

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290998** (13) **A2**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.02.29

(22) Дата подачи заявки
2015.09.10

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 38/56 (2006.01)
A61K 31/7036 (2006.01)
A61K 31/5517 (2006.01)
A61K 31/40 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) МАКРОПИНОЦИТОЗИРУЮЩИЕ ЧЕЛОВЕЧЕСКИЕ АНТИ-CD46 АНТИТЕЛА И ТАРГЕТНАЯ ТЕРАПИЯ РАКА

(31) **62/049,973**

(32) **2014.09.12**

(33) **US**

(62) **201790404; 2015.09.10**

(71) Заявитель:
**ZE REDJENTCS OF ZE
ЮНИВЕРСИТИ ОФ КАЛИФОРНИЯ
(US)**

(72) Изобретатель:
**Лю Бинь, Су Ян, Бидлингмайер
Скотт, Бехренс Кристофер Р., Ли
Намкиун (US)**

(74) Представитель:
**Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф.,
Гизатуллина Е.М., Прищепный С.В.,
Джермакян Р.В., Христофоров А.А.,
Угрюмов В.М., Костюшенкова М.Ю.
(RU)**

(57) В различных вариантах осуществления предлагаются человеческие анти-CD46 антитела, которые интернализуются и проникают в опухолевые клетки путем макропиноцитоза, а также конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC), разработанные на основе этих антител, для диагностики и/или терапевтического нацеливания на CD46-сверхэкспрессирующие опухоли.

A2

202290998

202290998

A2

МАКРОПИНОЦИТОЗИРУЮЩИЕ ЧЕЛОВЕЧЕСКИЕ АНТИ-CD46 АНТИТЕЛА И ТАРГЕТНАЯ ТЕРАПИЯ РАКА

Перекрестные ссылки на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает преимущество и приоритет в отношении USSN 62/049,973, поданной 12 сентября 2014 года, полное содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки во всех отношениях.

Заявление о правах на изобретения, сделанные в рамках финансируемых на федеральном уровне исследований и разработок

Данное изобретение было сделано в рамках грантов Национального института здоровья R01 CA118919, R01 CA129491 и R01 CA171315. Правительство имеет определенные права на данное изобретение.

Сведения о предшествующем уровне техники

Благодаря легкой доступности, поверхностные антигены опухолевых клеток являются ценными мишенями для разработки лекарственных препаратов. Пространственное расположение эпитопов на клеточной поверхности является сложным. Релевантные антигены могут включать гликозилированные белки и другие посттрансляционно модифицированные продукты, которые трудно предсказать путем исследования числа копий генов или уровней экспрессии мРНК (Liu *et al.* (2004) *Cancer Res.* 64: 704-710; Kobata and Amano (2005) *Immunol. Cell Biol.* 83: 429-439; Birkle *et al.* (2003) *Biochimie (Paris)* 85: 455-463; Nakomori (2001) *Adv. Exp. Med. Biol.* 491: 369-402; Hanisch, F. G. (2001) O-Glycosylation of the mucin type. *Biol. Chem.* 382, 143-1 49; Ugorski and Laskowska (2002) *Acta Biochim. Pol.* 49: 303-311).

Идентификация поверхностных эпитопов опухолевых клеток позволяет создать антитела, способные специфически связываться с неопластическими клетками, и эту способность можно использовать, например, для индукции антителозависимой клеточной цитотоксичности (*смотри, например*, Clynes *et al.* (2000) *Nat. Med.* 6: 443-446) или ингибирования сигнальных путей, вовлеченных в миграцию, рост и выживание опухолевых клеток (*смотри, например*, McWhirter *et al.* (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 103: 1041-1 046; Fuh *et al.* (2006) *J. Biol. Chem.* 281: 6625- 6631). Кроме того, антитела, нацеленные на интернализирующие опухолевые эпитопы, можно использовать для эффективной и специфической внутриклеточной доставки цитотоксинов, цитостатических агентов, химиотерапевтических лекарственных средств и/или других опухоле-

модулирующих агентов (*смотри, например, Liu et al. (2004) Cancer Res. 64: 704-710; Nielsen et al. (2002) Biochim. Biophys. Acta 1591: 109-118; Pirollo et al. (2006) Hum. Gene Ther. 17: 117-124; Song et al. (2005) Nat. Biotechnol. 23:709-717; Liu et al. (2002) J. Mol. Biol. 315: 1063-1073*).

Фаговый дисплей антител широко применяется для разработки опухолеспецифических антител (*смотри, например, Liu et al. (2004) Cancer Res. 64: 704-710; Liu and Marks (2000) Anal. Biochem. 286: 119-128; 15. Marks et al. (1992) Biotechnology (N. Y.) 10: 779-783; Marks et al. (1991) J. Mol. Biol. 222: 581-597; Marks et al. (1992) J. Biol. Chem. 267: 16007-16010; Sharon et al. (2005) J. Cell. Biochem. 96: 305-313; Silacci et al. (2005) Proteomics 5: 2340 -2350; Gao et al. (2003) J. Immunol. Methods 274: 185-197; Lekkerkerker and Logtenberg (1999) J. Immunol. Meth., 231: 53-63; de Kruijff et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 92: 3938-3942; Pini et al. (1998) J. Biol. Chem. 273: 21 769-21 776*). Комбинаторная фаговая библиотека антител служит в качестве источника репертуара случайных форм, который можно использовать для испытания неопластических вариаций на поверхности раковых клеток (*смотри, например, Liu et al. (2004) Cancer Res. 64: 704-710; Geuijen et al. (2005) Eur. J. Cancer 41: 178-187; Poul et al. (2000) J. Mol. Biol. 301: 1149-1161; Cai and Garen (1995) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 92: 6537-6541*). Селекция фаговых библиотек антител напрямую на раковых клеточных линиях обеспечивает идентификацию нацеленных на опухоль антител без предварительного знания об антигенах-мишенях (*смотри, например, (Liu et al. (2004) Cancer Res. 64: 704-710; Gao et al. (2003) J. Immunol. Methods 274: 185-197; Geuijen et al. (2005) Eur. J. Cancer 41: 178-187; Poul et al. (2000) J. Mol. Biol. 301: 1149-1161*).

Несмотря на то, что с использованием этого подхода может быть обнаружено множество антител, процесс скрининга против клеточных линий не обеспечивает четкого представления о том, насколько специфическими будут эти антитела в отношении конкретных раковых клеток в популяциях пациентов. Также, указанный подход может не дать представление о том, будут ли антитела интернализироваться *in vivo*.

Краткое описание изобретения

В различных вариантах осуществления предлагаются человеческие анти-CD46 антитела, которые интернализуются и проникают внутрь опухолевых клеток путем макропиноцитоза, а также конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC), разработанные из этих антител, для диагностического и/или терапевтического нацеливания на опухоли, сверхэкспрессирующие CD46.

Различные варианты осуществления, рассматриваемые в настоящем документе, могут включать, не без ограничения, один или несколько из следующих вариантов осуществления:

Вариант осуществления 1: Выделенное человеческое антитело, которое специфически связывается с CD46 и интернализуется клеткой, экспрессирующей или сверхэкспрессирующей CD46, при этом: указанное антитело представляет собой антитело, которое специфически связывается с клетками, которые экспрессируют или сверхэкспрессируют CD46, при этом указанное антитело специфически связывается с эпитопом, связанным одним или несколькими антителами, выбранными из группы, состоящей из YS5, YS5F, YS5v1D, SB1HGNY, YS12, 3G7RY, YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и/или UA8kappa; и при этом указанное антитело интернализуется указанной клеткой путем макропиноцитоза.

Вариант осуществления 2: Антитело согласно варианту осуществления 1, отличающееся тем, что указанное антитело связывается с доменом 1 и/или доменом 2 CD46.

Вариант осуществления 3: Антитело согласно вариантам осуществления 1 или 2, отличающееся тем, что указанное антитело не связывается с доменом 3 и/или доменом 4 CD46.

Вариант осуществления 4: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-3, отличающееся тем, что указанные клетки, которые экспрессируют или сверхэкспрессируют CD46, представляют собой раковые клетки.

Вариант осуществления 5: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-4, отличающееся тем, что указанные клетки, которые экспрессируют или сверхэкспрессируют CD46, представляют собой клетки рака предстательной железы.

Вариант осуществления 6: Антитело согласно варианту осуществления 5, отличающееся тем, что указанное антитело связывается с клетками клеточной линии, выбранной из группы, состоящей из клеток DU145, клеток PC3 и клеток LnCaP.

Вариант осуществления 7: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-6, отличающееся тем, что указанное антитело связывается с опухолевыми клетками предстательной железы с аффинностью (K_D) по меньшей мере около 5-10 нМ при измерении на живых опухолевых клетках предстательной железы с помощью FACS.

Вариант осуществления 8: Антитело согласно варианту осуществления 7, отличающееся тем, что указанное антитело связывается с опухолевыми клетками предстательной железы с аффинностью (K_D) по меньшей мере около 3 нМ при измерении на живых опухолевых клетках предстательной железы с помощью FACS.

Вариант осуществления 9: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-8, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой по существу интактный иммуноглобулин.

Вариант осуществления 10: Антитело согласно варианту осуществления 9, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой IgA, IgE или IgG.

Вариант осуществления 11: Антитело согласно варианту осуществления 9, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой IgG1.

Вариант осуществления 12: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-8, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой фрагмент антитела, который специфически связывается с клетками, которые экспрессируют или сверхэкспрессируют CD46.

Вариант осуществления 13: Антитело согласно варианту осуществления 12, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из Fv, Fab, (Fab')₂, (Fab')₃, IgGΔCH2 и минитела.

Вариант осуществления 14: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-8, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой одноцепочечное антитело.

Вариант осуществления 15: Антитело согласно варианту осуществления 14, отличающееся тем, что VL-область указанного антитела присоединена к VH-области указанного антитела с помощью аминокислотного линкера длиной примерно от 3 до 15 аминокислот.

Вариант осуществления 16: Антитело согласно варианту осуществления 14, отличающееся тем, что VL-область указанного антитела присоединена к VH-области указанного антитела с помощью аминокислотного линкера, выбранного из группы, состоящей из GGGGS GGGGS GGGGS (SEQ ID NO:67), GGGGS GGGGS (SEQ ID NO:68), GGGGS (SEQ ID NO:69), GS GGGGS GGGGS GGS GGGGS (SEQ ID NO:70), SGGGGS (SEQ ID NO:71), GGGGS (SEQ ID NO:72), VPGV (SEQ ID NO:73), VPGVG (SEQ ID NO:74), GVPGVG (SEQ ID NO:75), GVG VP GVG (SEQ ID NO:76), VP GVG VP GVG (SEQ ID NO:77), GGSSRSS (SEQ ID NO:78) и GGSSRSSSSGGGSGGGG (SEQ ID NO:79).

Вариант осуществления 17. Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело конкурирует с YS5 за связывание с CD46.

Вариант осуществления 18. Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело конкурирует с YS5F за связывание с CD46.

Вариант осуществления 19. Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело конкурирует с YS5v1D за связывание с CD46.

Вариант осуществления 20. Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело конкурирует с SB1HGNY за связывание с CD46.

Вариант осуществления 21. Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело конкурирует с YS12 за связывание с CD46.

Вариант осуществления 22. Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело конкурирует с 3G7RY за связывание с CD46.

Вариант осуществления 23. Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело конкурирует с YS6 за связывание с CD46.

Вариант осуществления 24. Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело конкурирует с YS1 за связывание с CD46.

Вариант осуществления 25. Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело конкурирует с YS3 за связывание с CD46.

Вариант осуществления 26. Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело конкурирует с YS4 за связывание с CD46.

Вариант осуществления 27. Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело конкурирует с YS8 за связывание с CD46.

Вариант осуществления 28. Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело конкурирует с YS7 за связывание с CD46.

Вариант осуществления 29. Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело конкурирует с YS9 за связывание с CD46.

Вариант осуществления 30. Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело конкурирует с YS10 за связывание с CD46.

Вариант осуществления 31. Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело конкурирует с YS11 за связывание с CD46.

Вариант осуществления 32. Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело конкурирует с 3G7HY за связывание с CD46.

Вариант осуществления 33. Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело конкурирует с 3G7NY за связывание с CD46.

Вариант осуществления 34. Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело конкурирует с 3G7 за связывание с CD46.

Вариант осуществления 35. Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело конкурирует с SB2 за связывание с CD46.

Вариант осуществления 36. Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело конкурирует с 2C8 за связывание с CD46.

Вариант осуществления 37. Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело конкурирует с UA8kappa за связывание с CD46.

Вариант осуществления 38. Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VH CDR1 и/или VH CDR2, и/или VH CDR3, и/или VL CDR1, и/или VL CDR2, и/или VL CDR3 антитела, выбранного из группы, состоящей из YS5, YS5F, YS5v1D, SB1HGNY, YS12, 3G7RY, YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и UA8kappa.

Вариант осуществления 39: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VH CDR1 и/или VH CDR2, и/или VH CDR3 антитела YS5.

Вариант осуществления 40: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VL CDR1 и/или VL CDR2, и/или VL CDR3 антитела YS5.

Вариант осуществления 41: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VLCDR2 и VL CDR3 антитела YS5.

Вариант осуществления 42: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную легкую (VL) цепь антитела YS5.

Вариант осуществления 43: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную тяжелую (VH) цепь антитела YS5.

Вариант осуществления 44: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную легкую (VL) цепь антитела YS5 и переменную тяжелую (VH) цепь антитела YS5.

Вариант осуществления 45: Антитело согласно варианту осуществления 1, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv) человеческого антитела YS5.

Вариант осуществления 46: Антитело согласно варианту осуществления 1, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой человеческий IgG YS5.

Вариант осуществления 47: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VH CDR1 и/или VH CDR2, и/или VH CDR3 антитела YS5F.

Вариант осуществления 48: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VL CDR1 и/или VL CDR2, и/или VL CDR3 антитела YS5F.

Вариант осуществления 49: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VLCDR2 и VL CDR3 антитела YS5F.

Вариант осуществления 50: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную легкую (VL) цепь антитела YS5F.

Вариант осуществления 51: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную тяжелую (VH) цепь антитела YS5F.

Вариант осуществления 52: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную легкую (VL) цепь антитела YS5F и переменную тяжелую (VH) цепь антитела YS5F.

Вариант осуществления 53: Антитело согласно варианту осуществления 1, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv) человеческого антитела YS5F.

Вариант осуществления 54: Антитело согласно варианту осуществления 1, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой человеческий IgG YS5F.

Вариант осуществления 55: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VH CDR1 и/или VH CDR2, и/или VH CDR3 антитела YS5F.

Вариант осуществления 56: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VL CDR1 и/или VL CDR2, и/или VL CDR3 антитела YS5F.

Вариант осуществления 57: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 антитела YS5F.

Вариант осуществления 58: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную легкую (VL) цепь антитела YS5F.

Вариант осуществления 59: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную тяжелую (VH) цепь антитела YS5F.

Вариант осуществления 60: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную легкую (VL) цепь антитела YS5F и переменную тяжелую (VH) цепь антитела YS5F.

Вариант осуществления 61: Антитело согласно варианту осуществления 1, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv) человеческого антитела YS5F.

Вариант осуществления 62: Антитело согласно варианту осуществления 1, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой человеческий IgG YS5F.

Вариант осуществления 63: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VH CDR1 и/или VH CDR2, и/или VH CDR3 антитела YS5VID.

Вариант осуществления 64: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VL CDR1 и/или VL CDR2, и/или VL CDR3 антитела YS5V1D.

Вариант осуществления 65: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VLCDR2 и VL CDR3 антитела YS5V1D.

Вариант осуществления 66: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную легкую (VL) цепь антитела YS5V1D.

Вариант осуществления 67: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную тяжелую (VH) цепь антитела YS5V1D.

Вариант осуществления 68: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную легкую (VL) цепь антитела YS5V1D и переменную тяжелую (VH) цепь антитела YS5V1D.

Вариант осуществления 69: Антитело согласно варианту осуществления 1, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv) человеческого антитела YS5V1D.

Вариант осуществления 70: Антитело согласно варианту осуществления 1, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой человеческий IgG YS5V1D.

Вариант осуществления 71: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VH CDR1 и/или VH CDR2, и/или VH CDR3 антитела SB1HGNY.

Вариант осуществления 72: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VL CDR1 и/или VL CDR2, и/или VL CDR3 антитела SB1HGNY.

Вариант осуществления 73: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VLCDR2 и VL CDR3 антитела SB1HGNY.

Вариант осуществления 74: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную легкую (VL) цепь антитела SB1HGNY.

Вариант осуществления 75: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную тяжелую (VH) цепь антитела SB1HGNY.

Вариант осуществления 76: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную легкую (VL) цепь антитела SB1HGNY и переменную тяжелую (VH) цепь антитела SB1HGNY.

Вариант осуществления 77: Антитело согласно варианту осуществления 1, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv) человеческого антитела SB1HGNY.

Вариант осуществления 78: Антитело согласно варианту осуществления 1, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой человеческий IgG SB1HGNY.

Вариант осуществления 79: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VH CDR1 и/или VH CDR2, и/или VH CDR3 антитела YS12.

Вариант осуществления 80: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VL CDR1 и/или VL CDR2, и/или VL CDR3 антитела YS12.

Вариант осуществления 81: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 антитела YS12.

Вариант осуществления 82: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную легкую (VL) цепь антитела YS12.

Вариант осуществления 83: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную тяжелую (VH) цепь антитела YS12.

Вариант осуществления 84: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную легкую (VL) цепь антитела YS12 и переменную тяжелую (VH) цепь антитела YS12.

Вариант осуществления 85: Антитело согласно варианту осуществления 1, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv) человеческого антитела YS12.

Вариант осуществления 86: Антитело согласно варианту осуществления 1, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой человеческий IgG YS12.

Вариант осуществления 87: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VH CDR1 и/или VH CDR2, и/или VH CDR3 антитела 3G7RY.

Вариант осуществления 88: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VL CDR1 и/или VL CDR2, и/или VL CDR3 антитела 3G7RY.

Вариант осуществления 89: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 антитела 3G7RY.

Вариант осуществления 90: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную легкую (VL) цепь антитела 3G7RY.

Вариант осуществления 91: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную тяжелую (VH) цепь антитела 3G7RY.

Вариант осуществления 92: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную легкую (VL) цепь антитела 3G7RY и переменную тяжелую (VH) цепь антитела 3G7RY.

Вариант осуществления 93: Антитело согласно варианту осуществления 1, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv) человеческого антитела 3G7RY.

Вариант осуществления 94: Антитело согласно варианту осуществления 1, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой человеческий IgG 3G7RY.

Вариант осуществления 95: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VH CDR1 и/или VH CDR2, и/или VH CDR3 антитела YS6.

Вариант осуществления 96: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VL CDR1 и/или VL CDR2, и/или VL CDR3 антитела YS6.

Вариант осуществления 97: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 антитела YS6.

Вариант осуществления 98: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную легкую (VL) цепь антитела YS6.

Вариант осуществления 99: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную тяжелую (VH) цепь антитела YS6.

Вариант осуществления 100: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную легкую (VL) цепь антитела YS6 и переменную тяжелую (VH) цепь антитела YS6.

Вариант осуществления 101: Антитело согласно варианту осуществления 1, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv) человеческого антитела YS6.

Вариант осуществления 102: Антитело согласно варианту осуществления 1, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой человеческий IgG YS6.

Вариант осуществления 103: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VH CDR1 и/или VH CDR2, и/или VH CDR3 антитела YS1.

Вариант осуществления 104: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VL CDR1 и/или VL CDR2, и/или VL CDR3 антитела YS1.

Вариант осуществления 105: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 антитела YS1.

Вариант осуществления 106: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную легкую (VL) цепь антитела YS1.

Вариант осуществления 107: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную тяжелую (VH) цепь антитела YS1.

Вариант осуществления 108: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную легкую (VL) цепь антитела YS1 и переменную тяжелую (VH) цепь антитела YS1.

Вариант осуществления 109: Антитело согласно варианту осуществления 1, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv) человеческого антитела YS1.

Вариант осуществления 110: Антитело согласно варианту осуществления 1, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой человеческий IgG YS1.

Вариант осуществления 111: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VH CDR1 и/или VH CDR2, и/или VH CDR3 антитела YS3.

Вариант осуществления 112: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VL CDR1 и/или VL CDR2, и/или VL CDR3 антитела YS3.

Вариант осуществления 113: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 антитела YS3.

Вариант осуществления 114: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную легкую (VL) цепь антитела YS3.

Вариант осуществления 115: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную тяжелую (VH) цепь антитела YS3.

Вариант осуществления 116: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную легкую (VL) цепь антитела YS3 и переменную тяжелую (VH) цепь антитела YS3.

Вариант осуществления 117: Антитело согласно варианту осуществления 1, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv) человеческого антитела YS3.

Вариант осуществления 118: Антитело согласно варианту осуществления 1, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой человеческий IgG YS3.

Вариант осуществления 119: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VH CDR1 и/или VH CDR2, и/или VH CDR3 антитела YS4.

Вариант осуществления 120: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VL CDR1 и/или VL CDR2, и/или VL CDR3 антитела YS4.

Вариант осуществления 121: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 антитела YS4.

Вариант осуществления 122: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную легкую (VL) цепь антитела YS4.

Вариант осуществления 123: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную тяжелую (VH) цепь антитела YS4.

Вариант осуществления 124: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную легкую (VL) цепь антитела YS4 и переменную тяжелую (VH) цепь антитела YS4.

Вариант осуществления 125: Антитело согласно варианту осуществления 1, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv) человеческого антитела YS4.

Вариант осуществления 126: Антитело согласно варианту осуществления 1, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой человеческий IgG YS4.

Вариант осуществления 127: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VH CDR1 и/или VH CDR2, и/или VH CDR3 антитела YS8.

Вариант осуществления 128: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VL CDR1 и/или VL CDR2, и/или VL CDR3 антитела YS8.

Вариант осуществления 129: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 антитела YS8.

Вариант осуществления 130: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную легкую (VL) цепь антитела YS8.

Вариант осуществления 131: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную тяжелую (VH) цепь антитела YS8.

Вариант осуществления 132: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную легкую (VL) цепь антитела YS8 и переменную тяжелую (VH) цепь антитела YS8.

Вариант осуществления 133: Антитело согласно варианту осуществления 1, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv) человеческого антитела YS8.

Вариант осуществления 134: Антитело согласно варианту осуществления 1, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой человеческий IgG YS8.

Вариант осуществления 135: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VH CDR1 и/или VH CDR2, и/или VH CDR3 антитела YS7.

Вариант осуществления 136: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VL CDR1 и/или VL CDR2, и/или VL CDR3 антитела YS7.

Вариант осуществления 137: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 антитела YS7.

Вариант осуществления 138: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную легкую (VL) цепь антитела YS7.

Вариант осуществления 139: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную тяжелую (VH) цепь антитела YS7.

Вариант осуществления 140: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную легкую (VL) цепь антитела YS7 и переменную тяжелую (VH) цепь антитела YS7.

Вариант осуществления 141: Антитело согласно варианту осуществления 1, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv) человеческого антитела YS7.

Вариант осуществления 142: Антитело согласно варианту осуществления 1, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой человеческий IgG YS7.

Вариант осуществления 143: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VH CDR1 и/или VH CDR2, и/или VH CDR3 антитела YS9.

Вариант осуществления 144: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VL CDR1 и/или VL CDR2, и/или VL CDR3 антитела YS9.

Вариант осуществления 145: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 антитела YS9.

Вариант осуществления 146: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную легкую (VL) цепь антитела YS9.

Вариант осуществления 147: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную тяжелую (VH) цепь антитела YS9.

Вариант осуществления 148: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную легкую (VL) цепь антитела YS9 и переменную тяжелую (VH) цепь антитела YS9.

Вариант осуществления 149: Антитело согласно варианту осуществления 1, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv) человеческого антитела YS9.

Вариант осуществления 150: Антитело согласно варианту осуществления 1, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой человеческий IgG YS9.

Вариант осуществления 151: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VH CDR1 и/или VH CDR2, и/или VH CDR3 антитела YS10.

Вариант осуществления 152: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VL CDR1 и/или VL CDR2, и/или VL CDR3 антитела YS10.

Вариант осуществления 153: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 антитела YS10.

Вариант осуществления 154: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную легкую (VL) цепь антитела YS10.

Вариант осуществления 155: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную тяжелую (VH) цепь антитела YS10.

Вариант осуществления 156: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную легкую (VL) цепь антитела YS10 и переменную тяжелую (VH) цепь антитела YS10.

Вариант осуществления 157: Антитело согласно варианту осуществления 1, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv) человеческого антитела YS10.

Вариант осуществления 158: Антитело согласно варианту осуществления 1, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой человеческий IgG YS10.

Вариант осуществления 159: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VH CDR1 и/или VH CDR2, и/или VH CDR3 антитела YS11.

Вариант осуществления 160: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VL CDR1 и/или VL CDR2, и/или VL CDR3 антитела YS11.

Вариант осуществления 161: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 антитела YS11.

Вариант осуществления 162: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную легкую (VL) цепь антитела YS11.

Вариант осуществления 163: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную тяжелую (VH) цепь антитела YS11.

Вариант осуществления 164: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную легкую (VL) цепь антитела YS11 и переменную тяжелую (VH) цепь антитела YS11.

Вариант осуществления 165: Антитело согласно варианту осуществления 1, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv) человеческого антитела YS11.

Вариант осуществления 166: Антитело согласно варианту осуществления 1, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой человеческий IgG YS11.

Вариант осуществления 167: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VH CDR1 и/или VH CDR2, и/или VH CDR3 антитела 3G7HY.

Вариант осуществления 168: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VL CDR1 и/или VL CDR2, и/или VL CDR3 антитела 3G7HY.

Вариант осуществления 169: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 антитела 3G7HY.

Вариант осуществления 170: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную легкую (VL) цепь антитела 3G7NY.

Вариант осуществления 171: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную тяжелую (VH) цепь антитела 3G7NY.

Вариант осуществления 172: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную легкую (VL) цепь антитела 3G7NY и переменную тяжелую (VH) цепь антитела 3G7NY.

Вариант осуществления 173: Антитело согласно варианту осуществления 1, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv) человеческого антитела 3G7NY.

Вариант осуществления 174: Антитело согласно варианту осуществления 1, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой человеческий IgG 3G7NY.

Вариант осуществления 175: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VH CDR1 и/или VH CDR2, и/или VH CDR3 антитела 3G7NY.

Вариант осуществления 176: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VL CDR1 и/или VL CDR2, и/или VL CDR3 антитела 3G7NY.

Вариант осуществления 177: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 антитела 3G7NY.

Вариант осуществления 178: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную легкую (VL) цепь антитела 3G7NY.

Вариант осуществления 179: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную тяжелую (VH) цепь антитела 3G7NY.

Вариант осуществления 180: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную легкую (VL) цепь антитела 3G7NY и переменную тяжелую (VH) цепь антитела 3G7NY.

Вариант осуществления 181: Антитело согласно варианту осуществления 1, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv) человеческого антитела 3G7NY.

Вариант осуществления 182: Антитело согласно варианту осуществления 1, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой человеческий IgG 3G7NY.

Вариант осуществления 183: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VH CDR1 и/или VH CDR2, и/или VH CDR3 антитела 3G7.

Вариант осуществления 184: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VL CDR1 и/или VL CDR2, и/или VL CDR3 антитела 3G7.

Вариант осуществления 185: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 антитела 3G7.

Вариант осуществления 186: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную легкую (VL) цепь антитела 3G7.

Вариант осуществления 187: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную тяжелую (VH) цепь антитела 3G7.

Вариант осуществления 188: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную легкую (VL) цепь антитела 3G7 и переменную тяжелую (VH) цепь антитела 3G7.

Вариант осуществления 189: Антитело согласно варианту осуществления 1, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv) человеческого антитела 3G7.

Вариант осуществления 190: Антитело согласно варианту осуществления 1, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой человеческий IgG 3G7.

Вариант осуществления 191: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VH CDR1 и/или VH CDR2, и/или VH CDR3 антитела SB2.

Вариант осуществления 192: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VL CDR1 и/или VL CDR2, и/или VL CDR3 антитела SB2.

Вариант осуществления 193: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 антитела SB2.

Вариант осуществления 194: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную легкую (VL) цепь антитела SB2.

Вариант осуществления 195: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную тяжелую (VH) цепь антитела SB2.

Вариант осуществления 196: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную легкую (VL) цепь антитела SB2 и переменную тяжелую (VH) цепь антитела SB2.

Вариант осуществления 197: Антитело согласно варианту осуществления 1, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv) человеческого антитела SB2.

Вариант осуществления 198: Антитело согласно варианту осуществления 1, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой человеческий IgG SB2.

Вариант осуществления 199: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VH CDR1 и/или VH CDR2, и/или VH CDR3 антитела 2C8.

Вариант осуществления 200: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VL CDR1 и/или VL CDR2, и/или VL CDR3 антитела 2C8.

Вариант осуществления 201: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 антитела 2C8.

Вариант осуществления 202: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную легкую (VL) цепь антитела 2C8.

Вариант осуществления 203: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную тяжелую (VH) цепь антитела 2C8.

Вариант осуществления 204: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную легкую (VL) цепь антитела 2C8 и переменную тяжелую (VH) цепь антитела 2C8.

