислот приведено в остатках на моль белка;

** содержание триптофана определено спектрофотометрически [7]; н. о. — не определено.

Таблица 3

Ингибирование углеводами связывания краустина и ципрейна с РЭА в ИФА *

Углеводы **	Краустина	Ципреин	Углеводы **	Краустина	Ципреин
Fuc	$2,0 \cdot 10^{-3}$	$1,8 \cdot 10^{-1}$	Glc	$3,7 \cdot 10^{-2}$	н. и.
Gal	$2,0 \cdot 10^{-3}$	н. и.	Xyl	$5,0 \cdot 10^{-2}$	н. о.
Gal $\rho\alpha$ 1-OMe	$2,5 \cdot 10^{-1}$	н. и.	Xyl $\rho\beta$ 1-OMe	$3,7 \cdot 10^{-1}$	н. о.
Man	$2,0 \cdot 10^{-3}$	н. и.	Glc $\rho\beta$ 1-OMe	$2,6 \cdot 10^{-2}$	н. о.
GlcNAc	$2,5 \cdot 10^{-3}$	н. и.	Лактоза	$7,3 \cdot 10^{-3}$	н. и.
GalNAc	$3,4 \cdot 10^{-3}$	н. и.	Хитобиоза	$0,9 \cdot 10^{-3}$	$3,5 \cdot 10^{-2}$

* Приведена концентрация (моль/л), вызывающая 50%-ное ингибирование; н. и. — нет ингибирования; н. о. — не определялось.

** Все D-ряда.

Для доказательства того, что взаимодействие краустина и ципрейна с РЭА так же специфично, как и взаимодействие РЭА с антителами, нами были получены специфические антитела против краустина и ципрейна и разработан метод иммуоферментного анализа (ИФА) РЭА. Посредством конкурентного ИФА было проведено ингибирование углеводами связывания исследуемых онкопреципитинов с РЭА. Как видно из табл. 3, реакцию связывания краустина с РЭА ингибируют многие моносахариды, даже отсутствующие в РЭА. Реакцию связывания РЭА с ципрейном из исследованных углеводов ингибируют только фукоза и хитобиоза. Важно подчеркнуть, что в реакции преципитации РЭА с краустином и ципрейном 50%-ное ингибирование достигается только при относительно высоких концентрациях моносахаридов, а 100%-ного ингибирования не удалось достичь даже при концентрации моносахаридов 0,5 моль/л. Взаимодействие лектинов с гликопротеинами, в том числе и с РЭА, ингибируется при меньших концентрациях углеводов [10].

Известно, что константы ассоциации комплексов высокоспецифических антител с соответствующими антигенами лежат в пределах 10^7 – 10^{12} M^{-1} , тогда как константы ассоциации комплексов лектинов со своими лигандами — в пределах 10^3 – 10^5 M^{-1} . Определенные нами по методике работы [11] константы ассоциации для комплексов РЭА–краустина и РЭА–ципреин равны $0,6 \cdot 10^8$ и $1,3 \cdot 10^9$ M^{-1} соответственно и, следовательно, близки к значениям, характерным для высокоаффинных антител, и к результатам, обычно получаемым для антител к РЭА [12].

Хорошо известно, что взаимодействующие поверхности антигена с антителом подходят друг к другу как «ключ к замку». В принципе мож-

но, зная конфигурацию «замка»-антитела, получить новую молекулу, имеющую у себя участки с конфигурацией, тождественной исходному

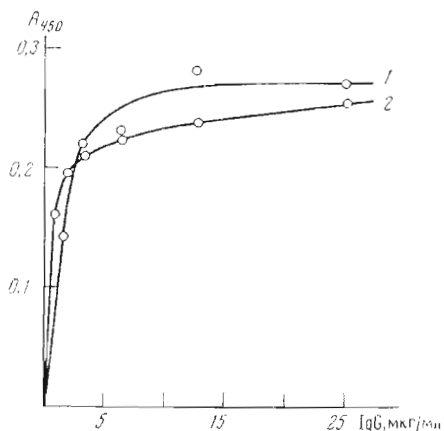


Рис. 3. Связывание антител против РЭА с IgG_к (1) и IgG_ц (2)

«ключу»-антигену. Недавно это было убедительно продемонстрировано [13]. С использованием кроличьих иммуноглобулинов G к крастацину (IgG_к) и к циприну (IgG_ц) нами было показано, что они имеют те же антигенные детерминанты, что и РЭА, и взаимодействуют с антителами к РЭА. С этой целью в ИФА с использованием кроличьих IgG к РЭА (IgG_{РЭА}) вместо РЭА брали соответственно IgG_к и IgG_ц. В обоих случаях наблюдалось специфическое связывание (рис. 3). Специфическое связывание имело место также и при нанесении на планшеты для ИФА IgG_к и IgG_ц с последующим проявлением коъюгатом IgG_{РЭА}-пероксидаза. В контрольных опытах с использованием IgG из нормальных сыворо-

ток человека, кролика, осла и из гипериммунных антисывороток против бактериальных антигенов такое связывание не отмечено.