Вариант осуществления 205: Антитело согласно варианту осуществления 1, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv) человеческого антитела 2C8.

Вариант осуществления 206: Антитело согласно варианту осуществления 1, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой человеческий IgG 2C8.

Вариант осуществления 207: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VH CDR1 и/или VH CDR2, и/или VH CDR3 антитела UA8каппа.

Вариант осуществления 208: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VL CDR1 и/или VL CDR2, и/или VL CDR3 антитела UA8каппа.

Вариант осуществления 209: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 антитела UA8каппа.

Вариант осуществления 210: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную легкую (VL) цепь антитела UA8каппа.

Вариант осуществления 211: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную тяжелую (VH) цепь антитела UA8каппа.

Вариант осуществления 212: Антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-16, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную легкую (VL) цепь антитела UA8каппа и переменную тяжелую (VH) цепь антитела UA8каппа.

Вариант осуществления 213: Антитело согласно варианту осуществления 1, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv) человеческого антитела UA8каппа.

Вариант осуществления 214: Антитело согласно варианту осуществления 1, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой человеческий IgG UA8каппа.

Вариант осуществления 215: Иммуноконъюгат, включающий антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-214, присоединенное к эффектору, при этом указанный эффектор выбран из группы, состоящей из второго антитела, детектируемой метки, цитотоксина или цитостатического агента, липосомы, содержащей лекарственное средство, радионуклида, лекарственного средства, пролекарства, вирусной частицы, цитокина и хелата.

Вариант осуществления 216: Иммуноконъюгат согласно варианту осуществления 215, отличающийся тем, что указанное антитело присоединено к цитотоксину.

Вариант осуществления 217: Иммуноконъюгат согласно варианту осуществления 216, отличающийся тем, что указанное антитело присоединено к цитотоксину, выбранному из группы, состоящей из дифтерийного токсина, экзотоксина синегнойной палочки, рицина, абрина, сапорина и тимидинкиназы.

Вариант осуществления 218: Иммуноконъюгат согласно варианту осуществления 215, отличающийся тем, что указанное антитело присоединено к цитотоксическому и/или цитостатическому лекарственному средству.

Вариант осуществления 219: Иммуноконъюгат согласно варианту осуществления 216, отличающийся тем, что указанное антитело присоединено напрямую или посредством линкера к одному или нескольким из следующего: указанному лекарственному средству; липиду или липосоме, содержащей указанное лекарственное средство; полимерному носителю, содержащему указанное лекарственное средство; и носителю в форме наночастиц, содержащему указанное лекарственное средство.

Вариант осуществления 220: Иммуноконъюгат согласно любому из вариантов осуществления 218-219, отличающийся тем, что указанное лекарственное средство представляет собой лекарственное средство против рака.

Вариант осуществления 221: Иммуноконъюгат согласно любому из вариантов осуществления 218-219, отличающийся тем, что указанное лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из ингибитора микротрубочек, ДНК-повреждающих агентов и ингибитора полимеразы.

Вариант осуществления 222: Иммуноконъюгат согласно варианту осуществления 221, отличающийся тем, что лекарственное средство представляет собой ингибитор тубулина.

Вариант осуществления 223: Иммуноконъюгат согласно варианту осуществления 222, отличающийся тем, что лекарственное средство представляет собой лекарственное средство, выбранное из группы, состоящей из ауристатина, доластатина-10, синтетических производных природного продукта доластатина-10 и мэйтансина или производного мэйтансина.

Вариант осуществления 224: Иммуноконъюгат согласно варианту осуществления 222, отличающийся тем, что лекарственное средство представляет собой лекарственное средство, выбранное из группы, состоящей из метотрексата F (ММАF), метотрексата E (ME), метотрексата E (ММАЕ), vcММАЕ и vcММАF.

Вариант осуществления 225: Иммуноконъюгат согласно варианту осуществления 222, отличающийся тем, что лекарственное средство представляет собой мэйтансин, выбранный из группы, состоящей из мертансина (DM1), DM3 и DM4.

Вариант осуществления 226: Иммуноконъюгат согласно варианту осуществления 221, отличающийся тем, что лекарственное средство представляет собой ДНК-повреждающий агент.

Вариант осуществления 227: Иммуноконъюгат согласно варианту осуществления 226, отличающийся тем, что лекарственное средство представляет собой лекарственное средство, выбранное из группы, состоящей из калихеамицина, дуокармицина и пирролобензодиазепинов.

Вариант осуществления 228: Иммуноконъюгат согласно варианту осуществления 227, отличающийся тем, что лекарственное средство представляет собой калихеамицин или аналог калихеамицина.

Вариант осуществления 229: Иммуноконъюгат согласно варианту осуществления 227, отличающийся тем, что лекарственное средство представляет собой дуокармицин.

Вариант осуществления 230: Иммуноконъюгат согласно варианту осуществления 229, отличающийся тем, что лекарственное средство представляет собой дуокармицин, выбранный из группы, состоящей из дуокармицина А, дуокармицина В1, дуокармицина В2, дуокармицина С1, дуокармицина С2, дуокармицина D, дуокармицина SA, циклопропилбензоиндол дуокармицина (CC-1065), центанамицина, рахелмицина, адозелезина, бизелезина и карзелезина.

Вариант осуществления 231: Иммуноконъюгат согласно варианту осуществления 227, отличающийся тем, что лекарственное средство представляет собой пирролобензодиазепин или димер пирролобензодиазепина.

Вариант осуществления 232: Иммуноконъюгат согласно варианту осуществления 231, отличающийся тем, что лекарственное средство представляет собой лекарственное средство, выбранное из группы, состоящей из антрамицина (и его димеров), мазетрамицина (и его димеров), томаймицина (и его димеров), протракарцина (и его димеров), хикамицина (и его димеров), неотрамицина А (и его димеров), неотрамицина В (и его димеров), DC-81 (и его димеров), сибиромиицина (и его димеров), поротрамицина А (и его димеров), поротрамицина В (и его димеров), сибаномиицина (и его димеров), аббеймицина (и его димеров), SG2000 и SG2285.

Вариант осуществления 233: Иммуноконъюгат согласно варианту осуществления 221, отличающийся тем, что лекарственное средство представляет собой ингибитор полимеразы.

Вариант осуществления 234: Иммуноконъюгат согласно варианту осуществления 233, отличающийся тем, что лекарственное средство представляет собой ингибитор поли(ADP-рибоза)-полимеразы (PARP).

Вариант осуществления 235: Иммуноконъюгат согласно варианту осуществления 234, отличающийся тем, что указанное лекарственное средство представляет собой ингибитор поли(ADP-рибоза)-полимеразы (PARP), выбранный из группы, состоящей из инипариба (BSI 201), талазопариба (BMN-673), олапариба (AZD-2281), олапариба, рукапариба (AG014699, PF-01367338), велипариба (ABT-888), CEP 9722, МК 4827, BGB-290 и 3-аминобензамида.

Вариант осуществления 236: Иммуноконъюгат согласно любому из вариантов осуществления 218-219, отличающийся тем, что указанное лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из ауристатина, доластатина, колхицина, комбретастатина и ингибиторов mTOR/PI3K.

Вариант осуществления 237: Иммуноконъюгат согласно любому из вариантов осуществления 218-219, отличающийся тем, что указанное лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из фторурацила (5-FU), капецитабина, 5-трифторметил-2'-дезоксинуридина, метотрексата натрия, ралтитрекседа, пеметрекседа, цитозин-арабинозида, 6-меркаптопурина, азатиоприна, 6-тиогуанина (6-TG), пентостатина, флударабина фосфата, кладрибина, флоксуридина (5-фтор-2), ингибитора рибонуклеотидредуктазы (RNR), циклофосфамида, неозара, ифосфамида, тиотепа, 1,3-бис(2-хлорэтил)-1-нитрозомочевины (BCNU), 1-(2-хлорэтил)-3-циклогексил-нитрозомочевины, (метил-CCNU), гексаметилмеламин, бусульфана, прокарбазина HCL, дакарбазина (DTIC), хлорамбуцила, мелфалана, цисплатина, карбоплатина, оксалиплатина, бендамустина, кармустина, хлорметина, дакарбазина (DTIC), фотемустина, ломустина, манносульфана, недаплатина, нимустина, преднимустина, ранимустина, сатраплатина, семустина, стрептозоцина, темозоломида, треосульфана, триазиквона, триэтиленмеламин, тиотепа, триплатина тетранитрата, трофосфамида, урамустина, доксорубицина, даунорубицина цитрата, митоксантрона, актиномицина D, этопозида, топотекана HCL, тенипозида (VM-26), иринотекана HCL (CPT-11), камптотецина, белотекана, рубитекана, винкристина, винбластина сульфата, винорелбина тартрата, виндезина сульфата, паклитаксела, доцетаксела, паклитаксела в форме наночастиц, абраксана, иксабепилона, ларотаксел, ортаксела, тезетаксела и винфлунина.

Вариант осуществления 238: Иммуноконъюгат согласно любому из вариантов осуществления 218-219, отличающийся тем, что указанное лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из карбоплатина, цисплатина, циклофосфамида, доцетаксела, доксорубицина, эрлотиниба, этопозида, гемцитабина, иматиниба мезилата, иринотекана, метотрексата, сорафиниба, сунитиниба, топотекана, винбластина и винкристина.

Вариант осуществления 239: Иммуноконъюгат согласно любому из вариантов осуществления 218-219, отличающийся тем, что указанное лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из ретиноевой кислоты, производного ретиноевой кислоты, доксирубина, винбластин, винкристин, циклофосфамида, ифосфамида, цисплатина, 5-фторурацила, производного камптотецина, интерферона, тамоксифена и таксола. В определенных вариантах осуществления соединение против рака выбрано из группы, состоящей из абраксана, доксорубина, динатрия памидроната, анастрозола, эгестамана, циклофосфамида, эпирубина, торемифена, летрозолола, трастузумаба, мегестролтамоксифена, паклитаксела, доцетаксела, капецитабина, гозерелина ацетата и золедроновой кислоты.

Вариант осуществления 240: Иммуноконъюгат согласно варианту осуществления 215, отличающийся тем, что указанное антитело присоединено к хелату, включающему изотоп, выбранный из группы, состоящей из ^{99}Tc , ^{203}Pb , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{72}As , ^{111}In , ^{113}In , ^{97}Ru , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{52}Fe , ^{52}Mn , ^{51}Cr , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{77}As , ^{90}Y , ^{67}Cu , ^{169}Er , ^{121}Sn , ^{127}Te , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{161}Tb , ^{109}Pd , ^{165}Dy , ^{149}Pm , ^{151}Pm , ^{153}Sm , ^{157}Gd , ^{159}Gd , ^{166}Ho , ^{172}Tm , ^{169}Yb , ^{175}Yb , ^{177}Lu , ^{105}Rh и ^{111}Ag .

Вариант осуществления 241: Иммуноконъюгат согласно варианту осуществления 215, отличающийся тем, что указанное антитело присоединено к источнику альфа-излучения.

Вариант осуществления 242: Иммуноконъюгат согласно варианту осуществления 241, отличающийся тем, что указанный источник альфа-излучения представляет собой висмут 213.

Вариант осуществления 243: Иммуноконъюгат согласно варианту осуществления 215, отличающийся тем, что указанное антитело присоединено к липиду или липосоме, образующей комплекс с лекарственным средством против рака или содержащей лекарственное средство против рака.

Вариант осуществления 244: Иммуноконъюгат согласно варианту осуществления 215, отличающийся тем, что указанное антитело присоединено к детектируемой метке.

Вариант осуществления 245: Иммуноконъюгат согласно варианту осуществления 244, отличающийся тем, что указанное антитело присоединено к детектируемой метке, выбранной из группы, состоящей из радиоактивной метки, рентгеноконтрастной метки, метки для MRI и метки для PET.

Вариант осуществления 246: Фармацевтическая композиция, содержащая: фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество и антитело согласно любому из

вариантов осуществления 1-214; и/или фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество и иммуноконъюгат согласно любому из вариантов осуществления 215-245.

Вариант осуществления 247: Фармацевтическая композиция согласно варианту осуществления 246, отличающаяся тем, что указанная композиция представляет собой стандартную лекарственную форму.

Вариант осуществления 248: Композиция согласно любому из вариантов осуществления 246-247, отличающаяся тем, что указанная композиция составлена для введения способом, выбранным из группы, состоящей из перорального введения, назального введения, ректального введения, интраперитонеальной инъекции, внутрисосудистой инъекции, подкожной инъекции, чрезкожного введения и внутримышечной инъекции.

Вариант осуществления 249: Способ ингибирования роста и/или пролиферации клетки, которая экспрессирует или сверхэкспрессирует CD46, при этом указанный способ включает: приведение в контакт указанной раковой клетки с антителом согласно любому из вариантов осуществления 1-214; и/или приведение в контакт указанной раковой клетки с иммуноконъюгатом, включающим антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-214, присоединенное к эффектору, который обладает цитостатической и/или цитотоксической активностью.

Вариант осуществления 250: Способ согласно варианту осуществления 249, отличающийся тем, что указанный способ включает приведение в контакт указанной раковой клетки с антителом согласно любому из вариантов осуществления 1-214.

Вариант осуществления 251: Способ согласно варианту осуществления 249, отличающийся тем, что указанный способ включает приведение в контакт указанной раковой клетки с иммуноконъюгатом, включающим антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-214, присоединенное к эффектору, который обладает цитостатической и/или цитотоксической активностью.

Вариант осуществления 252: Способ согласно вариантам осуществления 249-251, отличающийся тем, что указанная клетка представляет собой раковую клетку.

Вариант осуществления 253: Способ согласно варианту осуществления 252, отличающийся тем, что указанная клетка представляет собой раковую клетку, которая сверхэкспрессирует CD46.

Вариант осуществления 254: Способ согласно варианту осуществления 252, отличающийся тем, что указанная раковая клетка выбрана из группы, состоящей из рака яичника, колоректального рака, рака молочной железы, рака легких, рака предстательной железы, рака почек, рака поджелудочной железы, мезотелиомы, лимфомы, рака печени,

рака уротелия, рака желудка, множественной миеломы, мультиформной глиобластомы, глиомы, нейробластомы и рака шейки матки.

Вариант осуществления 255: Способ согласно варианту осуществления 252, отличающийся тем, что указанная раковая клетка представляет собой клетку рака предстательной железы.

Вариант осуществления 256: Способ согласно варианту осуществления 255, отличающийся тем, что указанная раковая клетка представляет собой клетку кастрационно-резистентного рака предстательной железы.

Вариант осуществления 257: Способ согласно варианту осуществления 252, отличающийся тем, что указанная раковая клетка представляет собой клетку множественной миеломы.

Вариант осуществления 258: Способ согласно любому из вариантов осуществления 252-257, отличающийся тем, что указанная клетка представляет собой метастатическую клетку.

Вариант осуществления 259: Способ согласно варианту осуществления 258, отличающийся тем, что указанная метастатическая клетка представляет собой метастазы в кости, метастазы в печень, метастазы в мочевой пузырь и/или метастазы в лимфатические узлы.

Вариант осуществления 260: Способ согласно любому из вариантов осуществления 252-258, отличающийся тем, что указанная клетка представляет собой клетку солидной опухоли.

Вариант осуществления 261: Способ согласно любому из вариантов осуществления 249 и 251-260, отличающийся тем, что указанный эффектор представляет собой радионуклид и/или цитостатическое лекарственное средство.

Вариант осуществления 262: Способ согласно варианту осуществления 261, отличающийся тем, что указанный эффектор представляет собой одно или несколько из следующего: цитотоксическое и/или цитостатическое лекарственное средство; липид или липосому, содержащую цитотоксическое и/или цитостатическое лекарственное средство; полимерный носитель, содержащий цитотоксическое и/или цитостатическое лекарственное средство; и носитель в форме наночастиц, содержащий цитотоксическое и/или цитостатическое лекарственное средство.

Вариант осуществления 261: Способ согласно варианту осуществления 262, отличающийся тем, что указанное лекарственное средство представляет собой лекарственное средство против рака.

Вариант осуществления 264: Способ согласно варианту осуществления 263, отличающийся тем, что указанное лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из ауристати́на, доластатина, колхицина, комбретастати́на и ингибиторов mTOR/PI3K.

Вариант осуществления 265: Способ согласно варианту осуществления 263, отличающийся тем, что указанное лекарственное средство представляет собой монометил ауристин F.

Вариант осуществления 266: Способ согласно варианту осуществления 263, отличающийся тем, что указанное лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из фторурацила (5-FU), капецитабина, 5-трифторметил-2'-дезоксинуридина, метотрексата натрия, ралтитрекседа, пеметрекседа, цитозин-арабинозида, б-меркаптопурина, азатиоприна, б-тиогуанина (б-TG), пентостатина, флударабина фосфата, кладрибина, флоксуридина (5-фтор-2), ингибитора рибонуклеотидредуктазы (RNR), циклофосамида, неозара, ифосамида, тиотепа, 1,3-бис(2-хлорэтил)-1-нитрозомочевины (BCNU), 1-(2-хлорэтил)-3-циклогексил-нитрозомочевины, (метил-CCNU), гексаметилмеламин, бусульфана, прокарбазина HCL, дакарбазина (DTIC), хлорамбуцила, мелфалана, цисплатина, карбоплатина, оксалиплатина, бендамустина, кармустина, хлорметина, дакарбазина (DTIC), фотемустина, ломустина, манносульфана, недаплатина, нимустина, преднимустина, ранимустина, сатраплатина, семустина, стрептозоцина, темозоломида, треосульфана, триазиквона, триэтиленмеламин, тиотепа, триплатина тетранитрата, трофосамида, урамустина, доксорубицина, даунорубицина цитрата, митоксантрона, актиномицина D, этопозида, топотекана HCL, тенипозид (VM-26), иринотекана HCL (CPT-11), камптотецина, белотекана, рубитекана, винкристина, винбластин сульфата, винорелбина тартрата, виндезина сульфата, паклитаксела, доцетаксела, паклитаксела в форме наночастиц, абраксана, иксабепилона, ларотаксела, ортатаксела, тезетаксела и винфлунина.

Вариант осуществления 267: Способ согласно варианту осуществления 263, отличающийся тем, что указанное лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из карбоплатина, цисплатина, циклофосамида, доцетаксела, доксорубицина, эрлотиниба, этопозида, гемцитабина, иматиниба мезилата, иринотекана, метотрексата, сорафениба, сунитиниба, топотекана, винбластин и винкристина.

Вариант осуществления 268: Способ согласно варианту осуществления 263, отличающийся тем, что указанное лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из ретиноевой кислоты, производного ретиноевой кислоты, доксирубицина, винбластин, винкристина, циклофосамида, ифосамида, цисплатина, 5-фторурацила, производного камптотецина, интерферона, тамоксифена и таксола. В некоторых вариантах

осуществления соединения против рака выбрано из группы, состоящей из абраксана, доксорубицина, памидроната натрия, анастрозола, эксеместана, циклофосамида, эпирубицина, торемифена, летрозолола, трастузумаба, мегестроламоксифина, паклитаксела, доцетаксела, капецитабина, гозерелина ацетата и золедроновой кислоты.

Вариант осуществления 269: Способ согласно любому из вариантов осуществления 262-268, отличающийся тем, что указанное лекарственное средство конъюгировано с указанным антителом.

Вариант осуществления 270: Способ согласно любому из вариантов осуществления 262-268, отличающийся тем, что указанное лекарственное средство содержится в липиде или липосоме, присоединенной к указанному антителу.

Вариант осуществления 271: Способ согласно любому из вариантов осуществления 262-268, отличающийся тем, что указанное лекарственное средство содержится в полимерном носителе и/или носителе в форме наночастиц, присоединенном к указанному антителу.

Вариант осуществления 272: Способ согласно варианту осуществления 249 и 251-260, отличающийся тем, что указанный эффектор представляет собой цитотоксин.

Вариант осуществления 273: Способ согласно варианту осуществления 272, отличающийся тем, что указанный цитотоксин выбран из группы, состоящей из дифтерийного токсина, экзотоксина синегнойной палочки, рицина, абрина, сапорина и тимидинкиназы.

Вариант осуществления 274: Способ согласно варианту осуществления 249, отличающийся тем, что указанный эффектор представляет собой радионуклид.

Вариант осуществления 275: Способ согласно любому из вариантов осуществления 249-274, отличающийся тем, что указанный иммуноконъюгат или антитело вводят в фармацевтической композиции, включающей фармацевтически приемлемый носитель.

Вариант осуществления 276: Способ согласно любому из вариантов осуществления 249-275, отличающийся тем, что указанное введение включает введение человеку.

Вариант осуществления 277: Способ согласно любому из вариантов осуществления 249-275, отличающийся тем, что указанное введение включает введение млекопитающему, не относящемуся к человеку.

Вариант осуществления 278: Способ согласно любому из вариантов осуществления 249-277, отличающийся тем, что указанное введение включает парентеральное введение.

Вариант осуществления 279: Способ согласно любому из вариантов осуществления 249-277, отличающийся тем, что указанное введение включает введение в опухоль или участок хирургического вмешательства.

Вариант осуществления 280: Способ согласно любому из вариантов осуществления 249-279, отличающийся тем, что указанный иммуноконъюгат вводят в качестве вспомогательной терапии при хирургическом вмешательстве и/или радиотерапии.

Вариант осуществления 281: Способ согласно любому из вариантов осуществления 249-279, отличающийся тем, что указанное антитело и/или иммуноконъюгат вводят в сочетании с другим лекарственным средством против рака и/или гормоном.

Вариант осуществления 282: Способ согласно варианту осуществления 281, отличающийся тем, что указанное антитело и/или иммуноконъюгат вводят в сочетании с абиратероном и/или энзалутамидом.

Вариант осуществления 283: Способ согласно варианту осуществления 282, отличающийся тем, что указанные клетки представляют собой клетки рака предстательной железы.

Вариант осуществления 284: Способ согласно варианту осуществления 283, отличающийся тем, что указанные клетки рака предстательной железы представляют собой клетки нейроэндокринного рака предстательной железы (NEPC).

Вариант осуществления 285: Способ согласно варианту осуществления 283, отличающийся тем, что указанные клетки рака предстательной железы представляют собой клетки метастатического кастрационно-резистентного рака предстательной железы (mCRPC), резистентные к абиратерону (Abi) или энзалутамиду (Enz).

Вариант осуществления 286: Способ детекции раковой клетки рака, который экспрессирует или сверхэкспрессирует CD46, при этом указанный способ включает: приведение в контакт указанной раковой клетки с иммуноконъюгатом, включающим антитело согласно любому из вариантов осуществления 1-214, присоединенное к детектируемой метке; и детекцию присутствия и/или локализации указанной детектируемой метки, при этом присутствие и/или локализация является признаком локализации и/или присутствия раковой клетки.

Вариант осуществления 287: Способ согласно варианту осуществления 286, отличающийся тем, что указанная метка представляет собой метку, выбранную из группы, состоящей из радиоактивной метки, рентгеноконтрастной метки, метки для MRI, метки для PET и метки для SPECT.

Вариант осуществления 288: Способ согласно варианту осуществления 286, отличающийся тем, что указанная детектируемая метка выбрана из группы, состоящей из источника гамма-излучения, источника позитронов, источника рентгеновского излучения, источника альфа-излучения и источника флуоресцентного излучения.

Вариант осуществления 289: Способ согласно любому из вариантов осуществления 286-288, отличающийся тем, что указанная раковая клетка выбрана из группы, состоящей из рака яичника, колоректального рака, рака молочной железы, рака легких, рака предстательной железы, рака почек, рака поджелудочной железы, мезотелиомы, лимфомы, рака печени, рака уротелия, рака желудка, множественной миеломы, глиомы, нейробластомы и рака шейки матки.

Вариант осуществления 290: Способ согласно варианту осуществления 289, отличающийся тем, что указанная раковая клетка представляет собой клетку рака предстательной железы.

Вариант осуществления 291: Способ согласно варианту осуществления 290, отличающийся тем, что указанная раковая клетка представляет собой клетку кастрационно-резистентного рака предстательной железы.

Вариант осуществления 292: Способ согласно варианту осуществления 289, отличающийся тем, что указанная раковая клетка представляет собой клетку множественной миеломы.

Вариант осуществления 293: Способ согласно любому из вариантов осуществления 286-292, отличающийся тем, что указанное приведение в контакт включает введение указанного иммуноконъюгата млекопитающему, не относящемуся к человеку.

Вариант осуществления 294: Способ согласно любому из вариантов осуществления 286-292, отличающийся тем, что указанное приведение в контакт включает введение указанного иммуноконъюгата человеку.

Вариант осуществления 295: Способ согласно любому из вариантов осуществления 286-294, отличающийся тем, что указанная детекция включает детекцию указанной метки *in vivo*.

Вариант осуществления 296: Способ согласно варианту осуществления 295, отличающийся тем, что указанная детекция включает применение способа детекции, выбранного из группы, состоящей из рентгеновского анализа, PET, SPECT, MRI и CAT.

Вариант осуществления 297: Способ согласно любому из вариантов осуществления 286-294, отличающийся тем, что указанная детекция включает детекцию указанной метки *ex vivo* в биопсии или образце, полученном из биопсии.

Вариант осуществления 298: Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело или фрагмент антитела согласно любому из вариантов осуществления 1-214.

Вариант осуществления 299: Экспрессионный вектор, включающий нуклеиновую кислоту согласно варианту осуществления 298.

Вариант осуществления 300: Клетка, включающая экспрессионный вектор согласно варианту осуществления 299.

Определения

Термины «полипептид», «пептид» и «белок» используются здесь взаимозаменяемо для обозначения полимера, состоящего из аминокислотных остатков. Данные термины применяются к аминокислотным полимерам, в которых один или более аминокислотных остатков являются искусственными химическими аналогами соответствующей природной аминокислоты, а также к природным аминокислотным полимерам. Термин также включает варианты с типичной пептидной связью, соединяющей аминокислоты, составляющие полипептид.

Термины «нуклеиновая кислота» или «олигонуклеотид», или грамматические эквиваленты, используемые в настоящем документе, означают по меньшей мере два нуклеотида, ковалентно связанных друг с другом. Нуклеиновая кислота согласно настоящему изобретению предпочтительно является одноцепочечной или двухцепочечной и, главным образом, будет содержать фосфодиэфирные связи, хотя в некоторых случаях, указанных ниже, включаются аналоги нуклеиновых кислот, которые могут обладать альтернативными остовами, содержащими, например, фосфорамидные (Beaucage *et al.* (1993) *Tetrahedron* 49(10):1925) и ссылки в них; Letsinger (1970) *J. Org. Chem.* 35:3800; Sprinzi *et al.* (1977) *Eur. J. Biochem.* 81: 579; Letsinger *et al.* (1986) *Nucl. Acids Res.* 14: 3487; Sawai *et al.* (1984) *Chem. Lett.* 805, Letsinger *et al.* (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110: 4470; и Pauwels *et al.* (1986) *Chemica Scripta* 26: 1419), фосфоротиоатные (Mag *et al.* (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:1437; и патент США 5644048), фосфородитиоатные (Briu *et al.* (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111 :2321, О-метилфосфорамидитные связи (смотри Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Press), и остовы и связи пептидных нуклеиновых кислот (смотри Egholm (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114:1895; Meier *et al.* (1992) *Chem. Int. Ed. Engl.* 31: 1008; Nielsen (1993) *Nature*, 365: 566; Carlsson *et al.* (1996) *Nature* 380: 207). Другие аналогичные нуклеиновые кислоты включают такие нуклеиновые кислоты, которые содержат положительные остовы (Denpcy *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6097; неионные остовы (патенты США 5386023, 5637684, 5602240, 5216141 и 4469863; Angew. (1991) *Chem. Intl. Ed. English* 30: 423; Letsinger *et al.* (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470; Letsinger *et al.* (1994) *Nucleoside & Nucleotide* 13:1597; Chapters 2 and 3, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. Y.S. Sanghui and P. Dan Cook; Mesmaeker *et al.* (1994), *Bioorganic & Medicinal Chem. Lett.* 4: 395; Jeffs *et al.* (1994) *J. Biomolecular NMR* 34:17; *Tetrahedron Lett.* 37:743 (1996)) и нерибозные остовы,

включая описанные в патентах США 5235033 и 5034506, и главах 6 и 7, ASC Symposium Series 580, «Carbohydrate Modifications in Antisense Research», Ed. Y.S. Sanghui и P. Dan Cook. Нуклеиновые кислоты, содержащие один или более карбоциклических сахаров, также включены в рамки определения нуклеиновых кислот (*смотри Jenkins et al. (1995), Chem. Soc. Rev. pp169-176*). Некоторые аналоги нуклеиновых кислот описаны в Rawls, C & E News June 2, 1997 page 35. Эти модификации рибозо-фосфатного остова могут быть сделаны для содействия добавлению дополнительных фрагментов, таких как метки, или для повышения стабильности и периода полувыведения таких молекул в физиологических средах.

Используемый здесь термин «остаток» относится к природным, синтетическим или модифицированным аминокислотам.

Используемое здесь «антитело» относится к белку, состоящему из одного или нескольких полипептидов, по существу кодируемых генами иммуноглобулинов или фрагментами генов иммуноглобулинов. Распознаваемые гены иммуноглобулинов включают гены константных участков каппа, лямбда, альфа, гамма, дельта, эpsilon и мю, а также многочисленные гены переменных областей иммуноглобулинов. Легкие цепи классифицируются как каппа- или лямбда-цепи. Тяжелые цепи классифицируются как гамма-, мю-, альфа-, дельта- или эpsilon-цепи, что в свою очередь определяет классы иммуноглобулинов IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, соответственно.

Типичная структурная единица иммуноглобулина (антитела), как известно, содержит тетрамер. Каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, при этом каждая пара имеет одну «легкую» цепь (около 25 кДа) и одну «тяжелую» цепь (около 50-70 кДа). N-конец каждой цепи содержит переменную область, состоящую примерно из 100-110 или более аминокислот, которая ответственна прежде всего за распознавание антигена. Термины «переменная легкая цепь» (V_L) и «переменная тяжелая цепь» (V_H) относятся к этим легким и тяжелым цепям, соответственно.

Антитела существуют в виде интактных иммуноглобулинов или в виде множества хорошо описанных фрагментов, образуемых при расщеплении различными пептидазами. Так, например, пепсин расщепляет антитело ниже дисульфидных связей в шарнирной области с образованием $F(ab)'_2$, димера Fab, который сам по себе представляет легкую цепь, соединенную с V_H - C_{H1} дисульфидной связью. $F(ab)'_2$ можно разделить в мягких условиях с разрушением дисульфидной связи в шарнирной области, тем самым превращая димер $(Fab)'_2$ в мономер Fab' . По существу мономер Fab' представляет собой Fab с частью шарнирной области (более подробное описание других фрагментов антител смотри в

Fundamental Immunology, W.E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993),). Несмотря на то, что различные фрагменты антител определены в отношении расщепления интактного антитела, специалисту в данной области будет понятно, что такие фрагменты Fab' можно синтезировать *de novo* химически или используя методологию рекомбинантных ДНК. Таким образом, термин «антитело», используемый здесь, также включает фрагменты антитела, полученные путем модификации целых антител или синтезированные *de novo* с использованием методологий рекомбинантных ДНК. Определенные предпочтительные антитела включают одноцепочечные антитела (антитела, которые существуют в виде одиночной полипептидной цепи), более предпочтительно одноцепочечные Fv-фрагменты (sFv или scFv) антител, в которых переменная тяжелая и переменная легкая цепи соединены вместе (напрямую или посредством пептидного линкера) с образованием непрерывного полипептида. Одноцепочечный Fv-фрагмент антитела представляет собой ковалентно связанный гетеродимер V_H-V_L , который может экспрессироваться из нуклеиновой кислоты, содержащей V_H - и V_L -кодирующие последовательности, соединенные напрямую или посредством кодирующего пептид линкера. Huston, *et al.* (1988) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 85: 5879-5883. Несмотря на то, что V_H и V_L соединены друг с другом в виде одиночной полипептидной цепи, домены V_H и V_L являются нековалентно связанными. Молекулы первого функционального антитела, подлежащие экспрессии на поверхности нитчатого фага, представляли собой одноцепочечные Fv фрагменты (scFv), однако, альтернативные стратегии экспрессии также были успешными. Например, молекулы Fab могут быть представлены на фаге, если одна из цепей (тяжелая или легкая) слита с капсидным белком g3 и комплементарная цепь экспортируется в периплазму в виде растворимой молекулы. Две цепи могут быть кодированы на одном и том же или разных репликациях; важным моментом является то, что две цепи антитела в каждой молекуле Fab собираются посттрансляционно и димер встраивается в частицу фага посредством связи одной из цепей, *например*, с g3p (*смотри, например*, патент США: 5733743). Антитела scFv и ряд других структур, преобразующих агрегированные в природе, но разделенные химически легкие и тяжелые полипептидные цепи из V-области антитела в молекулу, которая сворачивается в трехмерную структуру, по существу сходную со структурой антигенсвязывающего участка, известны специалистам в данной области (*смотри, например*, патенты США 5091513, 5132405 и 4956778). Особенно предпочтительные антитела должны включать все антитела, которые были представлены на фаге (*например*, scFv, Fv, Fab и дисульфид-связанный Fv (Reiter *et al.* (1995) *Protein Eng.* 8: 1323-1331).

Используемый здесь термин «специфически связывается» в отношении биомолекулы (*например*, белка, нуклеиновой кислоты, антитела и *т.п.*) относится к реакции связывания, которая является определяющим фактором присутствия биомолекулы в гетерогенной популяции молекул (*например*, белков и других биологических молекул). Таким образом, в заданных условиях (*например*, в условиях иммунологического анализа в случае антитела или в жестких условиях гибридизации в случае нуклеиновой кислоты) указанный лиганд или антитело связывается со своей конкретной молекулой-«мишенью» и не связывается в значительном количестве с другими молекулами, присутствующими в образце.

Используемое здесь выражение «ингибирование пролиферации клетки, экспрессирующей CD46» относится к способности анти-CD46 антитела или иммуноконъюгата, описанного здесь, уменьшать, предпочтительно до статистически значимого уменьшения, пролиферацию клетки, экспрессирующей CD46, по сравнению с пролиферацией при отсутствии антитела или иммуноконъюгата. В одном варианте осуществления пролиферация клетки, экспрессирующей CD46 (*например*, раковой клетки) может быть уменьшена по меньшей мере на 10% или по меньшей мере на 20%, или по меньшей мере на 30%, или по меньшей мере на 40%, или по меньшей мере на 50%, или по меньшей мере на 60%, или по меньшей мере на 70%, или по меньшей мере на 80%, или по меньшей мере на 90%, или на 100% при приведении в контакт клетки с антителом или его антигенсвязывающей частью, или иммуноконъюгатом, описанным здесь, по сравнению с пролиферацией, измеренной при отсутствии антитела или его антигенсвязывающей части, или иммуноконъюгата (контроль). Клеточную пролиферацию можно оценить с использованием признанных в данной области методик, с помощью которых можно измерить скорость клеточного деления, долю клеток в клеточной популяции, которые подверглись клеточному делению, и/или скорость утраты клеток из клеточной популяции вследствие терминальной дифференцировки или клеточной гибели (*например*, с использованием анализа «Cell Titer Glow» или включения тимидина).

Используемое здесь выражение «ингибирование миграции клеток, экспрессирующих CD46» относится к способности анти-CD46 антитела или его антигенсвязывающей части, или иммуноконъюгата, описанного здесь, уменьшать, предпочтительно до статистически значимого уменьшения, миграцию клетки, экспрессирующей CD46, по сравнению с миграцией клетки при отсутствии антитела. В одном варианте осуществления миграция клетки, экспрессирующей CD46 (*например*, раковой клетки), может быть уменьшена по меньшей мере на 10% или по меньшей мере на 20%, или по меньшей мере на 30%, или по меньшей мере на 40%, или по меньшей мере

на 50%, или по меньшей мере на 60%, или по меньшей мере на 70%, или по меньшей мере на 80%, или по меньшей мере на 90%, или по меньшей мере на 100% при приведении в контакт клетки с антителом или его антигенсвязывающей частью, или его иммуноконъюгатом по сравнению с миграцией клеток, измеренной при отсутствии антитела или его антигенсвязывающей части, или его иммуноконъюгата (контроль). Клеточную миграцию можно оценить с использованием признанных в данной области методик. В различных вариантах осуществления предполагается, что антитела и/или их иммуноконъюгаты, описанные здесь, могут ингибировать миграцию клеток (*например*, раковых клеток, описанных здесь), экспрессирующих или сверхэкспрессирующих CD46.

Используемый здесь термин «антигенсвязывающая часть» антитела (или просто «часть антитела») относится к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном (*например*, домен 1 и/или домен 2 CD46). Показано, что антигенсвязывающая функция антитела может быть осуществлена фрагментами полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемые термином «антигенсвязывающая часть» антитела, включают (i) Fab-фрагмент, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов V_L , V_H , C_L и C_{H1} ; (ii) $F(ab')_2$ -фрагмент, бивалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fd-фрагмент, состоящий из доменов V_H и C_{H1} ; (iv) Fv-фрагмент, состоящий из доменов V_L и V_H в едином плече антитела, (v) dAb, включающее домены V_H и V_L ; (vi) dAb-фрагмент (*смотри, например, Ward et al. (1989) Nature 341: 544-546*), который состоит из домена V_H ; (vii) dAb, которое состоит из домена V_H или V_L ; и (viii) выделенную определяющую комплементарную область (CDR) или (ix) комбинацию двух или нескольких выделенных CDR, которые могут быть необязательно соединены с помощью синтетического линкера. Кроме того, хотя два домена Fv-фрагмента, V_L и V_H , могут кодироваться разными генами, они могут быть соединены при помощи рекомбинатных способов с использованием синтетического линкера, что позволяет получать их в виде единой белковой цепи, в которой области V_L и V_H спариваются с образованием моновалентных молекул (известных как одноцепочечный Fv (scFv); *смотри, например, Bird et al. (1988) Science 242: 423-426; и Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883*). Предполагается, что такие одноцепочечные антитела также охватываются термином «антигенсвязывающая часть» антитела. Такие фрагменты антител получают с использованием общепринятых способов, известных специалистам в данной области, и эти фрагменты подвергают скринингу таким же способом, как и интактные антитела. Антигенсвязывающие части могут быть получены с

помощью технологий рекомбинантных ДНК или путем ферментативного или химического расщепления интактных иммуноглобулинов.

Используемый здесь термин «моноклональное антитело» относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, *то есть* отдельные антитела, составляющие эту популяцию, являются идентичными, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифическими, будучи направленными против единственного антигенного участка. Кроме того, в отличие от традиционных препаратов (поликлональных) антител, которые обычно включают различные антитела, направленные против различных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против единственной детерминанты на данном антигене. Моноклональные антитела могут быть получены с использованием любого признанного в данной области способа, а также описанных здесь способов, таких как, например, метод гибридом, описанный Kohler *et al.* (1975) *Nature*, 256: 495, использование трансгенного животного (смотри, *например*, Lonberg, *et al.* (1994) *Nature* 368(6474): 856-859), методы рекомбинантных ДНК (смотри, *например*, патент США 4816567), или использование фаговых библиотек антител, созданных с помощью технологий, описанных, например, в работе Clackson *et al.* (1991) *Nature*, 352: 624-628, и Marks *et al.* (1991) *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597. Моноклональные антитела включают химерные антитела, человеческие антитела и гуманизированные антитела, и могут образовываться естественным путем или могут быть получены рекомбинантно.

Термин «рекомбинантное антитело» относится к антителам, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными способами, например, (a) антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое является трансгенным или трансхромосомным в отношении генов иммуноглобулина (например, генов иммуноглобулина человека), или полученной из них гибридомы, (b) антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии антитела, например, из трансфектомы, (c) антитела, выделенные из библиотеки рекомбинантных, комбинаторных антител (например, содержащей последовательности человеческого антитела) с использованием фагового дисплея, и (d) антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими способами, включающими сплайсинг последовательностей генов иммуноглобулинов (например, генов иммуноглобулинов человека) в другие ДНК-последовательности. Такие рекомбинантные антитела могут иметь переменные и константные области, полученные

из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Однако в некоторых вариантах осуществления такие рекомбинантные человеческие антитела могут быть подвергнуты *in vitro* мутагенезу и, следовательно, аминокислотные последовательности областей V_H и V_L рекомбинантных антител являются последовательностями, которые, хотя и получены из последовательностей V_H и V_L зародышевой линии человека, могут не существовать в природе в репертуаре зародышевой линии антител человека *in vivo*.

Термин «химерный иммуноглобулин» или антитело относится к иммуноглобулину или антителу, переменные области которых получены из одного вида, а константные области - из другого вида. Химерные иммуноглобулины или антитела могут быть получены, например, методами генетической инженерии, из сегментов генов иммуноглобулинов, принадлежащих разным видам.

Используемый здесь термин «человеческое антитело» включает антитела, имеющие переменные области, в которых как каркасные, так и CDR-области получены из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека, как описано, например, Kabat *et al.* (смотри Kabat, *et al.* (1991) Sequences of proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). Кроме того, если данное антитело содержит константную область, то константная область также получена из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Человеческие антитела могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, вследствие мутаций, внесенных случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro*, или вследствие соматической мутации *in vivo*). Однако используемый здесь термин «человеческое антитело» не включает антитела, в которых CDR-последовательности, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающего, такого как мышь, были привиты на каркасные последовательности человека.

Человеческое антитело может иметь по меньшей мере одну или несколько аминокислот, замененных аминокислотным остатком, *например*, усиливающим активность аминокислотным остатком, который не кодируется последовательностью иммуноглобулина зародышевой линии человека. Как правило, человеческое антитело может иметь вплоть до двадцати положений, замененных аминокислотными остатками, которые не являются частью последовательности иммуноглобулина зародышевой линии человека. В конкретном варианте осуществления эти замены находятся в областях CDR, как подробно описано ниже.

Термин «гуманизированный иммуноглобулин» или «гуманизированное антитело» относится к иммуноглобулину или антителу, которое включает по меньшей мере одну цепь гуманизированного иммуноглобулина или антитела (то есть по меньшей мере одну гуманизированную легкую или тяжелую цепь). Термин «гуманизированная цепь иммуноглобулина» или «гуманизированная цепь антитела» (*то есть* «гуманизированная легкая цепь иммуноглобулина» или «гуманизированная тяжелая цепь иммуноглобулина») относится к цепи иммуноглобулина или антитела (*то есть* к легкой или тяжелой цепи, соответственно), переменная область которой включает переменный каркасный участок в основном из иммуноглобулина или антитела человека и определяющие комплементарность области (CDR) (например, по меньшей мере одну CDR, предпочтительно две CDR, более предпочтительно три CDR) в основном из иммуноглобулина или антитела, не принадлежащего человеку, и дополнительно содержит константные области (например, по меньшей мере одну константную область или ее часть в случае легкой цепи и предпочтительно три константных области в случае тяжелой цепи). Термин «гуманизированная переменная область» (например, «гуманизированная переменная область легкой цепи» или «гуманизированная переменная область тяжелой цепи») относится к переменной области, которая включает переменную каркасную область в основном из иммуноглобулина или антитела человека и определяющие комплементарность области (CDR) в основном из иммуноглобулина или антитела, не принадлежащего человеку.

Используемое здесь «гетерологичное антитело» определено в отношении трансгенного нечеловеческого организма или растения, вырабатывающего такое антитело.

Используемое здесь «выделенное антитело» относится к антителу, которое по существу не содержит других антител, имеющих другие антигенные специфичности (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с CD46, по существу не содержит антител, которые специфически связываются с антигенами, отличными от CD46). Кроме того, выделенное антитело обычно по существу не содержит другого клеточного материала и/или химических соединений. В одном варианте осуществления комбинации «выделенных» моноклональных антител, обладающих отличающимися специфичностями связывания с CD46, объединены в хорошо описанную композицию.

Используемый здесь «изотип» относится к классу антитела (*например*, IgM или IgG1), который кодируется генами константной области тяжелой цепи. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть относится к изотипу, выбранному из изотипов антитела IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD

или IgE. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело согласно изобретению относится к изолипу IgG1. В других вариантах осуществления моноклональное антитело согласно изобретению относится к изолипу IgG2.

«Антиген» представляет собой молекулу (*например*, белковую молекулу или пептид), с которой связывается антитело или его антигенсвязывающая часть. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения антиген представляет собой CD46, *например*, который презентирован на клетке (*например*, CD46-положительной раковой клетке).

Термин «эпитоп» или «антигенная детерминанта» относится к участку на антигене, с которым специфически связывается иммуноглобулин или антитело. Эпитопы могут быть образованы из заменимых аминокислот или незаменимых аминокислот, соединенных третичной структурой белка. Эпитопы, образованные из заменимых аминокислот, обычно сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные третичной структурой, обычно теряются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп обычно включает по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Способы определения пространственной конформации эпитопов включают методики, известные в данной области, а также описанные здесь, *например*, рентгеновскую кристаллографию и 2-мерный ядерный магнитный резонанс (смотри, *например*, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)).

Также, в настоящем документе рассматриваются антитела, которые связываются с одним и тем же или перекрывающимся эпитопом, что и описанные здесь антитела YS5, YS5F, YS5v1D, SB1HGNY, YS12, 3G7RY (aka 3G8), YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и/или UA8kappa. Антитела, которые распознают один и тот же эпитоп, могут быть идентифицированы с использованием обычных методов, таких как иммуноанализ, *например*, путем демонстрации способности одного антитела блокировать связывание другого антитела с целевым антигеном, *то есть* анализа конкурентного связывания. Конкурентное связывание определяют в анализе, в котором иммуноглобулин при тестировании ингибирует специфическое связывание референсного антитела с обычным антигеном, таким как домен 1 и/или домен 2 CD46. Известно множество разновидностей анализов конкурентного связывания, *например*: твердофазный прямой или непрямой радиоиммунологический анализ (RIA), твердофазный прямой или непрямой иммуноферментный анализ (EIA), анализ конкурентного связывания по типу сэндвича (*смотри, например*, Stahl *et al.* (1983) *Meth.*

Enzymol., 9: 242); твердофазный прямой EIA с биотином-авидином (смотри Kirkland *et al.*, (1986) *J. Immunol.* 137: 3614); твердофазный прямой анализ с мечеными веществами, твердофазный прямой анализ с мечеными веществами по типу сэндвича (смотри, например, Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); твердофазный прямой RIA с меткой, например, с использованием метки ^{125}I (смотри, например, Morel *et al.*, (1988) *Mol. Immunol.* 25(1): 7); твердофазный прямой биотин-авидин EIA (Cheung *et al.* (1990) *Virology* 176: 546); и прямой RIA с мечеными веществами (Moldenhauer *et al.* (1990) *Scand J. Immunol.* 32: 77). Как правило, в таком анализе предусмотрено использование очищенного антигена (например, домена 1 и/или домена 2 CD46), связанного с твердой поверхностью или клетками, несущими любой из них, немеченого тестируемого иммуноглобулина и меченого референсного иммуноглобулина. Конкурентное ингибирование измеряют, определяя количество метки, связанной с твердой поверхностью или клетками в присутствии тестируемого иммуноглобулина. Как правило, тестируемый иммуноглобулин находится в избытке. Как правило, когда конкурирующее антитело присутствует в избытке, оно ингибирует специфическое связывание референсного антитела с типичным антигеном по меньшей мере на 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70% 70-75% или более.

Используемые здесь термины «специфическое связывание», «специфически связывается», «селективное связывание» и «селективно связывается» означают, что антитело или его антигенсвязывающая часть проявляет желательную аффинность в отношении конкретного антигена или эпитопа и, как правило, не проявляет значительной кросс-реактивности в отношении других антигенов и эпитопов. «Желательное» или предпочтительное связывание включает связывание с аффинностью по меньшей мере (значение аффинности связывания (KD), равное или меньше чем) 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М, 10^{-10} М или 10^{-11} М. Более предпочтительными являются значения аффинности связывания более чем 10^{-9} М, предпочтительно более чем 10^{-10} М. Значения, находящиеся в промежутке между указанными величинами, также рассматриваются как находящиеся в объеме настоящего изобретения и предпочтительная аффинность связывания может быть указана в виде диапазона значений аффинностей связывания, например, от 10^{-6} М до 10^{-11} М, предпочтительно от 10^{-7} М или 10^{-8} М до 10^{-10} М. Антитело, которое «не проявляет значительной кросс-реактивности», представляет собой антитело, которое не будет желательным образом связываться с нежелательной молекулой (например, нежелательной белковой молекулой). Например, в одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть, которая специфически связывается с белком CD46 (например, доменом 1 и/или доменом 2), не будет значительно взаимодействовать с

другими молекулами и белками, отличными от CD46, или пептидами. Специфическое или селективное связывание можно определить с помощью любых признанных в данной области способов, предназначенных для определения такого связывания, включая, например, анализ Скэтчарда и/или анализы конкурентного связывания.

Используемый здесь термин « K_D » относится к константе равновесия реакции диссоциации конкретного взаимодействия антигена с антителом или аффинности антитела в отношении антигена. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с настоящим изобретением связывается с антигеном (*например*, доменом 1 и/или доменом 2 CD46) с аффинностью (K_D) 5 нМ или лучше (*то есть* или меньше) (*например*, 40 нМ или 30 нМ, или 20 нМ, или 10 нМ, или меньше), измеренной с помощью техники поверхностного плазмонного резонанса или анализа клеточного связывания. В конкретном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с настоящим изобретением связывается с CD46 с аффинностью (K_D) 5 нМ или лучше (*например*, 4 нМ, 2 нМ, 1,5 нМ, 1,4 нМ, 1,3 нМ, 1 нМ или меньше), измеренной с помощью анализа на основе поверхностного плазмонного резонанса или анализа клеточного связывания. В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть связывается с антигеном (*например*, CD46) с аффинностью (K_D) менее чем около 10^{-10} М или 100×10^{-11} М, или 10×10^{-11} М, или даже ниже, измеренной с помощью FACS с использованием живых клеток опухоли предстательной железы.

Используемый здесь термин « K_{off} » относится к константе скорости диссоциации для диссоциации антитела из комплекса антитело/антиген.

Используемый здесь термин «EC50» относится к концентрации антитела или его антигенсвязывающей части, или иммуноконъюгата, описанного здесь, которая индуцирует ответ в анализе *in vitro* или *in vivo*, который составляет 50% от максимального ответа, *то есть* составляет среднее значение между максимальным ответом и исходным уровнем.

Используемый здесь термин «природный», относящийся к определенному объекту, означает, что данный объект может существовать в природе. Например, полипептидная или полинуклеотидная последовательность, присутствующая в организме (включая вирусы), которая может быть выделена из природного источника и не была намеренно модифицирована человеком в лаборатории, является природной.

Используемый здесь термин «модифицирование» или «модификация» относится к изменению одной или более аминокислот в антителах или их антигенсвязывающих частях. Изменение можно вносить путем добавления, замены или удаления аминокислоты

по одному или нескольким положениям. Изменение можно вносить, используя известные методики, такие как PCR-мутагенез. Например, в некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающую часть, идентифицированную с использованием способов согласно изобретению, можно подвергнуть модификации, чтобы тем самым модифицировать аффинность связывания антитела или его антигенсвязывающей части с CD46.

В определенных вариантах осуществления рассматриваются «консервативные аминокислотные замены» в последовательностях анти-CD46-антител, описанных здесь, *то есть* модификации нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, которые не отменяют связывания антитела, кодируемого нуклеотидной последовательностью или содержащего аминокислотную последовательность, с антигеном, *например*, CD46. Консервативные аминокислотные замены включают замену аминокислоты одного класса аминокислотой того же класса, где класс аминокислот определяется общими физико-химическими свойствами боковых цепей аминокислот и высокой частотой замен в гомологичных белках, встречающихся в природе, что можно определить, например, с помощью стандартной матрицы частоты обмена Дейхоффа или матрицы BLOSUM. Существует шесть общих классов боковых цепей аминокислот, и такими классами являются: класс I (Cys); класс II (Ser, Thr, Pro, Ala, Gly); класс III (Asn, Asp, Gln, Glu); класс IV (His, Arg, Lys); класс V (Ile, Leu, Val, Met); и класс VI (Phe, Tyr, Trp). Так, например, замена Asp другим остатком класса III, таким как Asn, Gln или Glu, является консервативной заменой. Таким образом, прогнозируемый остаток незаменимой аминокислоты в анти-CD46 антителе предпочтительно заменен другим аминокислотным остатком этого же класса. Способы идентификации нуклеотидных и аминокислотных консервативных замен, которые не нарушают связывание антигена, хорошо известны в данной области (смотри, *например*, Brummell *et al.* (1993) *Biochem.* 32: 1180-1187; Kobayashi *et al.* (1999) *Protein Eng.* 12(10): 879-884; и Burks *et al.* (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 412-417).

Термин «неконсервативная аминокислотная замена» относится к замене аминокислоты одного класса аминокислотой из другого класса, например, замена Ala, остатка II класса, остатком III класса, таким как Asp, Asn, Glu или Gln.

В другом варианте осуществления мутации (консервативные или неконсервативные) могут быть введены случайно по всей или части последовательности, кодирующей анти-CD46 антитело, например, путем насыщающего мутагенеза, и полученные модифицированные антитела могут быть подвергнуты скринингу на активность связывания.

«Консенсусная последовательность» представляет собой последовательность, образованную из наиболее часто встречающихся аминокислот (или нуклеотидов) в семействе родственных последовательностей (смотри, *например*, Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany 1987). В семействе белков каждое положение в консенсусной последовательности занято аминокислотой, встречающейся наиболее часто в данном положении в семействе. Если две аминокислоты встречаются с одинаковой частотой, в консенсусную последовательность может быть включена любая из них. «Консенсусный каркасный участок» иммуноглобулина относится к каркасной области в консенсусной последовательности иммуноглобулина.

Аналогичным образом, консенсусная последовательность CDR может быть получена путем оптимального выравнивания аминокислотных последовательностей CDR анти-CD46 антител, описанных здесь.

Для нуклеиновых кислот термин «значительная гомология» означает, что две нуклеиновые кислоты или их определенные последовательности при оптимальном наложении и сравнении проявляют идентичность с учетом необходимых вставок или делеций нуклеотидов, по меньшей мере, примерно 80% нуклеотидов, обычно, по меньшей мере, примерно от 90% до 95% нуклеотидов или более предпочтительно, по меньшей мере, примерно от 98% до 99,5% нуклеотидов. Альтернативно, значительная гомология существует, когда сегменты гибридизуются в условиях избирательной гибридизации с комплементарной цепью.

Процент идентичности двух последовательностей является функцией числа идентичных положений, которые являются общими для последовательностей (то есть % идентичности = число идентичных положений/общее количество положений \times 100), принимая в расчет число промежутков (разрывов) и длину каждого промежутка, которые надо внести для оптимального наложения двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности двух последовательностей можно проводить с помощью математического алгоритма, как описано в неограничивающих примерах ниже.

Процент идентичности двух нуклеотидных последовательностей можно определить с помощью программы GAP в составе программного пакета GCG с применением NWSgapdna, СМР матрицы при вкладе промежутков 40, 50, 60, 70 или 80 и длине промежутка 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Процент идентичности двух нуклеотидных или аминокислотных последовательностей можно также определить с помощью алгоритма Meyers и Miller (1989) CABIOS, 4: 11-17, включенного в программу ALIGN (версия 2.0), с применением PAM120 таблицы весов остатков, штрафа за длину промежутка 12 и штрафа

за промежуток 4. Дополнительно, процент идентичности двух аминокислотных последовательностей можно определить с помощью алгоритма Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48: 444-453, включенного в программу GAP программного пакета GCG, с применением матрицы Blossum 62 или матрицы PAM250, веса промежутка 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и веса длины промежутка 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Последовательности нуклеиновой кислоты и белка согласно настоящему изобретению можно далее применять как «последовательности запроса» при проведении поиска в общественных базах данных, например, чтобы идентифицировать родственные последовательности. Такой поиск можно проводить с помощью программ NBLAST и XBLAST (версия 2.0) Altschul, *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. Поиск нуклеотидных последовательностей согласно BLAST можно проводить с помощью программы NBLAST при счете очков = 100, длине слова = 12 для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных молекулам нуклеиновой кислоты согласно изобретению. Поиск белков согласно BLAST можно проводить с помощью программы XBLAST при счете очков = 50, длине слова = 3 для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных белковым молекулам согласно изобретению. Для получения наложения с разрывами с целью сравнения можно применять Gapped BLAST, как описано в Altschul *et al.*, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402. При применении программ BLAST и Gapped BLAST можно пользоваться параметрами по умолчанию для соответствующих программ (*например*, XBLAST и NBLAST).

Композиции нуклеиновых кислот, описанные здесь (*например*, нуклеиновых кислот, кодирующих все или часть анти-CD46 антитела, или иммуноконъюгат), несмотря на то, что они часто содержат нативные последовательности (за исключением модифицированных сайтов рестрикции и т.п.) кДНК, геномных ДНК или их смесей, можно мутировать в соответствии со стандартными методиками для получения вариантных последовательностей. Для кодирующих последовательностей эти мутации могут влиять на последовательность аминокислот, по необходимости. В частности, предусмотрены последовательности ДНК, по существу гомологичные или полученные из нативных V, D, J, константных областей, последовательностей «переключателей» и других подобных последовательностей, описанных здесь (где «полученные из» указывает на то, что последовательность является идентичной или модифицирована из другой последовательности).

Термин «оперативно связанный» относится к нуклеотидной последовательности, приведенной в функциональную связь с другой нуклеотидной последовательностью. Например, ДНК препоследовательности или секреторного лидера оперативно связана с

ДНК полипептида, если он экспрессируется как пребелок, который участвует в секреции полипептида; промотор или энхансер оперативно связан с кодирующей последовательностью, если он влияет на транскрипцию последовательности; или сайт связывания рибосом оперативно связан с кодирующей последовательностью, если он позиционирован таким образом, чтобы содействовать трансляции. Как правило, «оперативно связанный» означает, что связанные последовательности ДНК являются смежными, и, в случае секреторного лидера, смежными в рамке считывания. Однако энхансеры не должны быть смежными. Связывание можно осуществлять посредством лигирования в подходящие сайты рестрикции. Если такие сайты отсутствуют, в соответствии с общепринятой практикой используют синтетические олигонуклеотидные адапторы или линкеры. Нуклеиновая кислота является «оперативно связанной», когда ее помещают в функциональное взаимодействие с другой нуклеотидной последовательностью. Например, промотор или энхансер является оперативно связанным с кодирующей последовательностью, если он влияет на транскрипцию последовательности. В отношении регулирующих транскрипцию последовательностей «оперативно связанный» означает, что последовательности ДНК, являющиеся связанными, являются смежными и, где это необходимо, соединяют две кодирующие белок области, являющиеся смежными и в рамке считывания. Для последовательностей «переключателя», «оперативно связанный» означает, что последовательности способны влиять на рекомбинацию «переключателя».