Таким образом, полученные данные позволяют сделать вывод, что выделенные онкопреципитины обладают высокой специфичностью в отношении РЭА. Хотя биологическая роль онкопреципитинов остается еще совершенно неизученной, тем не менее столь высокое сродство их к РЭА позволяет сделать предположение о выполнении ими функций своеобразной защиты беспозвоночных от неопластического перерождения клеток.

Экспериментальная часть

Общее содержание белка, углеводов и гексозаминов в крастацине и циприне определяли так, как описано в работах [14–16].

Аминокислотный и углеводный анализ проводили как описано ранее [17]. N-Концевые аминокислоты определяли по методу [18]. Автоматическое определение N-концевой аминокислотной последовательности осуществляли на секвенаторе модели 890 с (Beckman, ФРГ) в газовом варианте без полибрена. Отщепленные фенилтионидантоны аминокислот идентифицировали высокоэффективной жидкостной хроматографией на хроматографе 1084 А (Hewlett Packard, Англия) с колонкой Ultrasphere ODS (4,6×250 мм, 5 мкм) в градиенте концентрации метанола 33–55% в 8 мМ калий-фосфатном буфере, pH 4,8. Белок перед секвенированием восстанавливали и карбоксиметилировали по методу [19]. SDS-электрофорез в градиенте пористости полиакриламидного геля от 5 до 25% проводили согласно [20]. Образцы центрифугировали на аналитической ультрацентрифуге 3170 (МОМ, Венгрия) при 5·10⁴ об/мин и 20° С. Константы седиментации $s_{20,W}$ рассчитывали как предложено в работе [21].

Антисыворотки против крастацина и циприна получали по схеме, описанной нами ранее [22]. Иммуноэлектрофорез проводили соответственно [23]. IgG-фракцию из антисывороток получали высаливанием сульфатом аммония с последующей ионообменной хроматографией на DEAE-сефадексе, как описано в работе [24]. Коъюгаты IgG_к и IgG_ц с пероксидазой из хрена (НПО «Биолар», Олайне) получали по методу [25]. ИФА для определения РЭА с использованием IgG_{РЭА} проводили так, как описано нами ранее [26].

Иммуноферментный анализ с применением антител к крастацину и циприну. Буферные растворы: № 1 (для нанесения антител на планшет) – 0,1 М NaHCO₃ с 0,15 М NaCl, pH 9,6; № 2 (основной) – 0,01 М NaH₂PO₄ с 0,15 М NaCl, pH 7,5; № 3 (для нанесения антигена) – буфер № 2 с 0,1% бычьего сывороточного альбумина (BSA); № 4 (для нанесения коъюгата и отмывки) – буфер № 2 с 0,05% твина 20; № 5 (для разведения онкопреципитинов и соединений, используемых в качестве ингибиторов реакции связывания РЭА с онкопреципитинами) – 0,01 М трис-HCl с 0,15 М NaCl, 1 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂ и 0,1% BSA, pH 7,4. Субстрат: 0,08% 5-аминосалициловая кислота + 0,03% H₂O₂, pH 6,0.

Ингибирование углеводами реакции связывания крастацина и циприна с РЭА. Во все лунки планшета (Dunatest, Швейцария) вносили по 200 мкл IgG_{РЭА} в буфере № 1 в концентрации 50 мкг/мл и инкубировали 17 ч при 4° С. Избыток иммуноглобулинов отмывали буфером № 4 три раза по 3 мин. Добавляли во все лунки по 200 мкл раствора РЭА в буфере № 3 с концентрацией 250 или 100 мкг/мл для крастацина и циприна соответственно. Инкубировали 1 ч при 37° С, избыток антигена от-