Термин «вектор», используемый здесь, относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной переносить другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Одним типом вектора является «плазмида», которая относится к кольцевой двухцепочечной петле ДНК, в которую можно лигировать дополнительные сегменты ДНК. Другим типом вектора является вирусный вектор, где дополнительные сегменты ДНК можно лигировать в вирусный геном. Определенные векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие начало репликации бактериального типа и эписомальные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомальные векторы млекопитающих) могут интегрироваться в геном клетки-хозяина при поступлении в клетку-хозяина, и поэтому реплицироваться вместе с геномом хозяина. Кроме того, некоторые векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они оперативно связаны. Такие векторы рассматриваются здесь как «рекомбинантные экспрессионные векторы» (или просто «экспрессионные векторы»). Как правило, экспрессионные векторы, используемые в методиках рекомбинантных ДНК, часто имеют

форму плазмид. Термины «плазида» и «вектор» могут быть использованы взаимозаменяемо. Однако изобретение предполагает включение других форм экспрессионных векторов, таких как вирусные векторы (например, репликационно-дефектные ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые выполняют эквивалентные функции.

Используемый здесь термин «рекомбинантная клетка-хозяин» (или просто «клетка-хозяин») относится к клетке, в которую введен экспрессионный вектор. Следует понимать, что такие термины относятся не только к конкретной рассматриваемой клетке, но и к потомству такой клетки. Так как определенные модификации в последующих поколениях могут происходить вследствие мутации или воздействия окружающей среды, такое потомство может на самом деле не быть идентичным родительской клетке, но все же подпадает под определение термина «клетка-хозяин» в контексте настоящего документа.

Используемые здесь термины «лечить», «лечение» и «терапия» относятся к терапевтическим или превентивным мерам, описанным здесь. Способы «лечения» включают введение субъекту (например, субъекту, нуждающемуся в этом) анти-CD46 антитела или его антигенсвязывающей части, или описанного здесь иммуноконъюгата, содержащего такое антитело или его антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой субъекта, у которого диагностирован CD46-положительный рак и/или который получает лечение против CD46-положительного рака (*например*, рака предстательной железы) для предупреждения, лечения, замедления, уменьшения тяжести, или для облегчения одного или нескольких симптомов заболевания или нарушения, или предотвращения повторного возникновения заболевания или нарушения, или для продления жизни субъекта за пределы ожидаемого при отсутствии такого лечения.

Термины «рак» и «раковый» относятся или описывают физиологическое состояние у млекопитающих, которое обычно характеризуется нерегулируемым клеточным ростом. CD46-положительный рак относится к раку, который характеризуется клетками, экспрессирующими или сверхэкспрессирующими CD46. Иллюстративный CD46-рак включает, но без ограничения, рак яичника, рак молочной железы, рак легких, рак предстательной железы, рак толстой кишки, рак почек и рак поджелудочной железы.

Используемый здесь термин «эффективное количество» относится к такому количеству анти-CD46 антитела или его антигенсвязывающей части, и/или его иммуноконъюгата, которое при введении субъекту является достаточным для достижения лечения, прогноза исхода заболевания или диагностики заболевания, связанного с ростом

и/или пролиферацией CD46-положительных клеток (*например*, CD46-положительный рак), как описано здесь. Терапевтически эффективное количество будет варьировать в зависимости от субъекта и стадии подлежащего лечению заболевания, веса и возраста субъекта, тяжести течения заболевания, способа введения и т.п., которое легко определяется специалистом в данной области. Дозы для введения могут изменяться, например, примерно от 1 нг до 10000 мг, примерно от 5 нг до 9500 мг, примерно от 10 нг до 9000 мг, примерно от 20 нг до 8500 мг, примерно от 30 нг до 7500 мг, примерно от 40 нг до 7000 мг, примерно от 50 нг до 6500 мг, примерно от 100 нг до 6000 мг, примерно от 200 нг до 5500 мг, примерно от 300 нг до 5000 мг, примерно от 400 нг до 4500 мг, примерно от 500 нг до 4000 мг, примерно от 1 мкг до 3500 мг, примерно от 5 мкг до 3000 мг, примерно от 10 мкг до 2600 мг, примерно от 20 мкг до 2575 мг, примерно от 30 мкг до 2550 мг, примерно от 40 мкг до 2500 мг, примерно от 50 мкг до 2475 мг, примерно от 100 мкг до 2450 мг, примерно от 200 мкг до 2425 мг, примерно от 300 мкг до 2000 мг, примерно от 400 мкг до 1175 мг, примерно от 500 мкг до 1150 мг, примерно от 0,5 мг до 1125 мг, примерно от 1 мг до 1100 мг, примерно от 1,25 мг до 1075 мг, примерно от 1,5 мг до 1050 мг, примерно от 2,0 мг до 1025 мг, примерно от 2,5 мг до 1000 мг, примерно от 3,0 мг до 975 мг, примерно от 3,5 мг до 950 мг, примерно от 4,0 мг до 925 мг, примерно от 4,5 мг до 900 мг, примерно от 5 мг до 875 мг, примерно от 10 мг до 850 мг, примерно от 20 мг до 825 мг, примерно от 30 мг до 800 мг, примерно от 40 мг до 775 мг, примерно от 50 мг до 750 мг, примерно от 100 мг до 725 мг, примерно от 200 мг до 700 мг, примерно от 300 мг до 675 мг, примерно от 400 мг до 650 мг, примерно от 500 мг или примерно от 525 мг до 625 мг анти-CD46 антитела, описанного здесь и/или его антигенсвязывающей части, и/или его иммуноконъюгата, описанного здесь. Режимы дозирования могут быть отрегулированы для обеспечения оптимального терапевтического ответа. Эффективное количество также представляет собой такое количество, при введении которого любые токсические или вредные эффекты (то есть побочные эффекты) антитела или его антигенсвязывающей части сводятся к минимуму и/или не перевешиваются благоприятными эффектами.

Термин «пациент» включает человека и другого субъекта-млекопитающего, который получает профилактическое или терапевтическое лечение.

Используемый здесь термин «субъект» включает любое животное человеческого или нечеловеческого происхождения. Например, способы и композиции согласно настоящему изобретению можно применять для лечения субъекта, имеющего рак. В конкретном варианте осуществления субъектом является человек. Термин «нечеловеческое животное» включает всех позвоночных, например, млекопитающих и не

относящихся к млекопитающим животных, таких как не относящиеся к человеку приматы, овцы, собака, корова, цыплята, земноводные, рептилии и т.д.

«Эффектор» относится к любой молекуле или комбинации молекул, активность которых является желательной для доставки внутрь клетки и/или локализации около клетки. Эффекторы включают, но без ограничения, метки, цитотоксины, ферменты, факторы роста, факторы транскрипции, антитела, лекарственные средства и т.д.

Выражение «ингибирующие рост и/или пролиферацию», *например*, раковых клеток включает *inter alia* индукцию клеточного апоптоза или других механизмов уничтожения клеток, снижение инвазивности клеток, остановку клеток в точке в клеточном цикле и т.п.

Термин «иммуноконъюгат» относится к антителу, присоединенному к одному или нескольким эффекторам, или к множеству антител, присоединенных к одному или нескольким эффекторам. Термин «иммуноконъюгат» включает эффекторы, химически конъюгированные с антителами, а также антитела, экспрессирующиеся в виде белка слияния, при этом антитело (или его часть) присоединено напрямую или посредством линкера к пептидному эффектору или эффектору, содержащему пептид.

Краткое описание чертежей

На фигуре 1A показан каркасный участок VH и CDR-области для YS5 (SEQ ID NO:1), YS5F (SEQ ID NO:2), YS5vID (SEQ ID NO:3), SB1HGNY (SEQ ID NO:4), YS12 (SEQ ID NO:5), 3G7RY (aka 3G8) (SEQ ID NO:6), YS6 (SEQ ID NO:7), YS1 (SEQ ID NO:8), YS3 (SEQ ID NO:9), YS4 (SEQ ID NO:10), YS8 (SEQ ID NO:11), YS7 (SEQ ID NO:12), YS9 (SEQ ID NO:13), YS10 (SEQ ID NO:14), YS11 (SEQ ID NO:15), 3G7HY (SEQ ID NO:16), 3G7NY (SEQ ID NO:17), 3G7 (SEQ ID NO:18), SB2 (SEQ ID NO:19), 2C8 (SEQ ID NO:20) и UA8kappa (SEQ ID NO:21). На фигуре 1B показан каркасный участок VL и CDR-области для YS5 (SEQ ID NO:22), YS5F (SEQ ID NO:23), YS5vID (SEQ ID NO:24), SB1HGNY (SEQ ID NO:25), YS12 (SEQ ID NO:26), 3G7RY (aka 3G8) (SEQ ID NO:27), YS6 (SEQ ID NO:28), YS1 (SEQ ID NO:29), YS3 (SEQ ID NO:30), YS4 (SEQ ID NO:31), YS8 (SEQ ID NO:32), YS7 (SEQ ID NO:33), YS9 (SEQ ID NO:34), YS10 (SEQ ID NO:35), YS11 (SEQ ID NO:36), 3G7HY (SEQ ID NO:37), 3G7NY (SEQ ID NO:38), 3G7 (SEQ ID NO:39), SB2 (SEQ ID NO:40), 2C8 (SEQ ID NO:41) и UA8kappa (SEQ ID NO:42).

Фигура 2. Измерение K_D YS5 IgG1 на клетках Du-145. Антитело YS5 инкубировали с клетками Du-145 при 4°C в течение ночи и связывание анализировали с помощью FACS. Среднее значение интенсивности флуоресценции (MFI) получали путем аппроксимации кривой с использованием программы Prism (GraphPad) с получением предполагаемого значения K_D , равного 2,19 +/- 0,73 нМ.

Фигура 3. Измерение K_D YS12 IgG1 на клетках Du-145. Антитело YS12 инкубировали с клетками Du-145 при 4°C в течение ночи и связывание анализировали с помощью FACS. Значения MFI получали путем аппроксимации кривой с использованием программы Prism (GraphPad) с получением предполагаемого значения K_D , равного 0,043 +/- 0,019 нМ.

Фигура 4 Анти-CD46 антитела согласно изобретению связываются с CD46 человека и макак-крабоедов. Анализ FACS выполняли на клетках CHO, трансфицированных CD46 человека (левая панель) и макак-крабоедов (правая панель). Показан результат для YS5, но все антитела согласно изобретению связываются с CD46 как человека, так и макак-крабоедов. Ctr IgG: несвязывающийся IgG1 человека. Ctr: CHO, окрашенные только вторичными антителами.

Фигура 5. Измерение K_D YS5 на клетках CHO, трансфицированных CD46 человека. Антитело YS5 инкубировали с клетками CHO-huCD46 при 4°C в течение ночи и связывание анализировали с помощью FACS. Значения MFI получали путем аппроксимации кривой с использованием программы Prism (GraphPad) с получением предполагаемого значения K_D , равного 0,867 +/- 0,299 нМ.

Фигура 6. Измерение K_D YS5 на клетках CHO, трансфицированных CD46 макак-крабоедов. Антитело YS5 инкубировали с клетками CHO-cynoCD46 при 4°C в течение ночи и связывание анализировали с помощью FACS. Значения MFI получали путем аппроксимации кривой с использованием программы Prism (GraphPad) с получением предполагаемого значения K_D , равного 1,952 +/- 0,508 нМ.

Фигура 7. Картирование эпитопов с помощью конкурентного анализа. Анализ связывания с помощью FACS на клетках Du145 с UA20Fc или без UA20Fc в качестве конкурента. Присутствие или отсутствие UA20Fc служит в качестве контроля полной конкуренции. Антитела YS5, YS12 и 3G8 (*то есть* 3G7, также известное как 3G8) показали отличающуюся от антитела SB1HGNY картину конкуренции, определяя, таким образом, две группы с неперекрывающимися эпитопами.

Фигура 8. Конкуренция с белком Н вируса кори штамма Эдмонстона. Связывание антитела с клетками Du-145 в присутствии или отсутствии избыточного количества рекомбинантного слитого белка Н-Fc измеряли с помощью FACS. Сравнение белка Н-Fc против белка Н-Fc выполняли в качестве положительного контроля (общая конкуренция), относительно которого нормализовали значения MFI для получения нормализованного индекса конкуренции. Связывание не с CD46, связывание антитела с клетками Du-145 использовали в качестве негативного контроля (отсутствие конкуренции).

Фигура 9. Интернализация путем макропиноцитоза. YS5 IgG1 инкубировали с клеточной линией Du-145 метастатического кастрационно-резистентного рака предстательной железы, а также индикатором макропиноцитоза ND70-TRITC (Life Technologies) в течение 4 ч и 24 ч, соответственно. Колокализацию анализировали с помощью флуоресцентной конфокальной микроскопии на микроскопе Olympus.

Фигура 10. Иммуногистохимическое исследование анти-CD46 антител на одобренной FDA стандартной панели замороженных тканей для оценки терапевтических антител. Выделение цветом обозначает уровни положительного окрашивания, при этом плацентарные трофобласты имеют наиболее сильное окрашивание. Сигналы в не выделенных цветом участках являются либо слабыми, либо недетектируемыми.

Фигура 11. Анализ HPLC конъюгатов лекарственного средства с анти-CD46 антителом. YS5 IgG1 конъюгировали с монометилауристатином (MMAF) посредством линкера mc-vc-pab и анализировали с помощью HIC. Числа выше пиков указывают на число молекул лекарственного средства. В среднем, примерно три молекулы лекарственного средства было конъюгировано с молекулой IgG.

Фигура 12. Кривая уничтожения (раковых клеток) для клеточных линий рака предстательной железы LNCaP-C4-2b.

Фигура 13. Кривая уничтожения (раковых клеток) с использованием анти-CD46 ADC (YS5) на клеточной линии Du-145 метастатического кастрационно-резистентного рака предстательной железы.

Фигура 14. Уничтожение опухоли *in vivo* с помощью анти-CD46 (YS5) ADC с использованием моделей подкожных ксенотрансплантатов рака предстательной железы. Клетки LNCaP-C4-2B подкожно имплантировали мышам SCID. Инъекции начинали на день-12 в дозе 5 мг/кг ADC и выполняли четыре инъекции (каждые 4-5 дней). Мышей в группе анти-CD46 ADC наблюдали в течение длительного периода после лечения. N=6.

Фигура 15. CD46 высоко экспрессируется на клеточной линии множественной миеломы RPMI8226. Анти-CD46 антитело связывается с клетками рака предстательной железы (LNCaP) и клетками множественной миеломы, тогда как анти-PSMA антитело J591 связывается только с клетками рака предстательной железы.

Фигура 16. Анти-CD46 ADC (YS5) уничтожает клетки RPMI8226 *in vitro*. Ctr ADC: несвязывающийся IgG1 человека, конъюгированный с MMAF.

Фигура 17. Активность *in vivo* анти-CD46 (YS5) ADC. Клетки RPMI8226-Luc внутривенно (*i.v.*) инъектировали мышам NSG для создания ксенотрансплантата диссеминированной опухоли. CD46-MMAF: YS5 ADC; IgG-MMAF: контроль ADC.

Всего 4 инъекции выполняли каждые 4 дня. Лечение начинали на день 10. Лечение трех мышей в группе, получавшей бортезомиб, не продолжалось до дня 31.

Фигура 18. Анализ Каплана-Мейера данных о выживаемости мышей, несущих ксенотрансплантат RPMI8226 после лечения YS5 ADC.

Фигура 19. Кривая уничтожения (раковых клеток) с помощью анти-CD46 (YS5) ADC на клеточной линии колоректального рака HT29.

Фигура 20. Анти-CD46 ADC (YS5) на ксенотрансплантате MM1S.

Фигура 21. Анализ Каплана-Мейера мышей, несущих ксенотрансплантаты ортометастатической MM1.S после лечения ADC. 100% мышей, подвергнутых лечению 4 мг/кг анти-CD46 ADC, выжили до конца эксперимента (день-212). Инъекции начинали на день-10 после имплантации. Анти-CD46 инъекции в виде однократной дозы 4 мг/кг или 4 раза при двух уровнях доз (0,8 мг/кг и 4 мг/кг). Контрольное ADC (Ctrl ADC) инъекции в дозе 4 мг/кг.

Фигура 22. Кривая уничтожения (раковых клеток) с помощью анти-CD46 (YS12) ADC на клеточной линии колоректального рака HT29.

Фигура 23. Кривая уничтожения (раковых клеток) с помощью анти-CD46 (SB1HGNY) ADC на клеточной линии колоректального рака HT29.

Фигуре 24. Кривая уничтожения (раковых клеток) с помощью анти-CD46 YS5 ADC на клеточной линии рака поджелудочной железы MiaCaPa2.

Фигура 25. Кривая уничтожения (раковых клеток) с помощью анти-CD46 YS5 ADC на клеточной линии мезотелиомы M28.

Фигура 26. Кривая уничтожения (раковых клеток) с помощью анти-CD46 YS5 ADC на клеточной линии рака яичника OVCAR3.

Фигура 27. Анти-CD46 ADC не обладает эффектом на клетки BPH-1. Клетки BPH-1 экспрессируют очень низкие уровни CD46 и не подвергаются воздействию YS5 ADC.

Фигура 28. Влияние анти-CD46 (YS5) ADC на клетки HS27. Клетки Hs27 засевали при плотности 3000 клеток на лунку.

Фигура 29. Анти-CD46 ADC (YS5) показали незначительную токсичность на нормальных CD3+ Т-клетках. 10000 CD3+ Т-клеток засевали в 96-луночные планшеты и инкубировали с различными концентрациями YS5 ADC при 37°C в течение 96 ч. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью набора ССК-8 (Cell Counting Kit-8) (Dojindo).

Фигура 30. Анти-CD46 ADC не обладает эффектом на нормальные PBMC, обедненные по CD14. 10000 клеток засевали в 96-луночные планшеты и инкубировали с

различными концентрациями ADC при 37°C в течение 98 ч. Жизнеспособность клеток определяли с помощью набора ССК8.

Фигура 31. Оценка токсичности анти-CD46 ADC у трансгенных мышей, экспрессирующих человеческий CD46. После внутривенной (i.v.) инъекции 6 мг/кг анти-CD46 и контрольных ADC мышей наблюдали в течение 14 дней, умерщвляли и основные органы извлекали для гистологических исследований.

На фигуре 32 показано, что CD46 ADC является эффективным в модели ксенотрансплантата рака предстательной железы в бедренные кости. Клеточную линию метастатического кастрационно-резистентного рака предстательной железы (mCRPC) LnCaP-C4-2B, которая несет репортер люциферазу светлячка, инъецировали в бедро мышей. Инъецирование CD46 ADC (YS5-mcvsrab-MMAF) начинали на день 7, проводили каждые 4 дня в общем количестве 4 инъекции. Мышей наблюдали после лечения до дня 65. Ctr ADC: несвязывающийся IgG1 конъюгированный с MMAF (ctr IgG-mcvsrab-MMAF).

На фигуре 33 показана экспрессия CD46 в кастрационно-резистентном раке предстательной железы (CRPC). Образцы ткани предстательной железы брали у пациентов, которые стали резистентными к гормональной блокаде. Стрелки указывают на опухолевые клетки (указаны только выборочные участки опухоли). Кроличье антитело H-294 против человеческого CD46 (Santa Cruz Biotechnology) использовали для окрашивания и последующей детекции с помощью системы Envision+ (Dako North America).

На фигуре 34 показаны метастазы в кости mCRPC. Стрелки указывают на опухолевые клетки (указаны только выборочные участки опухоли). Кроличье антитело H-294 против человеческого CD46 (Santa Cruz Biotechnology) использовали для окрашивания и последующей детекции с помощью системы Envision+ (Dako North America).

На фигуре 35 показаны метастазы в лимфоузлы mCRPC. Стрелки указывают на опухолевые клетки (указаны только выборочные участки опухоли). Кроличье антитело H-294 против человеческого CD46 (Santa Cruz Biotechnology) использовали для окрашивания и последующей детекции с помощью системы Envision+ (Dako North America).

На фигуре 36 показаны метастазы в мочевой пузырь mCRPC. Стрелки указывают на опухолевые клетки (указаны только выборочные участки опухоли). Кроличье антитело H-294 против человеческого CD46 (Santa Cruz Biotechnology) использовали для окрашивания и последующей детекции с помощью системы Envision+ (Dako North America).

На фигуре 37 показано, что CD46 высоко экспрессируется клеточной линией H660 нейроэндокринного рака предстательной железы. Левая панель: анализ FACS. Ctr: несвязывающееся моноклональное антитело mAb. Правая панель: Анализ методом Вестерн-блоттинга подтверждает экспрессию CD46 и экспрессию маркера нейроэндокринных опухолей NSE (нейронспецифическая енолаза) клетками H660.

На фигуре 38 показана интернализация анти-CD46 антитела клеточной линией H660 нейроэндокринного рака предстательной железы. Антитело YS5 IgG1 инкубировали с клетками H660 в течение ночи. Клетки фиксировали, пропитывали, окрашивали и визуализировали с помощью конфокальной микроскопии. Показан единичный конфокальный срез. Анти-CD46 антитело интернализировано и колокализовано с лизосомным маркером LAMP1.

На фигуре 39 показано, что CD46 ADC уничтожает клетки H660. Различные концентрации CD46 ADC (YS5-mcvsrab-MMAF) инкубировали с нейроэндокринной клеточной линией H660 при 37°C в течение 7 дней. Для оценки жизнеспособности использовали анализ с кальцеином-AM. Ctr ADC: несвязывающийся IgG1-mcvsrab-MMAF.

На фигуре 40 показано, что лечение клеточной линии метастатического кастрационно-резистентного рака предстательной железы LNCaP-C4-2B с помощью 10 мкМ абиратерона (abi) в течение 7 вызывает повышение экспрессии CD46 на клеточной поверхности по данным измерений с помощью FACS. MFI: средняя интенсивность флуоресценции.

На фигуре 41 показано, что подвергнутые лечению абиратероном (Abi) клетки LNCaP C4-2B являются более восприимчивыми к CD46 ADC. Клетки LNCaP-C4-2B инкубировали с абиратероном в течение 7 дней, промывали и продолжали инкубацию с CD46 ADC в среде, не содержащей абиратерон, дополнительно в течение 96 часов. C4-2B_CD46 ADC: клетки LNCaP C4-2B, инкубированные с CD46 ADC (YS5-mcvsrab-MMAF) без предварительного подвергания воздействию абиратерона (EC50 = 169 пМ). C4-2B ABI_CD46 ADC: клетки LNCaP C4-2B с предварительным подверганием воздействию абиратерона, инкубированные с CD46 ADC (EC50 = 21 пМ). Ctr ADC: несвязывающийся IgG1, конъюгированный с MMAF.

На фигуре 42 показана повышенная экспрессия белка клеточной поверхности CD46 на нейроэндокринной клеточной линии H660 после лечения энзалутамидом (ENZ). Клетки H660 обрабатывали 10 мкМ энзалутамида в течение 7 дней и анализировали с помощью FACS на экспрессию поверхностного антигена. Белок CD46 высоко экспрессируется H660, тогда как простатспецифический мембранный антиген (PSMA)

едва детектируется. Кроме того, подвержение воздействию энзалитамида вызвало повышенную экспрессию CD46 на поверхности опухолевых клеток. MFI: средняя интенсивность флуоресценции.

На фигуре 43 показано, что CD46 высоко экспрессируется в первичном колоректальном раке. Стрелки указывают на опухолевые клетки (указаны только выборочные участки опухоли). Кроличье антитело H-294 против человеческого CD46 (Santa Cruz Biotechnology) использовали для окрашивания и последующей детекции с помощью системы Envision+ (Dako North America). Изображения получены с использованием цифрового микроскопа при двух уровнях увеличения (4x и 20x).

На фигуре 44 показано, что CD46 высоко экспрессируется в колоректальном раке с метастазами в печень. Стрелки указывают на опухолевые клетки (указаны только выборочные участки опухоли). Кроличье античеловеческое антитело H-294 против человеческого CD46 (Santa Cruz Biotechnology) использовали для окрашивания и последующей детекции с помощью системы Envision+ (Dako North America). Изображения получены с использованием цифрового микроскопа при двух уровнях увеличения (4x и 20x).

На фигуре 45 показано, что CD46 высоко экспрессируется в колоректальном раке с метастазами в лимфатические узлы. Стрелки указывают на опухолевые клетки (указаны только выборочные участки опухоли). Кроличье антитело H-294 против человеческого CD46 (Santa Cruz Biotechnology) использовали для окрашивания и последующей детекции с помощью системы Envision+ (Dako North America). Изображения получены с использованием цифрового микроскопа при двух уровнях увеличения (4x и 20x).

На фигуре 46 показано, что CD46 высоко экспрессируется в колоректальном раке с метастазами в мочевой пузырь. Стрелки указывают на опухолевые клетки (указаны только выборочные участки опухоли). Кроличье антитело H-294 против человеческого CD46 (Santa Cruz Biotechnology) использовали для окрашивания и последующей детекции с помощью системы Envision+ (Dako North America). Изображения получены с использованием цифрового микроскопа при двух уровнях увеличения (4x и 20x).

На фигуре 47 показано, что CD46 высоко экспрессируется в мезотелиоме, как продемонстрировано с помощью иммуногистохимического анализа окрашивания CD46 в мезотелиоме. Стрелки указывают на опухолевые клетки (указаны только выборочные участки опухоли). Кроличье антитело H-294 против человеческого CD46 (Santa Cruz Biotechnology) использовали для окрашивания и последующей детекции с помощью системы Envision+ (Dako North America).

На фигуре 48 показано, что CD46 высоко экспрессируется в раке поджелудочной железы. Стрелки указывают на опухолевые клетки (указаны только выборочные участки опухоли). Кроличье антитело H-294 против человеческого CD46 (Santa Cruz Biotechnology) использовали для окрашивания и последующей детекции с помощью системы Envision+ (Dako North America).

На фигуре 49 показано, что CD46 сверхэкспрессируется мультиформной глиобластомой (GBM), как продемонстрировано с помощью иммуногистохимического анализа окрашивания CD46 в GBM и нормальном головном мозге. В нормальном человеческом головном мозге не наблюдалось окрашивания CD46, тогда как сильное окрашивание присутствовало в образцах GBM. Кроличье антитело H-294 против человеческого CD46 (Santa Cruz Biotechnology) использовали для окрашивания и последующей детекции с помощью системы Envision+ (Dako North America).

На фигуре 50 показано *in vivo* ингибирование роста ксенотрансплантата мезотелиомы (M28) с помощью CD46 ADC. YS5-mcvcrab-MMAF инъецировали каждые 3-4 дня в дозе 5 мг/кг в общем количестве 5 раз (указано стрелками). Объемы опухолей измеряли с помощью калипера. YSC10 представляет собой контрольный несвязывающийся IgG1 человека.

Подробное описание

В различных вариантах осуществления предлагается ряд новых анти-CD46 антител. Прототипические антитела, описанные здесь, были идентифицированы с помощью комбинации селекций на клеточной поверхности и рекомбинантного CD46 с использованием технологий фагового и дрожжевого дисплея. Эти антитела интернализуются путем опухоль-селективного макропиноцитоза без необходимости сшивания и локализации в лизосомы, что делает их подходящими для разработки конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC) и других таргетных терапевтических средств, которые используют внутриклеточное высвобождение нагрузки.

Антитела, описанные здесь, связываются с доменом 1 и 2 молекулы CD46, а не с главными доменами 3 и 4 связывания комплемента, и, таким образом, не блокируют нормальный каскад комплемента.

Точное картирование эпитопов также показало различия в участках контакта с антигеном между анти-CD46 антителами, описанными здесь, и антителами UA20 и 2B10, описанными в РСТ заявке РСТ/US2008/076704 и находящейся на одновременном рассмотрении заявке на патент США 14/205101, соответственно. При тестировании на клетках CHO (линия клеток яичника китайского хомячка), трансфицированных кДНК

белка CD46 макак-крабоедов, было обнаружено, что анти-CD46 антитела согласно изобретению связываются с эпитопом, который является эволюционно стабильным между человеком и макаками-крабоедами, идентифицируя тем самым подходящие виды для нормативного токсикологического исследования.

С использованием одобренной FDA панели замороженных тканей человека для оценки терапевтических антител было обнаружено, что эпитопы CD46, связанные описанными здесь антителами, не экспрессируются на низких уровнях практически ни на одной ткани, за исключением плацентарных трофобластов и, в меньшей степени, эпителия предстательной железы. Напротив, было установлено, что белок CD46 сверхэкспрессируется в разнообразных опухолях, включая, но без ограничения, рак предстательной железы, множественную миелому, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, мезотелиому, рак легких, рак молочной железы, рак яичника, рак печени, глиому, нейробластому и *т.п.*

Учитывая, что CD46 локализован на хромосоме 1q32.2 и приобретение 1q наблюдается в широком спектре типов рака у человека, по всей вероятности он будет являться отличной мишенью для разработки терапии антителами для различных злокачественных новообразований. Конструировали конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) с использованием описанных здесь анти-CD46 антител, и было обнаружено, что они уничтожают сверхэкспрессирующие CD46 раковые клеточные линии *in vitro*, включая, но без ограничения, метастатический кастрационно-резистентный рак предстательной железы, множественную миелому, колоректальный рак, мезотелиому, рак яичника и *т.д.* Самое главное, описанные здесь анти-CD46 ADC показали высокую противоопухолевую активность *in vivo*, значительно снижая массу опухолей в моделях ксенотрансплантатов кастрационно-резистентного рака предстательной железы и множественной миеломы. Полагают, что эта высокая противоопухолевая активность может также распространяться на другие сверхэкспрессирующие CD46 модели опухолей. Таким образом, описанные здесь исследования подтверждают, что CD46 является полезным поверхностным антигеном опухолевой клетки для разработки таргетной терапии. Кроме того, описанные здесь анти-CD46 антитела могут быть использованы в сопутствующей диагностике для стратификации пациентов и мониторинга результатов лечения.

В свете этих открытий полагают, что анти-CD46 антитела, описанные здесь, специфически связываются и интернализуются клетками, которые экспрессируют или сверхэкспрессируют CD46. Поскольку CD46 экспрессируется/сверхэкспрессируется клетками многих типов рака, включая, но без ограничения, рак яичника, рак молочной

железы, рак легких, рак предстательной железы, рак толстой кишки, рак почек, рак поджелудочной железы, мезотелиому, лимфому, рак печени, рак уротелия, рак желудка и рак шейки матки, эти антитела можно применять для специфического нацеливания и интернализации в эти и другие CD46-положительные раковые клетки.

В некоторых вариантах осуществления эти антитела могут быть использованы без присоединенных эффекторов благодаря их собственной цитотоксической и/или цитостатической, и/или антипролиферативной активности на поверхности клеток (особенно раковых клеток). В некоторых вариантах осуществления эти антитела могут быть присоединены к одному или нескольким эффекторам (*например*, вторичному антителу, детектируемой метке, цитотоксину, липосоме, содержащей лекарственное средство, радионуклиду, лекарственному средству, пролекарству, вирусной частице, цитокину, хелату и т.д.) с образованием иммуноконъюгата, который будет специфически связываться и интернализироваться раковыми клетками, экспрессирующими или сверхэкспрессирующими CD46. В некоторых вариантах осуществления множество эффекторов будет присоединено к единичному антителу, или в некоторых вариантах осуществления множество антител будет присоединено к единичному эффектору, или в некоторых вариантах осуществления единичное антитело будет присоединено к единичному антителу.

В различных вариантах осуществления предлагаются способы применения этих антител и/или иммуноконъюгатов. В некоторых вариантах осуществления способы включают приведение в контакт клетки, которая экспрессирует или сверхэкспрессирует CD46 (*например*, раковой клетки, такой как клетка рака яичника, клетка рака молочной железы, клетка рака легких, клетка рака предстательной железы, клетка рака толстой кишки, клетка рака почек, клетка рака поджелудочной железы и т.д.), с конструкцией, вызывая интернализацию конструкции (или ее части) клеткой и обеспечивая, таким образом, доставку эффектора в клетку-мишень. В некоторых вариантах осуществления «приведение в контакт» представляет собой введение антитела или конструкции субъекту (*например*, человеку или млекопитающему, не относящемуся к человеку), нуждающемуся в этом.

Антитела, которые связываются с CD46

Были обнаружены антитела, которые специфически связываются с CD46, в частности, доменами 1 и/или 2, и которые интернализуются клетками предстательной железы (и другими CD46-положительными раковыми клетками) *in situ*, *например*, когда раковая клетка находится в тканевом микроокружении. Как указано выше, такие антитела

являются полезными для нацеливания на рак, когда они применяются отдельно или когда присоединены к эффектору с образованием «нацеленного эффектора».

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предлагается выделенное антитело, которое специфически связывается с CD46 и интернализуется клеткой, которая экспрессирует или сверхэкспрессирует CD46 (*например*, клеткой рака предстательной железы) путем макропиноцитоза. В различных вариантах осуществления антитело связывается с доменом 1 и/или доменом 2 CD46. В различных вариантах осуществления антитело не связывается с доменом 3 и/или доменом 4 CD46.

Антитела, обозначенные в настоящем документе как YS5, YS5F, YS5v1D, SB1HGNY, YS12, 3G7RY (aka 3G8), YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и UA8каппа (*смотри, например*, таблицу 1), представляют собой иллюстративные прототипические антитела. В некоторых вариантах осуществления рассматриваются антитела, которые содержат VL CDR1 и/или VL CDR2, и/или VL CDR3, и/или VH CDR1, и/или VH CDR2, и/или VH CDR3 одного или нескольких из этих антител. В некоторых вариантах осуществления рассматриваются антитела, которые содержат VH-домен и/или VL-домен одного или нескольких из этих антител. Также, рассматриваются антитела, которые конкурируют за связывание с CD46 с одним или несколькими из YS5, YS5F, YS5v1D, SB1HGNY, YS12, 3G7RY (aka 3G8), YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и/или UA8каппа.

Аминокислотные последовательности VH- и VL-доменов антител YS5, YS5F, YS5v1D, SB1HGNY, YS12, 3G7RY (aka 3G8), YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и/или UA8каппа показаны в таблице 1 (*смотри пример 1*).

Таблица 1. Последовательности новых человеческих анти-CD46 антител. YS5 и YS5F отличаются по одной аминокислоте в VH CDR1 (L против F). YS5 и YS5v1D имеют идентичные VH, но одно различие по аминокислоте в VL CDR2 (N против D). 3G7HY, 3G7NY, 3G7RY (aka 3G8) и 3G7 имеют различие по одному остатку в VH CDR3, но полностью различные VL. YS6 и 3G7 имеют идентичные VH, но различные VL.

	VH	VL
YS5	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLACAASGLTV NNYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGNK YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKGGGYFDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:1)	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGA GYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNNRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCSSY TSGTWLFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:22)
YS5F	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLACAASGFTV NNYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGNK YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKGGGYFDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:2)	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGA GYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNNRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCSSY TSGTWLFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:23)

YS5vID	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLACAASGFTV NNYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGNK YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSR AEDTAVYYCAKGGGYFDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO:3)	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGA GYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGDNRRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCSSY TSGTWLFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:24)
SB1HG NY	QVQLQOQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTF SSYAMHWVRQAPGKGLEWVAFIRSDGSKK YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSR AEDTAVYYCARHGNYFDSWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:4)	DIQMTQSPSFLSASVGDRTITCRASQGISS YLAWYQOKPGKAPKLLIYAASLQSGVPSFF SGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQLAS YPLTFGGGTKVDIK (SEQ ID NO:25)
YS12	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTF STYGMHWVRQAPGKGLEWLSFISYDGEK YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSR AEDTAVYWCASGYGMGILDYWGQGTTLV TVSS (SEQ ID NO:5)	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYY VSWFQOKPGQAPVFMVYQONNRPSGISERFS GSSSGNTASLIITGAQAEDEADYYCHSRDSS GTHLRVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:26)
3G7RY aka 3G8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SDYYMSWIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTI YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSR AEDTAVYYCARDYGRIAAAGRHYWGQGT LTVTVSS (SEQ ID NO:6)	QSALTQPPSASATPGQRVTISCSGRTSNIGS NHVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDR FSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWD DSLSEVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:27)
YS6	QVQLQESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTF SDYYMSWIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTI YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSR AEDTAVYYCARDYGRIAAAGRHYWGQGT LTVTVSS (SEQ ID NO:7)	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYY ASWYQOKPGQAPVLVIYGNRRPSGIPDRFS GSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSS GTHLEVFSGGGTKVTVL (SEQ ID NO:28)
YS1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SDYYMSWIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTI YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSR AEDTAVYYCARDYGRIAAAGRHYWGQGT LTVTVSS (SEQ ID NO:8)	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDTLSTYY ANWYQOKPGQAPVLVIYGNRRPSGIPDRFS GSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCHSRDIS GNLFFASGTKLTVL (SEQ ID NO:29)
YS3	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SSYWMSWVRQAPGKGLEWVADIKQDSEK YYVDSVKGRFTISGDNAKNSLYLQMNLSR AEDTAVYYCAKDVGSTAINYVRAYTWFD PWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:9)	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGS NTVNWSRQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDR FSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWD DSLNVYVFGTGTKVTVL (SEQ ID NO:30)
YS4	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SNYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISGSGSST FYVDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSR AEDTAVYYCAQGLYSSGWANWFDPRGQGT LTVTVSS (SEQ ID NO:10)	KIVLTQSPSSLSASVGDVTVTIACRASRDIRN DLAWYQOKPGKAPKLLIYGASSLQSGVPSRF SGSGSGTEFILTISLQPEDFATYYCHRLNS YPLTFGGGTKVDIK (SEQ ID NO:31)
YS8	QVQLQESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTF SSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNK YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSR AEDTAVYYCAKVMGLAAAGLDAFDIWGQ GTTVTVSS (SEQ ID NO:11)	NFMLTQPASLSGSPGQSITISCTGTSSDVGG YNYVSWYQHPGYAPKLMYDVSNRPSGVS RFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSY TSSSTPWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:32)
YS7	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTF SSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNK YYADSVKGRFTISRDTSTNTLYLQMNLSR ADDTAVYYCGRESSGSPGVWGQGTTLVTV SS (SEQ ID NO:12)	SYVLTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYY ASWYQOKPGQAPVLVIYGNRRPSGIPDRFS GSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSS GNQFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:33)
YS9	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTV SSNYMSWVRQAPGKGLEWVSVIYTDGSTY	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRTYY ASWYQQRPGQAPILVLYGNRRPSGIPDRFS

	YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRA EDTAIYYCARDRGTSYDWAFFDLWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO:13)	GSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSS GNHVVFVGGGKLTVL (SEQ ID NO:34)
YS10	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTF SSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGST YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSR AEDTAVYYCAKDRYYYGSGKDAFDIWGRG TMVTVSS (SEQ ID NO:14)	QSVLTQPASVSGSPGQSITISCTGTGSDVGS YNYVSWYQQNPGKAPKLMIEVSNRPSGVS RFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSY TTSSTLVFVGGGKTVTL (SEQ ID NO:35)
YS11	QVQLVESGGGLVQPGGSLGLS CAASGFTF SNYWMSWVRQAPGKGLEWVANVRQDGGQK YYVDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSR TEDTAVYFCVSRNSGEHDYWGQGTLVTV SS (SEQ ID NO:15)	SELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYA SWYQQKPGQAPVLIYGENSRPSGIPDRFSG SSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSWDSSG NHVVFVGGGKLTVL (SEQ ID NO:36)
3G7HY	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTF SDYYMSWIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTI YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSR AEDTAVYYCARDYGRIAAAGRHYWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO:16)	AIRMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISS YLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQOQSYS TPRTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:37)
3G7NY	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTF SDYYMSWIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTI YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSR AEDTAVYYCARDYGRIAAAGRNYWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO:17)	DIVMTQSPSLPVTTPGEPASISCRSSQSLH SNGYDYLWYLDWYLDKPGQSPQLLIYLG SNRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTKISR VETEDVGIYYCMTQSPSLPVTTPGEPASIS CRSSQSLH (SEQ ID NO:38)
3G7	QVQLQESGGGVVVRPGGSLRLS CAASGFTF SDYYMSWIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTI YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSR AEDTAVYYCARDYGRIAAAGRHYWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO:18)	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYY ASWYQQKPGQAPVPIYKNNRPSGIPDRFS GSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSS STHRGVFVGGGKLTVL (SEQ ID NO:39)
SB2	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASGFTF SDYYMSWIRQAPGKGLEWVSYISSGSSI YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSK AEDTAVYYCARDITDVGVSFDYWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO:19)	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASRSIST YLSWYQQKPGKAPKLLIYDASRLQNGVPSRF SGSGSDTDFTLTISLQPEDFATYFCQOQSYN PPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:40)
2C8	EVQLVESGGGVVQPGRSRLS CAASGFTF SSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNK YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSR AEDTAEYYCAKVMGLAAAGLDAFDIWGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO:20)	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGG YNYVSWYQQHPGKAPKLMIDVSNRPSGVS NRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEAYYYCSSY TSSSDPWVFGGGTQLTVL (SEQ ID NO:41)
UA8kap pa	EVQLVESGGGVVQPGRSRLS CAASGFTF SSFGMHWVRRAPGKGLEWVAVISYDGSNQ YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSR AEDTAVYYCGSRPGGGYASGSTVAYWGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO:21)	NIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRAGQPIST YVNWYQHKPGKAPKLLIYGASNLQSGVPSRF SGGGSATDFTLTISLQPEDFATYYCQOQSYS SLLTFGDGKVEIK (SEQ ID NO:42)

В различных вариантах осуществления антитела, рассматриваемые здесь, явным образом включают антитела, содержащие три CDR VH и/или три CDR VL антител 3051.1, G12FC3, M6c42b, 4F3YW, M40pr146, UA20, UA8, 585II41, 585II41.1, 585II56, 3076, 3051, M49R, RCI-14, П79_4, П79_3, T5II-4B.1, T5II-4B.2, RCI-11, RCI-20, CI-11A, CI-14A, S95-2, которые описаны в PCT/US2008/076704 (WO 2009/039192), и/или антитела mPA7.

Аминокислотные последовательности VH- и VL-цепей этих антител и CDR, содержащие эти домены, показаны в PCT/US2008/076704, и аминокислотные последовательности этих доменов представлены ниже в таблице 2.

Таблица 2. Исключенные антитела. Последовательности, показанные ниже, представляют собой scFv-антитела (VL- и VH-области соединены с помощью линкера (Gly₄Ser)₃ (SEQ ID NO:43), однако следует учесть, что другие формы антител, содержащие CDR (или VH- и/или VL-домены), также являются исключенными.

Клон	Аминокислотная последовательность	SEQ ID No
3051.1	QVQLQESGGGLVKPGGPLRLSCAASGFTFSSYGMVWRQAPGKGLEWV STLSRSGSGTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ASIAVAGNYFDYWGQGT LVTVSS <u>GGGSGGGSGGGGS</u> SYVLTQDPAV SVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQERPGQAPLLVIYGNRRPSGIP DRFSGSNSGSTATLTISRVEAGDEGDYQCQVWDSINEQVVFVGGGKVT VL	4
G12FC3	QVQLVQS GGGVVPGRSLRLSCAATGIPFSGSGMHWVRQAPGKGLEWV TMIWYDGSNKFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMDSLRAEDTAVYFC ARDKGVRSMDVWGLGTTVTVSS <u>GGGSGGGSGGGGS</u> NFMLTQPPSVS VAPGQTAKITCDGYSIRTKSVHWYQQKPGQAPV VVHDDSDRPSGIP E RFSGSNSGTTATLTISRVEAGDEADYQCQAWDSISEEVVFGGGTKLTV L	5
M6c42b	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFTFGTYAMRWVRQTS GKGLEWV SGIGVSGDAYTDSVRGRFTISRDN SKNTLYLQMNTLRAEDTATYYCT RKSSTTSNDYWGRGTLVTVSS <u>GGGSGGGSGGGGS</u> SYVLTQDPAVSV ALGQTVRITCQGDNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVYDDSDRPSGIP E FSGNSGTTATLTISSEAGDEADYQCQAWDSISEHVI FGGGKVTVL	6
4F3YW	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWV AVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARFSSGWYFDYWGQGT LVTVSS <u>GGGSGGGSGGGGS</u> DIQMTQSPSF LSASVGDRIITICRASHDISSYFAWYQQKPKAPKPLIYAAS TLQSGV E PSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQLGSYPLTFGGGKLEI K	7
M40pr146	QVQLLQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV SAISGSGGSTYYTDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKSHDYGDYAGFDYWGQGT LVTVSS <u>GGGSGGGSGGGGS</u> HVILTQDP AVSVALGQTVRITCQGDSLKSYASWYQQKPGQAPV LVIYGNRRPSG E IPDRFSGSSSGTTASLTITGAQAEDEADYCHSRDSSGTHLRVFGGGT KLTVL	8
UA20	QVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSNAWMNWRQAPGKGLEWV GRIKSKTDEGTTDYAAPVKGRFISRDDS KNTLYLQMNSLKTEDTGVY YCTATKGLGGSKLGQGT LVTVSS <u>GGGSGGGSGGGGS</u> QSVLTQPPSA SGTPGQRVTISCSGSSNIGNNTVNWSRQLPGTAPKLLIYNDQRPSG E VPDRFSGSKSGTSASLAITGLQPEDEADYCGTWDSLSAYVFGTGK LTVL	9
UA8	QVQLVESGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRRAPGKGLEWV AVISYDGSNQYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC GSRPGGYASGSTVAYWGQGT PVTVSS <u>GGGSGGGSGGGGS</u> SSELTQ DPAVSVVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPLLVIYQNI R SGIPDRFSGSSSGNSASLTITGAQAEDEADYCHSRDSSGKYVFGVGT KVTVL	0
585II41	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMGWVRQAPGKGLEWV SAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKDTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ASRSLLDYWGQGT LVTVSS <u>GGGSGGGSGGGGS</u> NFMLTQDPAVSV VAL GQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPLLVIYGNRRPSGIPDRFS E GSSSGNTASLTITGAQAEDEADYCN SRDSSGNPVFGGGKVTVL	1
585II41.1	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV SAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKDTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ASRSLLDYWGQGT LVTVSS <u>GGGSGGGSGGGGS</u> NFMLTQDPAVSV VAL	

	GQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPLLVIYGKNNRPSGIPDRFS GSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGNPVFGGGTKVTVL	2
585II56	QVQLQESGGGLVQLGSSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV SAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ANSAYTGGWYDYWGHGTLVTVSS <u>GGGSGGGSGGGGS</u> SSELTQDPAV SVALGQTVKITCQGDSLRTYYASWYQQRPGQAPVLLVIYGENSRPSGIP DRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGNHLRVFGGGTKL TVL	3
3076	QVNLRESGGGLVQPGGLRLSCAASGFTFSSYAMSWVHPAPGKGLEWV ANIKQDGESEKFYVDSVKGRFTISRDN AKNSLFLQMNSLRAEDTAVYFC ARGLLSDYWGQGLVLPVSS <u>GGGSGGGSGGGGS</u> NFMLTQPPSVSVAP GKTASLTCGGYNIGTKSVHWYQQKPGQAPVVVHDDSDRPSGIPERFS GSNSGTTATLTIIRVEAGDEADYYCQAWDSISEEVVFGGGTKLTVL	4
3051	QVQLQESGGGLVKPGGPLRLSCAASGFTFSSYGMWVRQAPGKGLEWV STLSRSGSTYYAESVKGRFTISRDN SKNTLYFQMNSLRAEDTAVYYC ASIAVAGNYFEYWGQGLVTVSS <u>GGGSGGGSGGGGS</u> SYVLTQDPAV SVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQERPGQAPLLVIYGKNNRPSGIP DRFSGSNSGSTATLTIIRVEAGDEGDYYCQVWDSINEQVVFGGGTKVT VL	5
M49R	QVQLQESGGGLVKPGESLRLSCAASGFTFSDHYMDWVRQAPGKGLEWV AYIRYDGSTKYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYC ARLIAEAEGWFDPWGQGLVTVSS <u>GGGSGGGSGGGGS</u> NFMLTQPPS VSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVYWYQQKPGQAPVLLVYDSDRPSGI PERFSGSNSGNTATLTIIRVEAGDEADYYCQVWDSISDHVVFGGGTKV TVL	6
RCI-14	QVQLLQSAGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWV SGISGSGGSTNYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYC AKDYGSWYDYWGQGLVTVSS <u>GGGSGGGSGGGGS</u> SSELTQDPAVS VALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQERPGQAPLLVIYGRNERPSGIPD RFSASSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCQVWDSFNEQVVFGGGTKLTV L	7
II79_4	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVHQAPGKGLEWV SAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKTYYGFWSGYYDYLQGLVTVSS <u>GGGSGGGSGGGGS</u> SSELTQDP AVSVGLGQTVTITCQGDSLRSYYANWYQQKPGQAPILVIYGENNRPSG IPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCHSRDSSGTHLRVFGGGT KLTVL	8
II79_3	QVQLLESGGGVVQPGTSLRLSCAASGFTFSSNYAINWVRQAAGKGLEWV SGISGSGVSTSYADSVKGRFTVSRDN SKNTLYLQMNSLRVEDTALYYC AKNGGGPEYLQHWGQGLVTVSS <u>GGGSGGGSGGGGS</u> QSVLTQPPSA SGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNTVNWSRQLPGTAPKLLIYSNDQRPSG VPDRFSGSKSGTSASLAITGLQPEDEADYYCGTWDSSLSAYVFGTGK LTVL	9
T5II-4B.1	QVQLQESGGTLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGRGLEWV STISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKGAYSYSYWGQGLVTVSS <u>GGGSGGGSGGGGS</u> SSELTQDPAVVA LGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPSLVIYGENSRPSGIPDRF SGSSSGNTASLTITGAQAENEADYYCQAWDSSTAVVFGGGTKLTVL	0
T5II-4B.2	QVQLQESGGTLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGRGLEWV STISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKGAYS GSHWGQGLVTVSS <u>GGGSGGGSGGGGS</u> SSELTQDPAVVA LGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPSLVIYGENSRPSGIPDRF SGSSSGNTASLTITGAQAENEADYYCQAWDSSTAVVFGGGTKLTVL	1
RCI-11	QVQLVESGAEVKPKGASVKVSKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWM GWI SAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYC ARPIYDSSGYDAFDIWGQGTMTVTVSS <u>GGGSGGGSGGGGS</u> DIVMTQS PSTLSASIGDRVITICRASEGIYHWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLA SGAPSRFSGSGSDFTLTISSLQPDDFATYYCQYHTISRTFGPGTK VDIK	2
RCI-20	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWV AVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFC VRPSDSGWSFEHWGQGLVLPVSS <u>GGGSGGGSGGGGS</u> QSVLTQPPSA SGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNTVNWSRQLPGTAPKLLIYSNDQRPSG	3

	VPDRFSGSKSGTSASLAITGLQPEDEADYYCGTWDSSLSAYVFGTGK LTVL	
CI-11A	<u>QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV</u> AVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYC <u>VRGDRSYGAEYFQHWGQGLTVTVSS</u> GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS SSELTQDP AVSVASGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPLLVIYGNIRPSG IPDRFSGSTSGNSASLTITGAQAEDADYYCNSRDSSGNRNWVFGGGT KLTVL	4
CI-14A	<u>QVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTSSSYAMHWVRQAPGKGLEIV</u> SAIGNGGTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCA <u>KEGEQWLEYRYYYGMDVWGQGTTVTVTVSS</u> GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS SSELT QDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPSLVIYGENSR PSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAENEADYYCQAWDSSSTAVVFGGG TKLTVL	5
S95-2	<u>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCTASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWV</u> AVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYC ARGGRYSSNWFSSYYYGMDVWGQGTTVTVTVSS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS NF MLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVYWYQQKPGQAPVLVYDD SDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVV FGGGTKVTVL	6

Используя аминокислотные последовательности, представленные для антител YS5, YS5F, YS5vID, SB1HGNY, YS12, 3G7RY (aka 3G8), YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и UA8каппа, можно получить множество форм антител, например таких, которые описаны ниже. Такие формы включают, но без ограничения, по существу интактный (например, полноразмерный) иммуноглобулин (например, IgA, IgE, IgG и т.п.), фрагмент антитела (например, Fv, Fab, (Fab')₂, (Fab')₃, IgGΔCH₂, минитело, и т.п.), одноцепочечное антитело (например, scFv), диатело, унитело, аффитело и т.п.

Следует иметь в виду, что когда антитела представляют собой одноцепочечные антитела, VH- и VL-домены, содержащие такое антитело, могут быть соединены напрямую вместе или с помощью пептидного линкера. Иллюстративные пептидные линкеры включают, но без ограничения, GGGGS GGGGS GGGGS (SEQ ID NO:67), GGGGS GGGGS (SEQ ID NO:68), GGGGS (SEQ ID NO:69), GS GGGGS GGGGS GGS GGGGS (SEQ ID NO:70), SGGGS (SEQ ID NO:71), GGGGS (SEQ ID NO:72), VPGV (SEQ ID NO:73), VPGVG (SEQ ID NO:74), GVPGVG (SEQ ID NO:75), GVG VP GVG (SEQ ID NO:76), VP GVG VP GVG (SEQ ID NO:77), GGSSRSS (SEQ ID NO:78) и GGSSRSSSSGGGSGGGG (SEQ ID NO:79), и т.п.

Как указано выше, в различных вариантах осуществления антитело связывается (например, специфически связывается) с CD46 (например, доменами 1 и/или 2). Типичные антитела, рассматриваемые в настоящем документе, будут специфически связываться с клетками рака предстательной железы, включая, но без ограничения, клеточную линию, выбранную из группы, состоящей из клеток DU145, клеток PC3 и клеток LnCaP. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с клеткой опухоли

предстательной железы с аффинностью больше, чем (K_D меньше чем) около 5 нМ по данным измерений с помощью FACS на живых клетках опухоли предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления аффинность составляет больше, чем (K_D меньше чем) около 1 нМ или около 100 пМ, или около 50 пМ, или около 10 пМ, или около 1 пМ.

Используя информацию о последовательности, представленную в настоящем документе, антитела, содержащие одну или несколько CDR, представляющие собой, например, YS5, YS5F, YS5v1D, SB1HGNY, YS12, 3G7RY (aka 3G8), YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и UA8каппа, или антитела, содержащие VH- и/или VL-домен(ы) этих антител, могут быть легко получены с использованием стандартных способов (*например*, методов химического синтеза и/или рекомбинантных методов экспрессии), хорошо известных специалистам в данной области, например таких, которые описаны ниже.

Кроме того, другие «родственные» антитела, специфические в отношении рака предстательной железы, могут быть идентифицированы путем скрининга на антитела, которые связываются с тем же самым эпитопом (*например*, которые конкурируют с одним или несколькими из антител YS5, YS5F, YS5v1D, SB1HGNY, YS12, 3G7RY (aka 3G8), YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и/или UA8каппа за связывание с CD46 и/или клеткой, экспрессирующей или сверхэкспрессирующей CD46, *например*, клеткой рака предстательной железы), и/или путем модификации антител YS5, YS5F, YS5v1D, SB1HGNY, YS12, 3G7RY (aka 3G8), YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и/или UA8каппа, идентифицированных в настоящем документе, для создания библиотек модифицированных антител, и затем повторного скрининга антител в библиотеке на улучшенное связывание и/или интернализацию клетками, экспрессирующими или сверхэкспрессирующими CD46, *например*, клетками рака предстательной железы.

Идентификация других антител, связывающихся с тем же самым эпитопом(ами) CD46, что и YS5, YS5F, YS5v1D, SB1HGNY, YS12, 3G7RY (aka 3G8), YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и/или UA8каппа

Идентифицировав CD46, особенно домены 1 и/или 2 в качестве полезных мишеней для антител, и антитела YS5, YS5F, YS5v1D, SB1HGNY, YS12, 3G7RY (aka 3G8), YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и UA8каппа в качестве прототипических антител, могут быть легко идентифицированы другие «родственные» антитела, которые связываются с CD46 и предпочтительно интернализуются путем макропиноцитоза, путем скрининга на антитела, которые связываются с доменами 1 и/или 2 CD46, *например*, путем выработки антител (*например*,

моноклональных антител), которые специфически связываются с доменами 1 и/или 2 CD46. Дополнительно или альтернативно могут быть идентифицированы другие антитела, которые связываются с CD46 и интернализуются путем макропиноцитоза, осуществляя скрининг на антитела, которые вступают в перекрестную реакцию с одним или несколькими из антител YS5, YS5F, YS5vID, SB1HGNY, YS12, 3G7RY (aka 3G8), YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и/или UA8kappa, *например*, при эпитопе, связанном YS5, YS5F, YS5vID, SB1HGNY, YS12, 3G7RY (aka 3G8), YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и/или UA8kappa, или на антитела, которые вступают в перекрестную реакцию с одним или несколькими из YS5, YS5F, YS5vID, SB1HGNY, YS12, 3G7RY (aka 3G8), YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и/или UA8kappa для связывания с клеткой рака предстательной железы (*например*, клетками CaP, клетками PC3 *и т.п.*), и/или с идиотипическим антителом, вырабатываемым против антитела YS5, YS5F, YS5vID, SB1HGNY, YS12, 3G7RY (aka 3G8), YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и/или UA8kappa.

Моноклональные антитела

Моноклональные антитела, которые связываются с доменами 1 и/или 2 CD46, предпочтительно связываются с эпитопом, связанным одним или несколькими из YS5, YS5F, YS5vID, SB1HGNY, YS12, 3G7RY (aka 3G8), YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и/или UA8kappa, можно получить разнообразными известными методами, такими как стандартный метод гибридизации соматических клеток, описанный в работе Kohler and Milstein (1975) *Nature* 256: 495, вирусная или онкогенная трансформация В-лимфоцитов, или технология фагового дисплея с использованием библиотек генов антител человека. В конкретных вариантах осуществления антитела представляют собой полностью человеческие моноклональные антитела.