мывали, как описано выше. Отдельно в пробирках готовили серии из семи последовательных двукратных разведений углеводов начиная с 0,5 М для моносахаридов и 0,25 М для дисахаридов. Эти растворы вносили по 100 мкл в лунки планшета, используя для одной концентрации каждого сахара три вертикальных ряда. Затем сразу добавляли по 100 мкл раствора крустацина или ципренина в буфере № 5 в концентрации 200 нг/мл. Планшет осторожно встряхивали 1 ч при 37° С и избыток реагентов отмывали. Во все лунки планшета вносили конъюгат IgG_κ или IgG_λ с пероксидазой в разведении 1/300, инкубировали 1,5 ч при 37° С. После промывки планшета добавляли во все лунки по 200 мкл субстрата, инкубировали 1 ч при 20° С. Оптическое поглощение измеряли при 449 нм на спектрофотометре (Multiscan, Финляндия). Ингибирующую способность углеводов рассчитывали по формуле

$$\text{ингибирование} = \frac{A}{A_0} \cdot 100,$$

где A_0 и A — поглощение проб в отсутствие и присутствии ингибитора соответственно. Концентрацию углеводов, подавляющую активность преципитинов на 50%, определяли из графика, отражающего зависимость ингибирующей способности от концентрации углевода.

Определение констант ассоциации комплексов РЭА—крустацин и РЭА—ципренин. В лунки планшета вносили по 200 мкл раствора IgG_{ГРЛ} в буфере № 1 с концентрацией 50 мкг/мл и инкубировали 17 ч при 4° С. Несвязавшийся иммуноглобулин отмывали буфером № 3 три раза по 3 мин. Во все лунки планшета вносили по 200 мкл РЭА в буфере № 3 с концентрацией 250 или 100 нг/мл для крустацина или ципренина соответственно. Инкубировали 1 ч при 37° С.

Одновременно в отдельные пробирки вносили по 0,9 мл РЭА с концентрацией (50, 40, 30, 25, 20, 15, 10) · 10⁻⁹ М для крустацина и (100; 50; 25; 12,5; 6,2; 3,1; 1,6) · 10⁻¹⁰ М для ципренина, добавляли равные объемы растворов крустацина или ципренина в буфере № 5 с концентрацией 5,6 · 10⁻⁹ или 4,4 · 10⁻⁹ М соответственно. Пробирки встряхивали 1 ч при 37° С. После завершения инкубации и промывки во все лунки планшета вносили по 200 мкл раствора из пробирок, располагая в каждом горизонтальном ряду пробы из одной пробирки, инкубировали 1 ч при осторожном встряхивании. Затем промывали и во все лунки добавляли по 200 мкл конъюгата IgG_κ или IgG_λ с пероксидазой в разведении 1/300 или 1/400 соответственно. Инкубировали 1,5 ч при 37° С. Промывали и вносили во все лунки по 200 мкл субстрата, выдерживали 1 ч при 20° С и измеряли оптическое поглощение в лунках.

Константы ассоциации комплексов РЭА—крустацин и РЭА—ципренин определяли из графиков Скэтчарда, как предложено в работе [11].

Определение перекрестной реакции антигел против РЭА с IgG_κ и IgG_λ. В три ряда лунок планшета вносили по 200 мкл IgG_{ГРЛ} в буфере № 1 в последовательных двукратных разведениях от 100 до 1,6 мкг/мл. В остальные лунки в качестве контроля вносились растворы различных IgG в этом же буфере. После инкубации в течение 17 ч при 4° С планшет промывали. Лунки заполняли буфером № 3 и для забивки свободной поверхности инкубировали 1 ч при 37° С. Промывали, во все лунки вносили по 200 мкл конъюгата IgG_κ или IgG_λ с пероксидазой и инкубировали 1,5 ч при 37° С. Планшет промывали и вносили во все лунки по 200 мкл субстрата. После инкубации в течение 1 ч при 20° С измеряли поглощение.