Таким образом, в одном варианте осуществления метод гибридом используют для получения антитела, которое связывается с CD46, предпочтительно связывается с доменом 1 и/или доменом 2 CD46. В этом способе мышь или другое подходящее животное-хозяина иммунизируют подходящим антигеном для выработки лимфоцитов, которые продуцируют или способны продуцировать антитела, которые будут специфически связываться с антигеном, используемым для иммунизации. Альтернативно, лимфоциты могут быть иммунизированы *in vitro*. Лимфоциты затем подвергают слиянию с клетками миеломы с использованием подходящего агента для слияния, такого как полиэтиленгликоль, в результате чего образуются гибридомные клетки (Goding (1986)

Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press)). Культуральную среду, в которой выращивают клетки гибридомы, анализируют на продуцирование моноклональных антител, направленных против антигена. После идентификации гибридомных клеток, которые продуцируют антитела с желаемой специфичностью, аффинностью и/или активностью, клоны могут быть субклонированы методами ограниченного разведения и роста с использованием стандартных способов (Id.). Подходящая для этой цели культуральная среда включает, например, среду DMEM или RPMI-1640. Кроме того, клетки гибридомы могут быть выращены *in vivo* в виде асцитных опухолей у животных. Моноклональные антитела, секретируемые субклонами, удобным образом отделяют от культуральной среды, асцитной жидкости или сыворотки крови с использованием стандартных процедур очистки иммуноглобулина, таких как, например, протеин-А-сефароза, гидроксилпатитная хроматография, гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография.

В дополнительном варианте осуществления антитела и части антител, которые связываются с доменами 1 и/или 2 CD46, можно выделять из фаговых библиотек антител, полученных способами, описанными, например, McCafferty *et al.* (1990) *Nature*, 348: 552-554, Clackson *et al.* (1991) *Nature*, 352:624-628, Marks *et al.* (1991) *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597, Hoet *et al.* (2005) *Nature Biotechnol.*, 23: 344-348; патентах США 5223409; 5403484; и 5571698, выданных Ladner *et al.*; патентах США 5427908 и 5580717, выданных Dower *et al.*; патентах США 5969108 и 6172197, выданных McCafferty *et al.*; и патентах США 5885793; 6521404; 6544731; 6555313; 6582915 и 6593081, выданных Griffiths *et al.* Кроме того, описано получение высокоаффинных (нМ диапазон) антител человека посредством перестановки цепей (Marks *et al.* (1992) *Bio/Technology*, 10:779-783), а также комбинационная инфекция и рекомбинация *in vivo*, как стратегия конструирования очень больших фаговых библиотек (Waterhouse *et al.* (1993) *Nucl. Acids. Res.*, 21: 2265-2266).

В конкретном варианте осуществления моноклональное антитело или его антигенсвязывающую часть, которая связывается с CD46, предпочтительно связывается с эпитопом, связанным одним или несколькими из YS5, YS5F, YS5vID, SB1HGNY, YS12, 3G7RY (aka 3G8), YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и/или UA8карпа, получают с использованием технологии фагового дисплея, описанной ранее Hoet *et al.* Эта технология включает создание библиотеки Fab человека с уникальной комбинацией последовательностей иммуноглобулинов, выделенных от человеческих доноров и имеющих синтетическое разнообразие в CDR тяжелой цепи. Затем библиотеку подвергают скринингу на Fab, которые связываются с CD46, предпочтительно конкурируя за связывание с одним или несколькими из YS5, YS5F,

YS5vID, SB1HGNY, YS12, 3G7RY (aka 3G8), YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и/или UA8kappa.

В еще другом варианте осуществления человеческие моноклональные антитела, направленные против CD46, предпочтительно содержащие эпитоп, связанный одним или несколькими из YS5, YS5F, YS5vID, SB1HGNY, YS12, 3G7RY (aka 3G8), YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и/или UA8kappa, можно генерировать, используя трансгенных или трансхромосомных мышей, несущих части человеческой иммунной системы, а не мышинной системы (смотри, *например*, Lonberg, *et al.* (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Lonberg and Huszar, (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93, Harding and Lonberg (1995) *Ann. NY. Acad. Sci.* 764: 536-546, и патенты США 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; 5789650; 5877397; 5661016; 5814318; 5874299; и 5770429; выданные Lonberg и Kay; патент США 5545807, выданный Surani *et al.*; публикации PCT WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 и WO 99/45962, все из которых поданы Lonberg и Kay; и публикацию PCT WO 01/14424, поданную Korman *et al.*).

В другом варианте осуществления человеческие антитела, направленные против CD46, предпочтительно связывающиеся с эпитопом, связанным одним или несколькими из YS5, YS5F, YS5vID, SB1HGNY, YS12, 3G7RY (aka 3G8), YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и/или UA8kappa, можно получить с использованием мыши, которая несет последовательности человеческого иммуноглобулина на трансгенах и трансхромосомах, например, мыши, которая несет трансген человеческой тяжелой цепи и трансхромосому человеческой легкой цепи (смотри, *например*, публикацию PCT WO 02/43478, поданную Ishida *et al.*).

Альтернативные системы трансгенных животных, экспрессирующие гены человеческого иммуноглобулина, доступны в данной области и могут быть использованы для стимуляции образования антител против CD46 согласно изобретению. Например, можно использовать альтернативную трансгенную систему, называемую Xenomouse (Abgenix, Inc.); данные мыши описаны, например, в патентах США 5939598; 6075181; 6114598; 6150584 и 6162963, выданных Kucherlapati *et al.*

Альтернативные системы трансхромосомных животных, экспрессирующие гены человеческого иммуноглобулина, доступны в данной области и могут быть использованы для стимуляции образования антител против CD46, рассматриваемых в настоящем документе. Например, можно использовать мышей, несущих как трансхромосому человеческой тяжелой цепи, так и трансхромосому человеческой легкой цепи, как описано в работе Tomizuka *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 722-727. Кроме того, коровы,

несущие трансхромосомы человеческих тяжелой и легкой цепей (смотри, *например*, Kuroiwa *et al.* (2002) *Nature Biotechnology* 20: 889-894), описаны в данной области и могут быть использованы для стимуляции образования анти-CD46 ССР1 антител.

В еще другом варианте осуществления антитела, которые специфически связываются с CD46, предпочтительно связываются с эпитопом, связанным одним или несколькими из YS5, YS5F, YS5vID, SB1HGNY, YS12, 3G7RY (aka 3G8), YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и/или UA8карпа, можно получить, используя клетки трансгенного растения и/или культивированного растения (такого как, например, табак, кукуруза и ряска), которое продуцирует такие антитела. Например, листья трансгенного табака, экспрессирующие антитела или их антигенсвязывающие части, можно использовать для получения таких антител, например, путем использования индуцируемого промотора (смотри, *например*, Cramer *et al.* (1999) *Curr. Top. Microbol. Immunol.* 240: 95-118). Также, трансгенную кукурузу можно использовать для экспрессии таких антител и их антигенсвязывающих частей (смотри, *например*, Hood *et al.* (1999) *Adv. Exp. Med. Biol.* 464: 127-147). Антитела могут быть также получены в больших количествах из семян трансгенных растений, включая части антител, такие как одноцепочечные антитела (scFv), например, с использованием семян табака и клубней картофеля (смотри, *например*, Conrad *et al.* (1998) *Plant Mol. Biol.* 38: 101-109). Способы получения антител или антигенсвязывающих частей в растениях можно также найти, *например*, в работе Fischer *et al.* (1999) *Biotechnol. Appl. Biochem.* 30: 99-108, Ma *et al.* (1995) *Trends Biotechnol.* 13: 522-527, Ma *et al.* (1995) *Plant Physiol.* 109: 341-346; Whitelam *et al.* (1994) *Biochem. Soc. Trans.* 22: 940-944, и патентах США 6040498 и 6815184.

Специфичность связывания моноклональных антител или их частей, которые связываются с CD46, предпочтительно связываются с эпитопом, связанным одним или несколькими из антител YS5, YS5F, YS5vID, SB1HGNY, YS12, 3G7RY (aka 3G8), YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и/или UA8карпа, полученных с помощью любого способа, в том числе описанных здесь способов, определяют иммуноосаждением или тестом на связывание *in vitro*, таким как радиоиммуноанализ (RIA) или твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA). Аффинность связывания моноклонального антитела или его части также можно определить с помощью анализа Скэтчарда, Munson *et al.* (1980) *Anal. Biochem.*, 107:220.

Кросс-реактивность с антиидиотипическими антителами

Идиотип представляет высоковариабельный антигенсвязывающий участок антитела и сам по себе является иммуногенным. Во время генерирования

опосредованного антителом иммунного ответа индивидуум будет вырабатывать антитела к антигену, а также антиидиотипические антитела, иммуногенный участок связывания (идиотип) которых имитирует антиген.

Антиидиотипические антитела могут быть созданы против переменных областей антител, идентифицированных здесь (*например*, YS5, YS5F, YS5v1D, SB1HGNY, YS12, 3G7RY (aka 3G8), YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и/или UA8каппа) с использованием стандартных способов, хорошо известных специалистам в данной области. Вкратце, антиидиотипические антитела можно получить путем инъекции антител согласно изобретению или их фрагментов (*например*, CDR) животному, вызывая тем самым образование антисыворотки против различных антигенных детерминант на антителе, включая детерминанты в идиотипической области.

Способы получения антител против антитела хорошо известны в данной области. Антигены с большой молекулярной массой (больше чем примерно 5000 Дальтон) можно инъецировать напрямую животному, тогда как соединения с малой молекулярной массой (менее чем примерно 5000 Дальтон) предпочтительно сочетают с высокомолекулярным иммуногенным носителем, как правило, белком, для наделения их иммуногенностью. Антитела, вырабатываемые в ответ на иммунизацию, могут быть использованы в качестве сыворотки, асцитной жидкости, фракции иммуноглобулина (Ig), фракции IgG или в качестве моноспецифического материала, подвергнутого аффинной очистке.

Поликлональные антиидиотипические антитела могут быть получены путем иммунизации животного антителами согласно настоящему изобретению, полученными, как описано выше. Как правило, желательно иммунизировать животное, которое совпадает по виду и аллотипу с животным, от которого получено антитело (*например*, библиотека фагового дисплея). Это сводит к минимуму выработку антител, направленных против неидиотипических детерминант. Полученная таким образом антисыворотка затем обычно интенсивно абсорбируется по сравнению с нормальной сывороткой от тех же самых видов, от которых получена библиотека фагового дисплея, удаляя тем самым антитела, направленные против неидиотипических детерминант. Абсорбция может быть осуществлена путем пропускания антисыворотки над гелем, образованным путем перекрестного сшивания нормальных (неиммунных) сывороточных белков с глутаральдегидом. Антитела с антиидиотипической специфичностью будут проходить напрямую через гель, тогда как антитела, обладающие специфичностью в отношении неидиотипических детерминант, будут связываться с гелем. Имобилизация неиммунных сывороточных белков на нерастворимой полисахаридной подложке (*например*, сефароза) также обеспечивает подходящую матрицу для абсорбции.

Моноклональные антиидиотипические антитела могут быть получены с использованием способа Kohler *et al.* (1975) *Nature* 256: 495. В частности, моноклональные антиидиотипические антитела могут быть получены с использованием технологии гибридом, которая включает слияние (1) клеток селезенки от мыши, иммунизированной представляющим интерес антигеном или конъюгатом гаптен-носитель (*то есть* антителами согласно изобретению или их последовательностями), с (2) клеточной линией мышинной миеломы, которая была выбрана исходя из ее резистентности к лекарственному средству (*например*, 8-азагуанину). В целом, желательно использовать клеточную линию миеломы, которая не секретирует иммуноглобулин. В данной области известно несколько таких линий. Одной, в целом, предпочтительной клеточной линией является P3X63Ag8.653. Эта клеточная линия депонирована в Американской коллекции типовых культур (American Type Culture Collection) под номером CRL-1580.

Слияние может быть осуществлено в присутствии полиэтиленгликоля в соответствии с одобренными способами (*смотри, например, Monoclonal Antibodies*, R. Kennett, J. McKearn & K. Bechtol, eds. N.Y., Plenum Press, 1980, и *Current Topics in Microbiology & Immunology, Vol. 81*, F. Melchers, M. Potter & N. L. Warner, eds., N.Y., Springer-Verlag, 1978). Полученную смесь слитых и неслитых клеток осаждают в селективной среде, содержащей гипоксантин-аминоптерин-тимидин (HAT). В этих условиях будут расти только гибридные клетки.

Когда происходит достаточный клеточный рост (обычно через 10-14 дней после слияния), культуральную среду собирают и подвергают скринингу на присутствие моноклонального идиотипического антитела против аналита с помощью любого из многочисленных способов, которые включают твердофазный анализ RIA и твердофазный иммуноферментный анализ. Затем клетки из культуральных лунок, содержащих антитело желаемой специфичности, размножают и повторно клонируют. Клетки из тех культур, которые остаются положительными на представляющее интерес антитело, затем обычно переносят в виде асцитных опухолей в восприимчивых, гистосовместимых, пристан-примированных мышей.

Асцитную жидкость извлекают путем пункции перитонеальной полости, повторно тестируют на антитело и очищают, как описано выше. Если для слияния используют несекретирующую линию миеломы, аффинная очистка моноклонального антитела обычно необязательна, поскольку антитело уже является гомогенным в отношении его антигенсвязывающих характеристик. Все, что требуется, это изолирование его от контаминирующих белков в асцитах, *то есть* получение фракции иммуноглобулина.

Альтернативно, представляющие интерес гибридные клеточные линии могут быть выращены в бессывороточной тканевой культуре и антитело извлечено из культуральной среды. В целом, это является менее желательным способом получения больших количеств антитела, так как выход является низким. Также, возможно перенесение клеток внутривенно мышам и извлечение антитела из сыворотки. Способ в целом не является предпочтительным из-за незначительного количества сыворотки, которое может быть получено на забор и из-за необходимости интенсивной очистки от других компонентов сыворотки. Однако некоторые гибридомы не будут расти в виде асцитных опухолей и, следовательно, должен быть использован один из этих альтернативных способов получения антитела.

Кросс-реактивность с YS5, YS5F, YS5vID, SB1HGNY, YS12, 3G7RY (aka 3G8), YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и/или UA8каппа

В другом подходе антитела, которые связываются с CD46, могут быть идентифицированы по тому факту, что они связываются с тем же эпитопом, что и «прототипические» антитела согласно настоящему изобретению (*например*, YS5, YS5F, YS5vID, SB1HGNY, YS12, 3G7RY (aka 3G8), YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и/или UA8каппа). Для идентификации таких антител необязательно изолировать заданный эпитоп. В некоторых вариантах осуществления можно провести скрининг, *например*, библиотек антител на антитела, которые конкурируют с прототипическими антителами согласно настоящему изобретению за связывание и/или интернализацию клеткой рака предстательной железы (*например*, клеткой CaP, клеткой PC3 и т.п.), и/или за связывание с CD46.

Способы скрининга библиотек на связывание с эпитопами и/или клеточное связывание, и/или интернализацию хорошо известны специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления кросс-реактивные антитела против рака предстательной железы показали по меньшей мере 60%, предпочтительно 80%, более предпочтительно 90% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% кросс-реактивности с одним или несколькими из описанных здесь антител YS5, YS5F, YS5vID, SB1HGNY, YS12, 3G7RY (aka 3G8), YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и/или UA8каппа.

Способы фагового дисплея для отбора других «родственных» анти-CD46 антител

С использованием известных последовательностей для антител YS5, YS5F, YS5vID, SB1HGNY, YS12, 3G7RY (aka 3G8), YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и/или UA8каппа, и/или других антител,

специфических в отношении рака предстательной железы, разнообразные способы фагового дисплея (или дрожжевого дисплея) можно использовать для получения других антител, которые специфически связываются с CD46, предпочтительно связываются с эпитопами, связанными YS5, YS5F, YS5vID, SB1HGNY, YS12, 3G7RY (aka 3G8), YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и/или UA8карпа, с такой же или даже более высокой аффинностью.

Способы перестановки цепей

Один из подходов к созданию вариантов антител представляет собой замену исходного гена V_H или V_L на репертуар V-генов для создания новых партнеров (перестановка цепей) (Clackson *et al.* (1991) *Nature*. 352: 624-628) в библиотеке фагового дисплея или дрожжевого дисплея. С использованием перестановки цепей и фагового дисплея аффинность фрагмента scFv человеческого антитела, который связывается с гаптенем фениллоксазолоном (phOx), увеличилась от 300 нМ до 1 нМ (в 300 раз) (Marks *et al.* (1992) *Bio/Technology* 10: 779-783).

Таким образом, например, для изменения аффинности описанного здесь анти-CD46 антитела может быть создан репертуар мутантных вариантов генов scFv, содержащий ген V_H прототипического антитела YS5, YS5F, YS5vID, SB1HGNY, YS12, 3G7RY (aka 3G8), YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и/или UA8карпа (*например*, как показано на фигуре 2), и репертуар человеческих V_L -генов (перестановка легкой цепи). Репертуар генов scFv может быть клонирован в вектор фагового дисплея, *например*, pHEN-1 (Hoogenboom *et al.* (1991) *Nucleic Acids Res.*, 19: 4133-4137) или другие векторы, и после трансформации получена библиотека трансформантов.

Аналогично, для перестановки тяжелой цепи может быть создан репертуар мутантных вариантов генов scFv, содержащий ген V_L прототипического антитела YS5, YS5F, YS5vID, SB1HGNY, YS12, 3G7RY (aka 3G8), YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и/или UA8карпа (*например*, как показано на фигуре 2), и репертуар человеческих V_H -генов (перестановка тяжелой цепи). Репертуар генов scFv может быть клонирован в вектор фагового дисплея, *например*, pHEN-1 (Hoogenboom *et al.* (1991) *Nucleic Acids Res.*, 19: 4133-4137) или другие векторы, и после трансформации получена библиотека трансформантов.

Полученные библиотеки могут быть подвергнуты скринингу против соответствующей мишени (*например*, CD46) и/или в отношении кросс-реактивности с YS5, YS5F, YS5vID, SB1HGNY, YS12, 3G7RY (aka 3G8), YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и/или UA8карпа.

Сайт-направленный мутагенез для улучшения аффинности связывания

Большинство контактирующих с антигеном аминокислотных боковых цепей обычно расположены в определяющих комплементарность областях (CDR), трех в V_H (CDR1, CDR2 и CDR3) и трех в V_L (CDR1, CDR2 и CDR3) (Chothia *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.*, 196: 901-917; Chothia *et al.* (1986) *Science*, 233: 755-8; Nhan *et al.* (1991) *J. Mol. Biol.*, 217: 133-151). Эти остатки обеспечивают большую часть энергий связывания, отвечающих за аффинность антитела в отношении антигена. Было показано, что в других молекулах мутирующие аминокислоты, которые контактируют с лигандом, являются эффективным средством для повышения аффинности молекулы одного белка по отношению к ее партнеру связывания (Lowman *et al.* (1993) *J. Mol. Biol.*, 234: 564-578; Wells (1990) *Biochemistry*, 29: 8509-8516). Сайт-направленный мутагенез CDR и скрининг против клеток рака предстательной железы, особенно в отношении связывания с CD46, например, как описано здесь в примерах, может обеспечить получение антител, обладающих улучшенной аффинностью связывания.

Рандомизация CDR для получения высокоаффинного человеческого scFv

В расширении простого сайт-направленного мутагенеза могут быть созданы библиотеки мутантных антител, в которых рандомизированы частичные или полные CDR (V_L CDR1 CDR2 и/или CDR3, и/или V_H CDR1, CDR2 и/или CDR3). В одном варианте осуществления каждая CDR рандомизирована в отдельной библиотеке с использованием известного антитела (например, YS5, YS5F, YS5v1D, SB1HGNY, YS12, 3G7RY (aka 3G8), YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и/или UA8карпа) в качестве темплата. Последовательности CDR мутантов с самой высокой аффинностью из каждой библиотеки CDR объединяли для получения дополнительного увеличения аффинности. Аналогичный подход использовали для увеличения аффинности человеческого гормона роста (hGH) для рецептора гормона роста более чем в 1500 раз от $3,4 \times 10^{-10}$ до $9,0 \times 10^{-13}$ М (Lowman *et al.* (1993) *J. Mol. Biol.*, 234: 564-578).

V_H CDR3 часто занимает центр связывающего кармана и, таким образом, мутации в этой области по всей видимости вызывают увеличение аффинности (Clackson *et al.* (1995) *Science*, 267: 383-386). В одном варианте осуществления рандомизированы остатки V_H CDR3 (смотри, например, Schier *et al.* (1996) *Gene*, 169: 147-155; Schier and Marks (1996) *Human Antibodies and Hybridomas*. 7: 97-105, 1996; и Schier *et al.* (1996) *J. Mol. Biol.* 263: 551-567).

Другие модификации антител

В одном варианте осуществления частичные последовательности антител, полученные из антител YS5, YS5F, YS5v1D, SB1HGNY, YS12, 3G7RY (aka 3G8), YS6,

YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и/или UA8карпа, могут быть использованы для получения структурно и функционально родственных антител. Например, антитела взаимодействуют с антигенами-мишенями преимущественно через аминокислотные остатки, которые расположены в шести определяющих комплементарность областях (CDR) тяжелой и легкой цепи. По этой причине аминокислотные последовательности в CDR являются более разнообразными между отдельными антителами, чем последовательности вне CDR. Поскольку последовательности CDR ответственны за большинство взаимодействий антитело-антиген, можно экспрессировать рекомбинантные антитела, которые имитируют свойства специфических встречающихся в природе антител, конструированием экспрессирующих векторов, которые включают в себя последовательности CDR из специфического встречающегося в природе антитела, привитые на каркасные последовательности из другого антитела с другими свойствами (смотри, *например*, Riechmann *et al.* (1998) *Nature* 332: 323-327; Jones *et al.*, (1986) *Nature* 321: 522-525; и Queen *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 10029-10033). Такие каркасные последовательности могут быть получены из публичных баз данных ДНК, которые включают последовательности генов антител зародышевой линии.

Таким образом, один или несколько структурных отличительных признаков анти-CD46 антител согласно изобретению, таких как CDR, можно использовать для создания структурно родственных анти-CD46 антител, которые сохраняют по меньшей мере одно функциональное свойство, например, антитела YS5, YS5F, YS5vID, SB1HGNY, YS12, 3G7RY (aka 3G8), YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и/или UA8карпа, *например*, связывание и интернализацию клетками рака предстательной железы.

В конкретном варианте осуществления одна или несколько CDR-областей YS5, YS5F, YS5vID, SB1HGNY, YS12, 3G7RY (aka 3G8), YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и/или UA8карпа (*например*, VH CDR1 и/или CDR2, и/или CDR3, и/или VL CDR1, и/или CDR2, и/или CDR3) рекомбинантно комбинированы с известными человеческими каркасными областями и CDR для создания дополнительных, рекомбинантно полученных анти-CD46 антител. Вариабельные каркасные области тяжелых и легких цепей могут быть получены из одинаковых или различных последовательностей антител.

Из уровня техники хорошо известно, что домены CDR3 тяжелой и легкой цепей антитела играют особенно важную роль в специфичности/аффинности связывания антитела с антигеном (*смотри, например*, Hall *et al.* (1992) *J. Immunol.*, 149: 1605-1612;

Polymenis *et al.* (1994) *J. Immunol.*, 152: 5318-5329; Jahn *et al.* (1995) *Immunobiol.*, 193:400-419; Klimka *et al.* (2000) *Brit. J. Cancer*, 83: 252-260; Beiboer *et al.* (2000) *J. Mol. Biol.*, 296: 833-849; Rader *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 8910-8915; Barbas *et al.* (1994) *J. Am. Chem. Soc.*, 116: 2161-2162; Ditzel *et al.* (1996) *J. Immunol.*, 157: 739-749). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления генерированы антитела, которые включают домены CDR3 тяжелой и/или легкой цепи конкретных описанных здесь антител (*например*, YS5, YS5F, YS5vID, SB1HGNY, YS12, 3G7RY (aka 3G8), YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и/или UA8kappa). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления генерированы антитела, которые включают домены CDR1 тяжелой и/или легкой цепи конкретных описанных здесь антител (*например*, YS5, YS5F, YS5vID, SB1HGNY, YS12, 3G7RY (aka 3G8), YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и/или UA8kappa). Кроме того, антитела могут включать другие домены CDR тяжелой и/или легкой цепи антител согласно настоящему изобретению (*например*, YS5, YS5F, YS5vID, SB1HGNY, YS12, 3G7RY (aka 3G8), YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и/или UA8kappa).

В некоторых вариантах осуществления области CDR1, 2 и/или 3 сконструированных антител, описанных выше, могут содержать конкретную аминокислотную последовательность(и), описанную здесь (*например*, CDR YS5, YS5F, YS5vID, SB1HGNY, YS12, 3G7RY (aka 3G8), YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и/или UA8kappa). Однако специалисту в данной области будет понятно, что возможно некоторое отклонение от конкретных последовательностей CDR при одновременном сохранении способности антитела эффективно связываться с CD46 (*например*, консервативные аминокислотные замены). Соответственно, в другом варианте осуществления сконструированное антитело может состоять из одной или нескольких CDR, которые являются, например, на 90%, 95%, 98%, 99% или 99,5% идентичными одной или нескольким CDR антитела YS5, YS5F, YS5vID, SB1HGNY, YS12, 3G7RY (aka 3G8), YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и/или UA8kappa).

В другом варианте осуществления один или несколько остатков CDR могут быть изменены для модификации связывания с целью достижения более подходящей скорости связывания. Используя эту стратегию, может быть получено антитело, обладающее сверхвысокой аффинностью связывания, например, 10^{10} M⁻¹ или более. Способы созревания аффинности, хорошо известные в данной области и описанные в настоящем документе, могут быть использованы для изменения области(ей) CDR с последующим

скринингом полученных связывающих молекул для желаемого изменения связывания. Таким образом, после изменения CDR можно наблюдать и оценить изменения аффинности связывания, а также иммуногенности для получения антитела, оптимизированного для наилучшего связывания и низкой иммуногенности.

Дополнительно или вместо модификаций в пределах CDR модификации могут быть также сделаны в пределах одной или нескольких каркасных областей FR1, FR2, FR3 и FR4 переменных областей тяжелой и/или легкой цепей антитела, при условии, что эти модификации не нарушают аффинность связывания антитела.

В другом варианте осуществления антитело дополнительно модифицировано в отношении эффекторной функции для повышения эффективности антитела, например, при лечении рака. Например, остаток(и) цистеина может быть введен в Fc-область, обеспечивая тем самым возможность межцепочечного образования дисульфидной связи в данной области. Генерированное таким образом гомодимерное антитело может обладать улучшенной способностью интерализации и/или повышенной комплемент-зависимой способностью уничтожать клетки и антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичностью (ADCC) (смотри, например, Caron *et al.* (1992) *J. Exp Med.* 176: 1191-1195; Shopes (1992) *J. Immunol.* 148: 2918-2922). Гомодимерные антитела с повышенной противоопухолевой активностью также могут быть получены с использованием гетеробифункциональных кросс-линкеров (смотри, например, Wolff *et al.* (1993) *Cancer Res.* 53:2560-2565). Альтернативно, может быть сконструировано антитело, которое обладает удвоенной областью Fc и, следовательно, может обладать повышенным лизисом комплемента и способностями ADCC (смотри, например, Stevenson *et al.* (1989) *Anti-Cancer Drug Design* 3: 219-230).

Получение антител

В различных вариантах осуществления описанные здесь антитела могут быть получены путем химического синтеза или рекомбинантно путем экспрессии.

Химический синтез

Используя информацию о последовательностях, представленную в настоящем документе, CD46-специфические антитела, описанные здесь (например, YS5, YS5F, YS5vID, SB1HGNY, YS12, 3G7RY (aka 3G8), YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и/или UA8каппа), или их варианты могут быть химически синтезированы с использованием хорошо известных способов пептидного синтеза. Твердофазный синтез, в котором C-концевую аминокислоту последовательности присоединяют к нерастворимой подложке с последующим последовательным добавлением остальных аминокислот в последовательности, является одним из

предпочтительных способов химического синтеза одноцепочечных антител. Методики твердофазного синтеза описаны Barany и Merrifield, *Solid Phase Peptide Synthesis*; pp. 3-284 in *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*. Vol. 2: *Special Methods in Peptide Synthesis*, Part A., Merrifield *et al.* (1963) *J. Am. Chem. Soc.*, 85: 2149-2156, и Stewart *et al.* (1984) *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2nd ed. Pierce Chem. Co., Rockford, Ill.

Рекомбинантная экспрессия антител, специфических к раку предстательной железы

В определенных вариантах осуществления CD46-специфические антитела, описанные здесь (например, YS5, YS5F, YS5v1D, SB1HGNY, YS12, 3G7RY (aka 3G8), YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и/или UA8карпа), или их варианты рекомбинантно экспрессируют с использованием способов, хорошо известных специалистам в данной области. Например, используя представленную здесь информацию о последовательностях YS5, YS5F, YS5v1D, SB1HGNY, YS12, 3G7RY (aka 3G8), YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и/или UA8карпа, могут быть получены нуклеиновые кислоты, кодирующие желаемое антитело в соответствии с рядом стандартных способов, известных специалистам в данной области. Нуклеиновые кислоты трансфицируют в клетки-хозяева, которые затем экспрессируют желательное антитело или его цепь.

Методики молекулярного клонирования для достижения этих целей известны в данной области. Разнообразные способы клонирования и *in vitro* амплификации являются подходящими для конструирования рекомбинантных нуклеиновых кислот. Примеры этих методик и инструкции, достаточные для указаний специалистам в данной области, для проведения многих задач по клонированию представлены в Berger and Kimmel, *Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology* volume 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger); Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual* (2nd ed.) Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY, (Sambrook); и *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel *et al.*, eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (1994 Supplement) (Ausubel). Способы получения рекомбинантных иммуноглобулинов также известны в данной области. *Смотри* Cabilly, патент США 4816567; и Queen *et al.* (1989) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86: 10029-10033. Кроме того, подробные протоколы для экспрессии антител также содержатся в Liu *et al.* (2004) *Cancer Res.* 64: 704-710, Poul *et al.* (2000) *J. Mol. Biol.* 301: 1149-1161, и т.п.

Создание других форм антител

Используя известные и/или идентифицированные последовательности (*например*, последовательности V_H и/или V_L) одноцепочечных антител, представленных здесь, могут быть легко созданы другие формы антител. Такие формы включают, но без ограничения, мультивалентные антитела, полные антитела, scFv, (scFv')₂, Fab, (Fab')₂, химерные антитела и т.п.

Создание гомодимеров

Например, для создания антител (scFv')₂ два анти-CD46 антитела соединяют либо посредством линкера (*например*, углеродного линкера, пептида и *т.п.*) или посредством дисульфидной связи, например, между двумя цистеинами. Таким образом, например, для создания связанного дисульфидной связью scFv цистеиновый остаток может быть включен путем сайт-направленного мутагенеза на карбокси-конце антител, описанных здесь.

Фрагмент scFv может быть экспрессирован из этой конструкции, очищен путем аффинной хроматографии на иммобилизованных ионах металла (IMAC) и подвергнут анализу с помощью гель-фильтрации. Для получения димеров (scFv')₂ цистеин восстанавливали путем инкубации с 1 mM 3-меркаптоэтанолом и половину scFv блокировали путем добавления DTNB. Блокированные и неблокированные scFv инкубировали вместе с образованием (scFv')₂ и полученный материал подвергали анализу с помощью гель-фильтрации. Аффинность полученного димера можно определить, используя стандартные способы, *например*, с помощью BIAcore.

В одном иллюстративном варианте осуществления димер (scFv')₂ создан путем соединения фрагментов scFv' посредством линкера, *например*, пептидного линкера. Это может быть осуществлено с помощью разнообразных средств, хорошо известных специалистам в данной области. Например, один из подходов описан Holliger *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (*смотри также* WO 94/13804).

Следует учесть, что используя представленные здесь последовательности V_H и/или V_L можно также легко получить димеры Fab и (Fab')₂. Димер Fab представляет собой легкую цепь, соединенную с V_H -C_{H1} дисульфидной связью, и может быть легко получен с использованием стандартных способов, известных специалистам в данной области. F(ab')₂ может быть получен путем димеризации Fab, *например*, как описано выше для димера (scFv')₂.

Химерные антитела

Рассматриваемые здесь антитела также включают «химерные» антитела, в которых часть тяжелой и/или легкой цепи является идентичной или гомологичной соответствующим последовательностям в антителах, полученных от конкретных видов

или принадлежащих конкретному классу или подклассу антитела, при этом остальная часть цепи(ей) является идентичной или гомологичной соответствующим последовательностям в антителах, полученных от других видов или принадлежащих другому классу или подклассу антитела, а также фрагменты таких антител, при условии, что они проявляют желательную биологическую активность (*смотри, например, патент США 4816567; Morrison et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 6851-6855, etc.*).

В то время, как прототипические антитела, представленные здесь (*например, YS5, YS5F, YS5vID, SB1HGNY, YS12, 3G7RY (aka 3G8), YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и/или UA8kappa*), являются полностью человеческими антителами, рассматриваются химерные антитела, в частности, когда такие антитела подлежат применению у видов, отличных от человека (*например, в ветеринарных применениях*). Химерные антитела представляют собой антитела, содержащие части от двух разных видов (*например, человеческую и нечеловеческую часть*). Как правило, антиген-объединяющая область (или переменная область) химерного антитела происходит из источника одних видов и константная область химерного антитела (которая наделяет иммуноглобулин биологической эффекторной функцией) происходит из другого источника. Специалистам в данной области известно большое число способов получения химерных антител (*смотри, например, патенты США 5502167, 5500362, 5491088, 5482856, 5472693, 5354847, 5292867, 5231026, 5204244, 5202238, 5169939, 5081235, 5075431 и 4975369, и заявка РСТ WO 91/0996*).

В целом, процедуры, используемые для получения химерных антител, состоят из следующих стадий (порядок выполнения некоторых стадий может быть изменен): (а) идентификация и клонирование нужного сегмента гена, кодирующего антигенсвязывающую часть молекулы антитела; этот сегмент гена (известный как VDJ, переменный (V), разнообразный (D) и соединительный (J) участки для тяжелых цепей, или VJ, переменный (V), соединительный (J) участки для легких цепей, или просто V или переменная область, или области V_H и V_L) может быть в форме кДНК или геномной ДНК; (b) клонирование сегментов гена, кодирующих человеческую константную область или ее желательную часть; (c) лигирование переменной области с константной областью таким образом, чтобы полное химерное антитело было кодировано в транскрибируемой и транслируемой форме; (d) лигирование этой конструкции в вектор, содержащий селектируемый маркер и контрольные области гена, такие как промоторы, энхансеры и сигналы добавления поли(А); (e) амплификация этой конструкции в клетке-хозяине (*например, бактерии*); (f) введение ДНК в эукариотические клетки (трансфекция), чаще

всего лимфоциты млекопитающего; и культивирование клетки-хозяина в условиях, подходящих для экспрессии химерного антитела.

Антитела с несколькими различными антигенсвязывающими специфичностями подвергали манипуляции, следуя этим протоколам, для получения химерных белков (*например*, анти-TNP: Boulianne *et al.* (1984) *Nature*, 312: 643) и противоопухолевых антигенов (*смотри, например*, Sahagan *et al.* (1986) *J. Immunol.*, 137: 1066). Аналогично несколько различных эффекторных функций было достигнуто путем связывания новых последовательностей с последовательностями, кодирующими антигенсвязывающий участок. Некоторые из них включают ферменты (Neuberger *et al.* (1984) *Nature* 312: 604), константные области иммуноглобулина из других видов и константные области другой цепи иммуноглобулина (Sharon *et al.* (1984) *Nature* 309: 364; Tan *et al.*, (1985) *J. Immunol.* 135: 3565-3567).

В некоторых вариантах осуществления вектор рекомбинантной ДНК используют для трансфекции клеточной линии, которая вырабатывает анти-CD46 антитело (*например*, специфическое к раку предстательной железы). Новый вектор рекомбинантной ДНК содержит «ген замены» для замены всего или части гена, кодирующего константную область иммуноглобулина в клеточной линии (*например*, ген замены может кодировать всю или часть константной области иммуноглобулина человека, специфического класса иммуноглобулинов, или фермент, токсин, биологически активный пептид, фактор роста, ингибитор или линкерный пептид для содействия конъюгированию с лекарственным средством, токсином или другой молекулой, и *т.д.*), и «последовательность-мишень», которая делает возможной направленную гомологичную рекомбинацию последовательностей иммуноглобулинов в клетке, продуцирующей антитело.

В другом варианте осуществления вектор рекомбинантной ДНК используют для трансфекции клеточной линии, которая вырабатывает антитело с желательной эффекторной функцией (*например*, константной областью иммуноглобулина человека), и в этом случае ген замены, содержащийся в рекомбинантном векторе, может кодировать всю или часть области специфического к раку предстательной железы антитела по изобретению, а последовательность-мишень, содержащаяся в рекомбинантном векторе, делает возможной гомологичную рекомбинацию и направленную модификацию гена в клетке, продуцирующей антитело. В любом варианте осуществления, если заменяют только часть варибельной или константной области, получаемое в результате химерное антитело может определять тот же антиген и/или иметь ту же эффекторную функцию, хотя и быть измененным или улучшенным таким образом, что химерное антитело может проявлять более высокую антигенную специфичность, более высокую константу

аффинности связывания, усиленную эффекторную функцию или повышенную секрецию и выработку трансфицированной клеточной линией, вырабатывающей антитело, и *т.д.*

Независимо от осуществления на практике варианта осуществления могут быть использованы процессы селекции в отношении интегрированной ДНК (посредством селектируемого маркера), скрининг на выработку химерных антител и клеточное клонирование для получения клона клеток, вырабатывающих химерное антитело.

Таким образом, часть ДНК, которая кодирует модификацию для моноклонального антитела, может быть нацелена напрямую на участок экспрессируемого гена иммуноглобулина в пределах В-клетки или клеточной линии гибридомы. Конструкции ДНК для любой конкретной модификации могут быть созданы для изменения выработки белка любой моноклональной клеточной линией или гибридомы. Уровень экспрессии химерного антитела должен быть более высоким, когда ген находится в своем природном хромосомном расположении, а не в случайном положении. Подробное описание способов получения химерных (гуманизированных) антител можно найти в патенте США 5482856.

Интактные человеческие антитела

В другом варианте осуществления данное изобретение обеспечивает интактные, полностью человеческие анти-CD46 антитела (например, специфические к раку предстательной железы). Такие антитела могут быть легко получены способом, аналогичным способу получения химерных человеческих антител. В этом случае, вместо использования функции узнавания, происходящей *например*, от мышей, используют полностью человеческую функцию узнавания (*например*, V_H и V_L) антител, описанных здесь.

Диатела

В некоторых вариантах осуществления рассматриваются диатела, содержащие один или несколько описанных здесь доменов V_H и V_L. Термин «диатела» относится к фрагментам антитела, обычно имеющим два антигенсвязывающих участка. Фрагменты обычно содержат переменный домен тяжелой цепи (V_H), соединенный с переменным доменом легкой цепи (V_L) в одной и той же полипептидной цепи (V_H-V_L). Путем использования линкера, который является слишком коротким для обеспечения спаривания между двумя доменами на одной и той же цепи, домены стремятся к спариванию с комплементарными доменами другой цепи и созданию двух антигенсвязывающих участков. Диатела более подробно описаны, например, в EP 404097; WO 93/11161 и Holliger *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448.

Унитела

В некоторых вариантах осуществления, используя информацию о последовательностях, представленную здесь, анти-CD46 антитела могут быть сконструированы в виде унител. UniBody представляет собой технологию получения антител, с помощью которой можно получить стабильные антитела меньшего размера с ожидаемым терапевтическим окном, большим, чем у некоторых форматов коротких антител. В некоторых вариантах осуществления унитела получены из антител IgG4 путем удаления шарнирной области антитела. В отличие от полноразмерного антитела IgG4, фрагмент, составляющий половину молекулы, является очень стабильным и назван uniBody. Сокращение молекулы IgG4 наполовину оставляет только одну область на UniBody, которая может связываться с мишенью. Способы получения унител описаны подробно в публикации PCT WO2007/059782, которая включена здесь посредством ссылки в полном объеме (*смотри, также, Kolfshoten et al. (2007) Science 317: 1554-1557*).

Аффитела

В некоторых вариантах осуществления информацию о последовательностях, представленную здесь, используют для конструирования молекул аффитела, которые связываются с CD46. Молекулы аффитела представляют собой класс обладающих сродством («affinity») белков на основе домена белка из 58-аминокислотных остатков, полученного из одного из IgG-связывающих доменов стафилококкового белка А. Этот домен, состоящий из трехспирального пучка, использовали в качестве скелета для конструирования комбинаториальных библиотек фагмид, из которых могут быть отобраны варианты аффител, нацеленных на желаемые молекулы, с использованием технологии фагового дисплея (*смотри, например, Nord et al. (1997) Nat. Biotechnol. 15: 772-777; Ronmark et al. (2002) Eur. J. Biochem., 269: 2647-2655*). Подробная информация о аффителах и способах их получения известна специалистам в данной области (*смотри, например, патент США 5831012, полное содержание которого включено здесь посредством ссылки*).

Следует иметь в виду, что антитела, описанные выше, могут быть обеспечены в виде полностью интактных антител (например, IgG), фрагментов антител или одноцепочечных антител с использованием способов, хорошо известных специалистам в данной области. Кроме того, хотя антитело может происходить по существу от любых видов млекопитающих, для снижения иммуногенности желательно использовать антитело, которое происходит от видов, для которых предполагают использовать данное антитело и/или иммуноконъюгат. Другими словами, для применения у человека,

желательно использовать человеческое, гуманизированное или химерное человеческое антитело.

Измерение аффинности связывания антитела/полипептида

Как поясняется выше, селекция по увеличенной avidности может включать измерение аффинности антитела в отношении антигена-мишени (*например*, CD46, в особенности эпитопа, связанного одним или несколькими из YS5, YS5F, YS5vID, SB1HGNY, YS12, 3G7RY (aka 3G8), YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и/или UA8карпа). Способы проведения таких измерений хорошо известны специалистам в данной техники. Вкратце, K_d антитела определяют из кинетики связывания, *например*, с клеткой-мишенью в системе BIAcore, биосенсора на основе поверхностного плазмонного резонанса. Для этой технологии антиген или клетку связывают с дериватизированным сенсорным чипом, способным детектировать измерения в массе. Когда антитело пропускают над сенсорным чипом, антитело связывается с антигеном, что приводит к увеличению массы, которую можно оценить количественно. Измерение скорости ассоциации в зависимости от концентрации антитела можно использовать для расчета константы скорости ассоциации (k_{on}). После фазы ассоциации буфер пропускают над чипом и определяют скорость диссоциации антитела (k_{off}). K_{on} обычно измеряют в диапазоне от $1,0 \times 10^2$ до $5,0 \times 10^6$ и k_{off} в диапазоне от $1,0 \times 10^{-1}$ до $1,0 \times 10^{-6}$. Величины равновесных констант диссоциации K_d часто рассчитывают как k_{off}/k_{on} и, таким образом, обычно измеряют в диапазоне от 10^{-5} до 10^{-12} . Измеренные таким способом аффинности коррелируют с аффинностями, определенными в растворе путем измерения гашения флуоресценции при титровании.

Иммунokonъюгаты, содержащие YS5, YS5F, YS5vID, SB1HGNY, YS12, 3G7RY (aka 3G8), YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и/или UA8карпа или другие анти-CD46 антитела

Прототипические анти-CD46 антитела (*например*, YS5, YS5F, YS5vID, SB1HGNY, YS12, 3G7RY (aka 3G8), YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и/или UA8карпа), описанные здесь, специфически связываются и интернализуются клетками рака предстательной железы и другими CD46-положительными раковыми клетками. Антитела можно использовать отдельно в качестве терапевтических средств (*например*, для ингибирования роста и/или пролиферации клетки рака предстательной железы), или их можно соединить с эффектором с образованием иммунokonъюгатов, обеспечивающих эффективную и специфическую доставку эффектора (*например*, цитотоксинов, меток, радионуклидов, лигандов, антител, лекарственных средств, липосом, наночастиц, вирусных частиц, цитокинов и т.п.) в

различные экспрессирующие CD46 раковые клетки (*например*, выделенные клетки, метастатические клетки, клетки солидной опухоли и *т.п.*).

Анти-CD46 иммуноконъюгаты могут быть образованы путем конъюгирования антител или их антигенсвязывающих частей, описанных здесь, с эффектором (*например*, детектируемой меткой, другим терапевтическим агентом и *т.д.*). Подходящие агенты включают, например, цитотоксический или цитостатический агент (*например*, химиотерапевтический агент), токсин (*например*, ферментативно активный токсин бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, или его фрагменты) и/или радиоактивный изотоп (*то есть* радиоконъюгат).

В некоторых вариантах осуществления эффектор представляет собой детектируемую метку. Подходящие детектируемые метки включают, но без ограничения, рентгеноконтрастные метки, наночастицы, метки для PET (позитронно-эмиссионной томографии), метки для MRI (магнитно-резонансной томографии), радиоактивные метки и т.п. Из числа радионуклидов, используемых в различных вариантах осуществления настоящего изобретения, источники гамма-излучения, источники излучения позитронов, источники рентгеновского излучения и источники флуоресценции являются подходящими для локализации, диагностики и/или определения стадии заболевания, и/или терапии, при этом источники бета- и альфа-излучения, а также агенты, захватывающие электроны и нейтроны, такие как бор и уран, также можно применять для терапии.

Детектируемые метки могут быть использованы в сочетании с внешним детектором и/или внутренним детектором, и обеспечивают средства эффективной локализации и/или визуализации клеток рака предстательной железы. Такая детекция/визуализация может быть полезной в различных аспектах, включая, но без ограничения, предоперационные и интраоперационные периоды. Таким образом, в определенном варианте осуществления данное изобретение относится к способу интраоперационной детекции рака предстательной железы в организме млекопитающего. Эти способы обычно включают введение млекопитающему композиции, содержащей специфическое к раку предстательной железы антитело, меченое детектируемой меткой (*например*, антитела согласно настоящему изобретению, меченые радиоактивным изотопом, *например*, ^{161}Tb , ^{123}I , ^{125}I и т.п.), в количестве, достаточном для детекции с помощью детектора (*например*, зонда, детектирующего гамма-излучение), и после поглощения активного вещества тканью-мишенью, а предпочтительно после выведения метки из крови, подвергание млекопитающего радиоиммуноанализу в соответствующем участке тела, *например*, путем использования зонда, детектирующего гамма-излучение.

В некоторых вариантах осуществления связанное с меткой антитело можно применять в технологии радиоуправляемой хирургии, когда соответствующие ткани в организме субъекта могут быть детектированы и локализованы внутриоперационно с помощью детектора, *например*, зонда, детектирующего гамма-излучение. Оперирующий хирург может интраоперационно использовать этот зонд для нахождения тканей, в которых происходит поглощение соединения, меченого радиоактивным изотопом, то есть, *например*, источником гамма-излучения низкой энергии. В некоторых вариантах осуществления такие способы являются особенно полезными для локализации и удаления вторичного рака, образовавшегося метастатическими клетками из первичной опухоли.

Дополнительно к детектируемым меткам некоторые предпочтительные эффекторы включают, но без ограничения, цитотоксины (*например*, экзотоксин *Pseudomonas*, рицин, абрин, дифтерийный токсин и т.п.) или цитотоксические лекарственные средства или пролекарства, и в этом случае химерная молекула может действовать в качестве мощного уничтожающего клетки агента, специфически нацеливающего цитотоксин на клетки рака предстательной железы.

В еще других вариантах осуществления эффектор может включать липосому, инкапсулирующую лекарственное средство (*например*, лекарственное средство против рака, такое как абраксан, доксорубин, династрия памидронат, анастрозол, эксеместан, циклофосфамид, эпирубинин, торемифен, летрозол, трастузумаб, мегестролтамоксифен, паклитаксел, доцетаксел, капецитабин, гозерелина ацетат, золедроновая кислота, винбластин и т.д.); антиген, стимулирующий узнавание связанной клетки компонентами иммунной системы; антитело, которое специфически связывается с компонентами иммунной системы и направляет их на рак предстательной железы, и т.п.

Иллюстративные эффекторы

Визуализирующие композиции

В некоторых вариантах осуществления анти-CD46 иммуноконъюгаты можно применять для направления детектируемых меток на участок локализации опухоли. Это может содействовать детекции и/или локализации опухоли. Это может быть эффективным для детекции первичных опухолей или, в некоторых вариантах осуществления, вторичных опухолей, образованных, *например*, метастатическими клетками предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления эффекторный компонент иммуноконъюгата представляет собой «рентгеноконтрастную» метку, *например*, метку, которая может быть легко визуализирована с использованием рентгеновского излучения. Рентгеноконтрастные вещества хорошо известны специалистам в данной области. Наиболее распространенные рентгеноконтрастные вещества включают иодид, бромид или

соли бария. Другие рентгеноконтрастные вещества также хорошо известны и включают, но без ограничения, органические производные висмута (*смотри, например*, патент США 5939045), рентгеноконтрастные полиуретаны (*смотри, например*, патент США 5346981), органовисмутовые композиты (*смотри, например*, патент США 5256334), рентгеноконтрастные полимерные комплексы на основе бария (*смотри, например*, патент США 4866132) и т.п.

Анти-CD46 антитела, описанные здесь, могут быть напрямую соединены с рентгеноконтрастным фрагментом или присоединены к «упаковке» (*например*, хелат, липосома, полимерная микрочастица, наночастица и т.д.), несущей, содержащей или включающей рентгеноконтрастное вещество, *например*, как описано ниже.

Дополнительно к рентгеноконтрастным меткам другие метки также являются подходящими для применения. Детектируемые метки, подходящие для применения в иммуноконъюгатах, включают любую композицию, детектируемую с помощью спектроскопических, фотохимических, биохимических, иммунохимических, электрических, оптических или химических средств. Полезные метки включают магнитные шарики (*например*, DYNABEADS™), флуоресцентные красители (*например*, флуоресцентный изотиоцианат, тexasский красный, родамин, зеленый флуоресцентный белок и т.п.), радиоактивные метки (*например*, ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C или ^{32}P), ферменты (*например*, пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу и другие обычно используемые в ELISA) и колориметрические метки, такие как коллоидное золото или окрашенные стеклянные или пластиковые (*например*, полистироловые, полипропиленовые, латексные и т.д.) шарики, наночастицы, квантовые точки и т.п.

В некоторых вариантах осуществления подходящие радиоактивные метки включают, но без ограничения, ^{99}Tc , ^{203}Pb , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{72}As , ^{111}In , $^{113\text{m}}\text{In}$, ^{97}Ru , ^{62}Cu , $^{64}\text{I}\text{Cu}$, ^{52}Fe , $^{52\text{m}}\text{Mn}$, ^{51}Cr , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{77}As , ^{90}Y , ^{67}Cu , ^{169}Er , ^{121}Sn , ^{127}Te , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{161}Tb , ^{109}Pd , ^{165}Dy , ^{149}Pm , ^{151}Pm , ^{153}Sm , ^{157}Gd , ^{159}Gd , ^{166}Ho , ^{172}Tm , ^{169}Yb , ^{175}Yb , ^{177}Lu , ^{105}Rh и ^{111}Ag .

Способы детекции таких меток хорошо известны специалистам в данной области. Так, например, определенные радиоактивные метки могут быть детектированы с использованием фотографической пленки, сцинтилляционных детекторов, визуализации PET, MRI и т.п. Флуоресцентные маркеры могут быть детектированы с использованием фотодетектора для детекции испускаемого излучения. Ферментные метки обычно детектируют путем обеспечения фермента субстратом и детекции продукта реакции, образовавшегося в результате действия фермента на субстрат, и колориметрические метки детектируют путем простой визуализации окрашенной метки.

Радиосенсибилизаторы

В другом варианте осуществления эффектор может представлять собой радиосенсибилизатор, который усиливает цитотоксический эффект ионизирующего излучения (*например*, такого, которое продуцируется ^{60}Co или источником рентгеновского излучения) на клетку. Известно множество радиосенсибилизирующих агентов, которые включают, но без ограничения, соединения производных бензопорфирина (*смотри, например*, патент США 5945439), оксиды 1,2,4-бензотриазина (*смотри, например*, патент США 5849738), соединения, содержащие некоторые диамины (*смотри, например*, патент США 5700825), BCNT (*смотри, например*, патент США 5872107), радиосенсибилизирующие амиды нитробензойной кислоты (*смотри, например*, патент США 4474814), различные гетероциклические производные (*смотри, например*, патент США 5064849), комплексы платины (*смотри, например*, патент США 4921963), и т.п.

Источники альфа-излучения

В некоторых вариантах осуществления эффектор может включать источник альфа-излучения, *то есть* радиоактивный изотоп, который испускает альфа-частицы. Недавно было показано, что источники альфа-излучения являются эффективными для лечения рака (*смотри, например*, McDevitt *et al.* (2001) *Science* 294:1537-1540; Ballangrud *et al.* (2001) *Cancer Res.* 61: 2008-2014; Borchardt *et al.* (2003) *Cancer Res.* 63: 5084-50). Подходящие источники альфа-излучения включают, но без ограничения, Bi, ^{213}Bi , ^{211}At и т.п.

Хелаты

Многие из фармацевтических средств и/или радиоактивных меток, описанных здесь, могут быть обеспечены в виде хелата. Хелатообразующая молекула обычно соединена с молекулой (*например*, биотином, авидином, стрептавидином и *т.д.*), которая специфически связывается с эпитопной меткой, присоединенной к анти-CD46 антителу (*например*, YS5, YS5F, YS5vID, SB1HGNY, YS12, 3G7RY (aka 3G8), YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и/или UA8kappa), описанному здесь.

Хелатообразующие группы хорошо известны специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления хелатообразующие группы получены из этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA), диэтилентриаминопентауксусной кислоты (DTPA), циклогексил-1,2-диаминтетрауксусной кислоты (CDTA), этиленгликоль-О,О'-бис(2-аминоэтил)-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты (EGTA), N,N-бис(гидроксибензил)-этилендиамин-N,N'-диуксусной кислоты (HBED), триэтилентетрамингексауксусной кислоты (ТТНА), 1,4,7,10-тетраазациклододекан-N,N',N'',N'''-тетрауксусной кислоты

(DOTA), гидроксипентиламинтриуксусной кислоты (HEDTA), 1,4,8,11-тетраазациклотетрадекан-N,N',N'',N'''-тетрауксусной кислоты (TETA), замещенной ДТРА, замещенной EDTA и т.п.

Примеры некоторых предпочтительных хелаторов включают незамещенные или замещенные 2-иминотиоланы и 2-иминотиацicloгексаны, в частности, 2-имино-4-меркаптометилтиолан.

Один хелатообразующий агент, 1,4,7,10-тетраазациклододекан-N,N,N'',N'''-тетрауксусная кислота (DOTA), представляет особый интерес из-за его способности образовывать хелатные комплексы с рядом диагностически и терапевтически важных металлов, таких как радионуклиды и радиоактивные метки.

Описаны конъюгаты DOTA и белков, таких как антитела. Например, в патенте США 5428156 описан способ конъюгирования DOTA с антителами и фрагментами антител. Для получения таких конъюгатов одну карбоксильную группу DOTA превращают в активный сложный эфир, который взаимодействует с амином или сульфгидрильной группой на антителе или фрагменте антитела. В работе Lewis *et al.* (1994) *Bioconjugate Chem.* 5: 565-576 описан аналогичный способ, в котором одну карбоксильную группу DOTA превращают в активный сложный эфир, и активированную DOTA смешивают с антителом, связывая антитело с DOTA через эпсилон-аминогруппу остатка лизина антитела, превращая тем самым одну карбоксильную группу DOTA в амидный фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления хелатообразующий агент может быть соединен напрямую или посредством линкера с эпитопной меткой или фрагментом, который связан с эпитопной меткой. Конъюгаты DOTA и биотина были описаны (*смотри, например, работу Su (1995) J. Nucl. Med., 36 (5 Suppl):154P*, в которой описано соединение DOTA с биотином через доступные аминокислотные производные боковой цепи биотина, такие как DOTA-LC-биотин или DOTA-бензил-4-(6-амино-капроамид)-биотин). В работе Yau *et al.*, WO 95/15335 описан способ получения соединений нитро-бензил-DOTA, которые могут быть конъюгированы с биотином. Способ включает реакцию циклизации с участием гидроксильной группы; тозилрование амина; снятие защиты с временно защищенной гидроксигруппы; тозилрование незащищенной гидроксигруппы; и внутримолекулярную циклизацию тозилата. В работе Wu *et al.* (1992) *Nucl. Med. Biol.*, 19(2): 239-244 описан синтез макроциклических хелатообразующих агентов для радиоактивного мечения белков ^{111}In и ^{90}Y . В работе Wu *et al.* получают меченый конъюгат DOTA-биотин для исследования стабильности и биораспределения конъюгатов с авидином, модельным белком для исследований. Этот конъюгат получали с

использованием биотингидразида, который содержит свободную аминогруппу для взаимодействия с генерированным *in situ* активированным производным DOTA.

Цитотоксины/цитостатические агенты

Анти-CD46 антитела, описанные здесь (*например*, YS5, YS5F, YS5v1D, SB1HGNY, YS12, 3G7RY (aka 3G8), YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и/или UA8kappa), можно применять для доставки различных цитотоксических и/или цитостатических лекарственных средств, включая терапевтические лекарственные средства, испускающее излучение соединение, цитотоксические молекулы растительного, грибкового или бактериального происхождения, биологические белки и их смеси. В некоторых вариантах осуществления цитотоксические лекарственные средства могут представлять собой внутриклеточно действующие цитотоксические лекарственные средства, *например*, малые органические молекулы, цитотоксические белки или пептиды, источники излучения, включая, например, источники короткопробежного альфа-излучения высокой энергии, как описано выше, и т.п.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления анти-CD46 антитело присоединено к цитотоксическому/цитостатическому лекарственному средству. В различных вариантах осуществления лекарственные средства, используемые для конструирования ADC, включают, но без ограничения, ингибиторы микротрубочек и ДНК-повреждающие агенты, ингибиторы полимеразы (*например*, ингибитор полимеразы II, α -аманитин) и т.п. В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгировано с лекарственным средством напрямую или посредством линкера, при этом в других вариантах осуществления антитело конъюгировано с носителем лекарственного средства (*например*, липосомой, содержащей лекарственное средство, полимерным носителем лекарственного средства, носителем лекарственного средства в форме наночастиц, липидным носителем лекарственного средства, дендримерным носителем лекарственного средства и т.п.).