ЛИТЕРАТУРА

1. Padua R. A., Barass N., Currie G. A. // Nature. 1984. V. 311. № 5987. P. 671—673.
2. Lewis A. M., Cook J. L. // Science. 1985. V. 227. № 4682. P. 15—20.
3. Купер Э. Сравнительная иммунология. М.: Мир, 1980. С. 422.
4. Оводов Ю. С., Павленко А. Ф., Курика А. В., Чукаловец И. В., Коржииков И. А. // Докл. АН СССР. 1986. Т. 293. № 4. С. 1009—1010.
5. Rogers G. T. // Biochim. et biophys. acta. 1983. V. 659. № 3—4. P. 227—249.
6. Косяков П. Н., Косякова П. П. Антигены опухолей человека. М.: Медицина, 1985. С. 272.
7. Ichikawa T., Terada H. // Chem. Pharm. Bull. 1981. V. 29. № 2. P. 438—444.
8. Watanabe K., Nakomori S. // FEBS Lett. 1973. V. 37. № 2. P. 317—320.
9. Uhlenbruck G., Karduck D., Pearson R. // Compar. Biochem. and Physiol. 1979. V. 63B. № 1. P. 125—129.
10. Луцки М. Д., Панасюк Е. Н., Луцки А. Д. Лектины. Львов: Вища школа, 1981. С. 156.
11. Friquet B., Chaffotte A. F., Djavadi-Ohanian L., Goldberg M. E. // J. Immunol. Methods. 1985. V. 77. № 2. P. 305—319.
12. Pritchard D. G., Todd C. W., Egan M. L. // Meth. in Cancer Research. V. 14/Ed. Busch H. N. Y.: Acad. Press, 1978. P. 55—85.
13. Jerne N. K., Rolund G., Casenave R.-A. // EMBO J. 1982. V. 1. № 2. P. 243—247.
14. Lowry O. H., Rosenbraugh N. J., Farr A. L., Rondal R. J. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. № 1. P. 265—275.
15. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. // Anal. Chem. 1956. V. 28. № 2. P. 350—356.
16. Warren L. J. // J. Biol. Chem. 1959. V. 234. № 8. P. 1971—1975.
17. Павленко А. Ф., Курика А. В., Белогорцева Н. И., Набиуллин А. А., Оводов Ю. С. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 5. С. 646—650.

18. Гапкина Э. С., Королева Е. М., Беленький Б. Г. // Биоорг. химия. 1979. Т. 5. № 4. С. 485–490.
19. Crestfield A. M., Moore S., Stein W. H. // J. Biol. Chem. 1963. V. 238. № 2. P. 622–627.
20. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование. /Практическое пособие/. М.: Наука, 1981. С. 288.
21. Боуэн Т. Введение в ультрацентрифугирование. М.: Мир, 1973. С. 248.
22. Павленко А. Ф., Курика А. В., Мороз С. В., Оводов Ю. С., Маслова М. Г., Володарский В. Л. // Вопр. онкологии. 1982. Т. 28. № 4. С. 14–16.
23. Храмкова П. И., Абелев Г. П. // Бюл. эксп. биологии и медицины. 1961. Т. 52. № 42. С. 107–111.
24. Руководство по количественному иммуноэлектрофорезу. Методы и применение./ Ред. Аксельсен Н., Кремель И., Бееке Б. М.: Мир, 1977. С. 201–203.
25. Nakane P. K., Kawai A. // J. Histochem. Cytochem. 1974. V. 22. № 12. P. 1084.
26. Одинокое С. Е., Набиуллин А. А., Глазунов В. П., Курика А. В., Павленко А. Ф., Оводов Ю. С., Геворкян Б. З. // Биоорг. химия. 1985. Т. 11. № 10. С. 1315–1322.

Поступила в редакцию
23.XII.1986

После доработки
28.V.1987

**PHYSICO-CHEMICAL AND IMMUNOCHEMICAL CHARACTERIZATION
OF ONCOPRECIPITINES, CRUSTACIN AND CYPREIN,
INTERACTING SPECIFICALLY WITH CARCINOEMBRYONIC
ANTIGEN (CEA)**

PAVLENKO A. F., KURIKA A. V., CHIKALOVETS I. V., BELOGORTSEVA N. I.,
OVODOV Yu. S.

*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East
Science Centre, Academy of Sciences of the USSR, Vladivostok*

Crustacin from *Pagurus prideauxii* and cyprein from *Cyprea caputserpentis* have been shown to be glycoproteins with molecular masses 36 ± 1 and 44 ± 1.4 kDa, containing 3 and 18% of carbohydrates, respectively. Their amino acid and monosaccharide composition have been determined. Crustacin or cyprein interact with CEA more specifically than carbohydrate-containing polymers with lectins. Carbohydrates unspecifically inhibit this interaction at rather high concentrations. Association constants of CEA – crustacin and CEA – cyprein complexes are $0.6 \cdot 10^8$ and $1.3 \cdot 10^9$ M⁻¹, respectively. Besides, ELISA showed that antibodies against CEA bind antibodies to crustacin and cyprein.