В некоторых вариантах осуществления лекарственное средство представляет собой ингибитор тубулина, включая, но без ограничения, ауристин, доластатин-10, синтетические производные природного продукта доластатина-10, и майтансина или производное майтансина.

В некоторых вариантах осуществления лекарственное средство представляет собой ауристин. В некоторых вариантах осуществления ауристин выбран из группы, состоящей из: ауристатина E (AE), монометилауристатина E (MMAE), монометилауристатина F (MMAF), vcMMAE и vcMMAF.

В некоторых вариантах осуществления лекарственное средство представляет собой майтансин. Иллюстративные майтансины включают, но без ограничения, мертансин (DM1); и аналог майтансина, такой как DM3 или DM4.

В некоторых вариантах осуществления лекарственное средство представляет собой агент, взаимодействующий с ДНК. В некоторых вариантах осуществления агент, взаимодействующий на ДНК, включает, но без ограничения, калихеамицины, дуокармицины, пирролобензодиазепины (PBD) и т.п.

В одном иллюстративном, но неограничивающем варианте осуществления лекарственное средство представляет собой калихеамицин. Калихеамицины связываются с ДНК и вызывают разрывы цепей. В некоторых вариантах осуществления лекарственное средство представляет собой калихеамицин или аналог калихеамицина. Аналоги калихеамицина описаны в патенте США 5264586, который включен в настоящий документ посредством ссылки в отношении аналогов калихеамицина, описанных здесь.

В другом иллюстративном, но неограничивающем варианте осуществления лекарственное средство представляет собой дуокармицин. Дуокармицины являются ДНК-повреждающими агентами, способными проявлять свой механизм действия на любой фазе клеточного цикла. Агенты, которые являются частью этого класса дуокармицинов, обычно обладают активностью в низком пикомолекулярном диапазоне. Иллюстративные дуокармицины (*например*, аналоги дуокармицина), которые можно применять в качестве эффекторов в химерных конструкциях, рассматриваемых в настоящем документе, включают, но без ограничения, дуокармицин А, дуокармицин В1, дуокармицин В2, дуокармицин С1, дуокармицин С2, дуокармицин D, дуокармицин SA, циклопропилбензоиндол дуокармицин (СС-1065), центанамицин, рахелмицин, адозелезин, бизелезин, карзелезин и т.п.

В другом иллюстративном, но неограничивающем варианте осуществления лекарственное средство представляет собой пирролобензодиазепин. В некоторых вариантах осуществления лекарственное средство представляет собой синтетическое производное двух пирролобензодиазепинов, связанных гибкой полиметиленовой связью. Пирролобензодиазепины (PBD) и димеры PBD описаны в патенте США 7528126 В2, который включен здесь посредством ссылки в отношении пирролобензодиазепинов и димеров PBD, описанных здесь. В некоторых вариантах осуществления пирролобензодиазепин выбран из группы, состоящей из: антрамицина (и его димеров), мазетрамицина (и его димеров), томаймицина (и его димеров), протракарцина (и его димеров), хикамицина (и его димеров), неотрамицина А (и его димеров), неотрамицина В (и его димеров), DC-81 (и его димеров), сибиромицина (и его димеров), поротрамицина А

(и его димеров), поротрамицина В (и его димеров), сибаномицина (и его димеров), аббеймицина (и его димеров), SG2000 и SG2285.

В некоторых вариантах осуществления лекарственное средство представляет собой ингибитор полимеразы, включая, но без ограничения, ингибиторы полимеразы II, такие как альфа-аманитин, и ингибиторы поли(ADP-рибоза)полимеразы (PARP). Иллюстративные ингибиторы PARP включают, но без ограничения, инипариб (BSI 201), талазопариб (BMN-673), олапариб (AZD-2281), олапариб, рукапариб (AG014699, PF-01367338), велипариб (ABT-888), CEP 9722, МК 4827, BGB-290 и т.п.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксический/цитостатический агент содержит белковый или пептидный токсин, или его фрагмент. Примерами ферментативно активных токсинов и их фрагментов служат, например, фрагмент дифтерийного токсина А, несвязывающие активные фрагменты дифтерийного токсина, экзотоксин А (из *Pseudomonas aeruginosa*), А-цепь рицина, А-цепь абрина, А-цепь модецина, альфа-сакрин, некоторые белки *Aleurites fordii*, некоторые белки диантина, белки *Phytolacca americana* (РАР, РАPII и РАР-S), ингибитор из *Morodica charantia*, курцин, кротин, ингибитор из *Saponaria officinalis*, гелонин, митогиллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трикотецены. Для получения радиоконъюгированных антител доступны разнообразные радионуклиды. Примеры включают, но без ограничения, ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y , ^{186}Re и т.п.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксины могут включать, но без ограничения, экзотоксины *Pseudomonas*, токсины *Diphtheria*, рицин, абрин и их производные. Экзотоксин А *Pseudomonas* (PE) представляет собой высокоактивный мономерный белок (молекулярная масса 66 кДа), секретируемый *Pseudomonas aeruginosa*, который ингибирует синтез белка в эукариотических клетках посредством инактивации фактора элонгации 2 (EF-2) путем катализования его ADP-рибозилирования (катализирует перенос ADP-рибозильной группы окисленного NAD на EF-2).

Токсин содержит три структурных домена, которые действуют совместно для вызывания цитотоксичности. Домен Ia (аминокислоты 1-252) опосредует клеточное связывание. Домен II (аминокислоты 253-364) отвечает за транслокацию в цитозоль и домен III (аминокислоты 400-613) опосредует ADP-рибозилирование фактора элонгации 2, что приводит к инактивации белка и вызывает клеточную гибель. Функция домена Ib (аминокислоты 365-399) остается неидентифицированной, хотя большая его часть, аминокислоты 365-380, может быть удалена без утраты цитотоксичности. Смотри Siegall *et al.* (1989) *J. Biol. Chem.* 264: 14256-14261.

В некоторых вариантах осуществления антитело присоединено к предпочтительной молекуле, в которой удален домен Ia (аминокислоты с 1 по 252), и из домена Ib удалены аминокислоты с 365 по 380. В некоторых вариантах осуществления весь домен Ib и часть домена II (аминокислоты с 350 по 394) могут быть удалены, в частности, если удаленные последовательности заменены на связывающий пептид.

Кроме того, PE и другие цитотоксические белки могут быть дополнительно модифицированы с использованием сайт-направленного мутагенеза или других методик, известных в данной области, для изменения молекулы для конкретного желаемого применения. Например, могут быть также использованы средства для изменения молекулы PE без значительного нарушения функциональных преимуществ, обеспеченных молекулами PE, описанными здесь, и такие полученные молекулы предполагаются быть охваченными в настоящем документе.

Способы клонирования генов, кодирующих экзотоксин A *Pseudomonas* (PE), слитый с различными лигандами, хорошо известны специалистам в данной области (смотри, например, Siegall *et al.* (1989) *FASEB J.*, 3: 2647-2652; и Chaudhary *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 4538-4542).

Аналогично PE, дифтерийный токсин (DT) уничтожает клетки путем ADP-рибозилирования фактора элонгации 2, тем самым ингибируя синтез белка. Однако молекула дифтерийного токсина состоит из двух цепей, A и B, связанных дисульфидным мостиком. В отличие от PE, цепь B DT, которая расположена на карбоксильном конце, отвечает за связывание с рецептором, а цепь A, которая присутствует на амино-конце, обладает ферментативной активностью (Uchida *et al.* (1972) *Science*, 175: 901-903; Uchida *et al.* (1973) *J. Biol. Chem.*, 248: 3838-3844).

В некоторых вариантах осуществления иммуноконъюгаты антитело-токсин *Diphtheria* согласно данному изобретению содержат нативный рецепторсвязывающий домен, удаленный путем усечения B-цепи дифтерийного токсина. Одним из иллюстративных модифицированных токсинов *Diphtheria* является DT388, DT, в котором удалена карбоксильная концевая последовательность, которая начинается с остатка 389 (смотри, например, Chaudhary *et al.* (1991) *Bioch. Biophys. Res. Comm.*, 180: 545-551). Аналогично химерным цитотоксинам PE, молекулы DT можно химически конъюгировать с антителом, специфическим к раку предстательной железы, но в некоторых предпочтительных вариантах осуществления антитело сливают с токсином *Diphtheria* рекомбинантными способами (смотри, например, Williams *et al.* (1990) *J. Biol. Chem.* 265: 11885-11889).

Вирусные частицы

В некоторых вариантах осуществления эффектор представляет собой вирусную частицу (*например*, нитчатый бактериофаг, аденоассоциированный вирус (AAV), лентивирус и т.п.). Антитело может быть конъюгировано с вирусной частицей и/или экспрессировано на поверхности вирусной частицы (*например*, нитчатого бактериофага). Вирусная частица может дополнительно включать нуклеиновую кислоту, подлежащую доставке в клетку-мишень (*например*, рака предстательной железы). Использование вирусных частиц для доставки нуклеиновых кислот в клетки подробно описано в WO 99/55720, US 6670188, US 6642051 и US 6669936.

Другие терапевтические фрагменты

Другие подходящие молекулы эффектора включают фармакологические агенты или инкапсулирующие системы, содержащие различные фармакологические агенты. Таким образом, в различных вариантах осуществления признается, что нацеливающая молекула (*например*, нацеливающее антитело) может быть присоединено напрямую или посредством линкера к лекарственному средству, которое подлежит доставке напрямую в опухоль.

Такие лекарственные средства хорошо известны специалистам в данной области и включают, но без ограничения, антитела против рака (*например*, HERCEPTIN®), антиметаболиты, алкилирующие агенты, ингибиторы топоизомеразы, агенты, нацеленные на микротрубочки, ингибиторы киназы, ингибиторы синтеза белка, аналоги соматостатина, глюкокортикостероиды, ингибиторы ароматазы, ингибиторы mTOR, ингибиторы протеинкиназы B (PKB), фосфатидилинозитол, ингибиторы 3-киназы (PI3K), ингибиторы циклинзависимой киназы, молекулы анти-TRAIL, ингибиторы MEK, и т.п. В некоторых вариантах осуществления соединения против рака включают, но без ограничения, фторурацил (5-FU), капецитабин/КСЕЛОДА, 5-трифторметил-2'-дезоксифлуоридин, метотрексат натрия, ралтитрексед/томудекс, пеметрексед/Алимта®, цитозин-арабинозид (цитарабин, ара-С)/тиогуанин, 6-меркаптопурин (меркаптопурин, 6-MP), азотиоприн/азасан, 6-тиогуанин (6-TG)/пуринетол (TEVA), пентостатин/нипент, флударабина фосфат/Флудара®, кладрибин (2-CdA, 2-хлордезоксиаденозин)/леустатин, флоксуридин (5-фтор-2)/FUDR (Hospira, Inc.), ингибитор рибонуклеотидредуктазы (RNR), циклофосфамид/цитоксан (BMS), неозар, ифосфамид/митоксана, тиотепа, BCNU - 1,3-бис(2-хлорэтил)-1-нитрозомочевину, 1-(2-хлорэтил)-3-циклогексил-нитрозомочевину, метил CCNU, гексаметилмеламин, бусульфан/милеран, прокарбазин HCL/матулан, дакарбазин (DTIC), хлорамбуцил/Лейкаран®, мелфалан/алкеран, цисплатин (цисплатинум, CDDP)/платинол, карбоплатин/параплатин, оксалиплатин/элокситан, бендамустин, кармустин, хлорметин, дакарбазин (DTIC), фотемустин, ломустин,

манносульфат, недаплатин, нимустин, преднимустин, ранимустин, сатраплатин, семустин, стрептозоцин, темозоломид, тресульфат, триазиквон, триэтиленмеламин, тиотепа, триплатина тетранитрат, трофосфамид, урамустин, доксорубицин HCL/доксил, даунорубицин цитрат/Daunoxome®, митоксантрон HCL/новантрон, актиномицин D, этопозид/вепезид, топотекан HCL/гикамтин, тенипозид (VM-26), иринотекан HCL(CPT-11), Цамптосар®, камптотецин, белотекан, рубитекан, винкристин, винбластин сульфат, винорелбина тартрат, виндезин сульфат, паклитаксел/таксол, доцетаксел/таксотер, паклитаксел в форме наночастиц, абраксан, иксабепилон, ларотаксел, ортатаксел, тезетаксел, винфлунин и т.п. В некоторых вариантах осуществления лекарственное средство(а) против рака включает одно или несколько лекарственных средств, выбранных из группы, состоящей из карбоплатина (*например*, Параплатин®), цисплатина (*например*, Платинол®, Платинол-AQ®), циклофосфамида (*например*, Цитоксан®, Неозар®), доцетаксела (*например*, Таксотер®), доксорубицина (*например*, Адриамицин®), эрлотиниба (*например*, Тарцева®), этопозида (*например*, Вепезид®), фторурацила (*например*, 5-FU®), гемцитабина (*например*, Гемзар®), иматениба мезилата (*например*, Гливек®), иринотекана (*например*, Камптосар®), метотрексата (*например*, Фолекс®, Мексат®, Амептерин®), паклитаксела (*например*, Таксол®, Абраксан®), сорафиниба (*например*, Нексавар®), сунитиниба (*например*, Сутент®), топотекана (*например*, Гикамтин®), винбластин (*например*, Велбан®), винкристина (*например*, Онковин®, Винкасар PFS®). В некоторых вариантах осуществления лекарственное средство против рака представляет собой одно или несколько лекарственных средств, выбранных из группы, состоящей из ретиноевой кислоты, производного ретиноевой кислоты, доксирубицина, винбластин, винкристина, циклофосфамида, ифосфамида, цисплатина, 5-фторурацила, производного камптотецина, интерферона, тамоксифена и таксола. В некоторых вариантах осуществления соединение против рака выбрано из группы, состоящей из абраксана, доксорубицина, натрия памидроната, анастрозола, экземестана, циклофосфамида, эпирубицина, торемифена, летрозолола, трастузумаба, мегестролтамоксифена, паклитаксела, доцетаксела, капецитабина, гозерелина ацетата, золедроновой кислоты, винбластин и *т.д.*, антисмысловой молекулы, SiRNA, и т.п.

Альтернативно, молекула эффектора может представлять собой инкапсулирующую систему, такую как вирусный капсид, липосома или мицелла, которая содержит терапевтическую композицию, такую как лекарственное средство, нуклеиновую кислоту (*например*, антисмысловую нуклеиновую кислоту или другую нуклеиновую кислоту, подлежащую доставке в клетку) или другой терапевтический агент, который предпочтительно защищен от прямого воздействия кровеносной системы. Способы

получения липосом, присоединенных к антителам, хорошо известны специалистам в данной области (*смотри, например, патент США 4957735, Connor et al. (1985) Pharm. Ther., 28: 341-365, и т.п.*).

В) Присоединение антитела к эффектору

Специалисту в данной области будет понятно, что анти-CD46 антитела, описанные здесь (*например, YS5, YS5F, YS5v1D, SB1HGNY, YS12, 3G7RY (aka 3G8), YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и/или UA8kappa*) и молекула(ы) эффектора могут быть соединены вместе в любом порядке. Таким образом, когда антитело представляет собой одноцепочечный полипептид, молекула эффектора может быть соединена с амино- или карбокси-концом нацеливающей молекулы. Антитело может быть также соединено с внутренним участком молекулы эффектора, или, напротив, молекула эффектора может быть соединена с внутренним участком антитела, при условии, что присоединение не нарушает соответствующих активностей молекул.

Антитело и эффектор могут быть соединены с помощью множества способов, хорошо известных специалистам в данной области. Обычно эффектор конъюгируют напрямую или посредством линкера (спейсера) с антителом. Однако в некоторых вариантах осуществления, в которых эффекторная молекула представляет собой или содержит полипептид, желательнее рекомбинантно экспрессировать химерную молекулу в виде одноцепочечного белка слияния.

Конъюгирование эффекторной молекулы с антителом

В одном варианте осуществления CD46-специфическое антитело химически конъюгировано с молекулой эффектора (*например, цитотоксином, меткой, лигандом, лекарственным средством, липосомой и т.д.*). Способы химического конъюгирования молекул хорошо известны специалистам в данной области.

Процедура присоединения эффектора к антителу будет различаться в зависимости от химической структуры эффектора и/или антитела. Полипептиды обычно содержат разнообразные функциональные группы; *например, группы карбоновой кислоты (COOH) или свободного амина (-NH₂), которые доступны для взаимодействия с подходящей функциональной группой на молекуле эффектора для связывания с эффектором.*

Альтернативно, антитело и/или эффектор можно дериватизировать таким образом, что они имеют или присоединяют дополнительные реакционноспособные функциональные группы. Дериватизация может включать присоединение любой из ряда линкерных молекул, таких как доступные от компании Pierce Chemical Company, Rockford Illinois.

Используемый здесь «линкер» представляет собой молекулу, которую используют для соединения нацеливающей молекулы с молекулой эффектора. Линкер способен образовывать ковалентные связи как с нацеливающей молекулой, так и с молекулой эффектора. Подходящие линкеры хорошо известны специалистам в данной области и включают, но без ограничения, углеродные линкеры с прямой или разветвленной цепью, гетероциклические углеродные линкеры или пептидные линкеры. Когда нацеливающая молекула и молекула эффектора являются полипептидами, линкеры могут быть присоединены к составляющим аминокислотам через их боковые группы (например, через дисульфидную связь к цистеину). Однако в предпочтительном варианте осуществления линкеры могут быть присоединены к амино- или карбоксильным группам альфа-углерода концевых аминокислот.

Иммуноконъюгаты могут быть получены с использованием различных бифункциональных связывающих белок агентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдителиол)пропионат (SPDP), имиотиолан (IT), бифункциональные производные имидоэфиров (такие как диметиладипимидат HCL), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидосоединения (такие как бис(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис(п-диазонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как 2,6-диизоцианат толуола) и бис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, иммунотоксин рицин может быть получен, как описано в Vitetta *et al.*, Science 238: 1098 (1987). Меченая по углероду-14 1-изоотиоцианатобензил-3-метилдиэтилтриаминпентауксусная кислота (MX-DTPA) представляет собой иллюстративный, но без ограничения, хелатообразующий агент для конъюгирования, например, радионуклида с антителом (смотри, например, WO1994/011026 (PCT/US1993/010953)).

В некоторых вариантах осуществления конъюгирование эффекторов (*например*, лекарственных средств, липосом и *т.п.*) или линкеров, присоединенных к эффекторам, с антителом происходит в доступных для растворителя реакционноспособных аминокислотах, таких как лизины или цистеины, которые могут быть получены в результате восстановления межцепных дисульфидных связей в антителе. В некоторых вариантах осуществления конъюгирование по цистеину может происходить после восстановления четырех межцепных дисульфидных связей.

В некоторых вариантах осуществления сайт-специфическое конъюгирование, в котором известное число конъюгатов линкеров с лекарственными средствами последовательно конъюгируют с заданными участками антитела, может быть выполнено

для получения высокоомогенной конструкции. Соотношение лекарственное средство-антитело (DAR) можно точно контролировать и адаптировать к различным конъюгатам линкеров с лекарственными средствами с получением, например, 2- или 4-DAR сайт-специфических ADC.

Известно много способов достижения сайт-специфического конъюгирования. Например, цистеин аминокислоты содержит реакционноспособную тиольную группу, которая играет важную роль в структуре и функции многих белков. Конъюгирование тио-реактивных зондов с белками через цистеиновые остатки давно служит способом мечения белков, а также применялось для создания конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC). В некоторых иллюстративных, но неограничивающих вариантах осуществления этот процесс включает частичное восстановление существующих дисульфидных связей (*например*, межцепных дисульфидных связей).

В некоторых вариантах осуществления для сохранения дисульфидных связей цистеиновые остатки могут быть встроены в белки. Успех использования введенных цистеиновых остатков для сайт-специфического конъюгирования обусловлен способностью отбора нужных сайтов, в которых замещение цистеином не изменяет структуру или функцию белка. Для осуществления этого проводили анализ Phage Elisa for Selection of Reactive Thiols (PHESELECTOR) путем введения реакционноспособных цистеиновых остатков в антитело-Fab (трастузумаб-Fab 4D5) в различных участках, экспонирования Fab на фаге и скрининга для идентификации реакционноспособных цистеинов, которые не препятствуют связыванию с антигеном (*смотри, например*, Junutula *et al.* (2008) *J. Immunol. Meth.* 332: 41-52).

Было показано, что подход PHESELECTOR является эффективным и специфическим, особенно по сравнению с традиционным конъюгированием с цистеином. Было показано, что оптимальные сайты для цистеина, обнаруженные с использованием, *например*, фрагмента антитела (*например*, Fab) и способа PHESELECTOR, можно также применять для полноразмерных антител, и данные указывают на то, что эти сайты хорошо подходят для сайт-специфического конъюгирования с другими mAb (*смотри, например*, Boswell *et al.* (2011) *Bioconjug. Chem.* 22: 1994-2004; Boswell *et al.* (2012) *Soc. Nuclear Med.* 53: 1454-1461; Shen *et al.* (2012) *Nat. Biotechnol.* 30:184-189).

Другая иллюстративная, но неограничивающая стратегия сайт-специфического конъюгирования нацелена на вставку аминокислот с биоортогональными реакционноспособными группами, такими как аминокислота селеноцистеин и неприродная аминокислота ацетилфенилаланин (pAcPhe). Разработано два способа применения этих аминокислот с использованием терминирующих кодонов. При этом в

одном способе селеноцистеин (Sec) встраивают путем спаривания опал-стоп-кодона, UGA, с последовательностью вставки Sec, а в другом способе встраивают ацетилфенилаланин у амбер-стоп-кодона, UAG, используя пару tRNA/аминоацил-tRNA-синтетаза. Селеноцистеин, используемый в первом способе, имеет высокое сходство с аминокислотой цистеином, но содержит атом селена вместо атома серы. Селенолатная группа является более реакционноспособным нуклеофилом, чем тиолатный контрпартнер, делая его подверженным конъюгации с электрофильными соединениями в условиях, в которых селеноцистеин селективно активируется. Существует около 25 известных селенсодержащих белков у млекопитающих, включая белки, такие как глутатионпероксидазы и тиоредуктазы (Kryukov *et al.* 92003) *Science*, 300: 1439-1443). В нормальных условиях UGA кодирует терминацию транскрипции; однако в присутствии последовательности вставки Sec (SECIS), расположенной в 3'-нетранслируемой области (3'-UTR) Sec-содержащих белков, терминация предотвращается образованием вторичной структуры мРНК, и Sec вставляется в кодон UGA (Caban and Copeland (2006) *Cell Mol. Life Sci.* 63: 73-81). Вставка Sec может быть встроена в гены, не кодирующие Sec, путем вставки кодона UGA и SECIS на 3' конце гена. Эту методику использовали, *inter alia*, для мечения Sec и последующего сайт-специфического конъюгирования mAbs (*смотри, например*, Hofer *et al.* (2009) *Biochem.* 48: 12047-12057).

В еще одном иллюстративном способе сайт-специфического конъюгирования используют неприродную аминокислоту, п-ацетилфенилаланин (pAcPhe). pAcPhe содержит кето-группу, которая может быть селективно конъюгирована с лекарственным средством, содержащим алкоксиамин, посредством лигирования оксима. Для встраивания pAcPhe в антитело, амбер-стоп-кодон подставляют в антитело в желательном положении. Затем кДНК антитела совместно экспрессируют с амбер супрессорной tRNA и надлежащим образом спаренной мутантной tRNA-синтетазой. tRNA-синтетаза нагружает pAcPhe на амбер-tRNA и, таким образом, pAcPhe встраивается в антитело в амбер-участке UAG (*смотри, например*, Liu *et al.* 92007) *Nat. Meth.* 4: 239-244; Wang *et al.* (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 56-61; Axup (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109: 16101-16116).

Дополнительно к pAcPhe другие неприродные аминокислоты применяют для сайт-специфического конъюгирования с использованием аналогичных процессов, включающих совместимость пар tRNA/аминоацил-tRNA-синтетаза (*смотри, например*, Young (2002) *J. Mol. Biol.* 395: 361-374; Kiick *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, ; 99: 19-24).

В различных вариантах осуществления для сайт-специфического конъюгирования можно использовать ферменты для катализирования образования связей. Например, в методе на основе гликотрансферазы используют мутантную гликотрансферазу для

присоединения химически активного сахарного фрагмента к участку гликозилирования на антителе. Подходящие молекулы затем могут быть конъюгированы с химической группой на сахарном фрагменте. В другом иллюстративном, но неограничивающем подходе трансглутаминазу используют для образования связи между аминогруппой на линкере/лекарственном средстве и сконструированным остатком глутамина на антителе.

Гликотрансферазы представляют собой большое семейство белков, которые принимают участие в синтезе олигосахаридов и отвечают за перенос сахарного остатка с активированного сахарного нуклеотида на сахарный акцептор или гликопротеин/липид. Структуры нескольких гликотрансфераз являются известными, и было обнаружено, что специфичность сахарного донора определяется несколькими аминокислотами в каталитическом кармане (Qasba *et al.* (2005) *Trends Biochem. Sci.* 30: 53-62). Используя это знание, остатки мутировали в кармане гликотрансферазы, *например*, B4Gal-T1 для расширения специфичности донора и возможности переноса химически реакционного сахарного остатка, 2-кето-Gal (*смотри, например*, Ramakrishnan *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 277: 20833-20839). Эта технология обеспечивает возможность переноса химически реакционного сахара на любой липид или белок, содержащий сайт гликозилирования. Антитела IgG человека содержат сайт N-гликозилирования по консервативному Asn-297 Fc-фрагмента. Гликаны, присоединенные к этому сайту, являются, как правило, сложными, но могут быть дегалактозилированы до G0, на которой мутантная гликотрансфераза способна переносить C2-кето-Gal с высокой эффективностью (*смотри, например*, Voeggeman *et al.* (2009) *Bioconjug. Chem.* 20: 1228-1236). Активная химическая группа C2-кето-Gal может быть затем соединена с биомолекулами, несущими ортогональную реакционноспособную группу. Этот подход успешно использовали для сайт-специфического конъюгирования анти-Her2 антитела, трастузумаба, с Alexa Fluor 488 аминоксиацетамидом и представляет эффективную методику для создания сайт-специфических ADC (*Id.*).

Вторая платформа использует трансглутаминазу для катализования образования ковалентной связи между свободной аминогруппой и боковой цепью глутамина. Трансглутаминаза из *Streptovorticillium mobaraense* (mTG) коммерчески доступна и широко применяется в качестве белкового сшивающего агента (*смотри, например*, Yokoуama *et al.* (2004) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64: 447-454). mTG не распознает ни один из природных глутаминовых остатков в Fc-области гликозилированных антител, но распознает «глутаминовую метку», которая может быть встроена в антитело (*смотри, например*, Jeger *et al.* (2010) *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 49: 9995-9997). В качестве иллюстрации, глутаминовую метку, LLQG, встраивали в различные участки в

константном домене антитела, нацеленного на рецептор эпидермального фактора роста. Затем mTG использовали для конъюгирования этих участков с флуорофорами или монометил-доластатином 10 (MMAD) и несколькими участками, которые, как было обнаружено, обладают хорошими биофизическими свойствами и высокой степенью конъюгирования. mTG также была способна к конъюгированию с глутаминовыми метками на анти-Her2 и анти-MIS1 антителах. Конъюгат анти-MIS1-vc-MMAD проявил высокую *in vitro* и *in vivo* активность, что дает основание предположить, что конъюгирование с использованием этого способа не изменяет связывание или аффинность антитела, и подтверждает полезность данного подхода к сайт-специфическому конъюгированию ADC (*смотри, например, Strop et al. (2013) Chem. Biol. 20: 161-167*).

Дополнительно к гликотрансферазам и транслугтаминазам для мечения белков использовали другие ферменты (Sunbul and Yin (2009) *Org. Biomol. Chem. 7: 3361-3371*). Один из таких ферментов, образующий формилглицин фермент, распознает последовательность CxPxR и окисляет цистеиновый остаток с образованием формилглицина, генерируя, таким образом, белок с альдегидной меткой. Альдегидная группа может быть затем конъюгирована с подходящей молекулой, *например*, через реакцию гидразино-Пикте-Шпенглера.

Известно множество других процедур и линкерных молекул для присоединения различных соединений, включая хелаты радионуклидных металлов, токсины и лекарственные средства, к белкам, таким как антитела (*смотри, например, европейскую заявку на патент 188256; патенты США 4671958, 4659839, 4414148, 4699784, 4680338; 4569789; и 4589071; и Borlinghaus et al. (1987) Cancer Res. 47: 4071-4075*). В частности, получение различных иммунотоксинов хорошо известно в данной области и описано, например, в "Monoclonal Antibody-Toxin Conjugates: Aiming the Magic Bullet," Thorpe *et al., Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine, Academic Press, pp. 168-190 (1982)*, Waldmann (1991) *Science, 252: 1657*, патентах США 4545985 и 4894443.

В некоторых случаях является желательным высвобождение эффектора от антитела, когда иммуноконъюгат доходит до участка-мишени. Соответственно, когда эффектор подлежит высвобождению в участке-мишени, могут быть использованы иммуноконъюгаты, содержащие связи, которые расщепляются вблизи участка-мишени. Расщепление связи для высвобождения агента из антитела может быть обусловлено активностью ферментов или условиями, воздействию которых подвергается иммуноконъюгат либо внутри клетки-мишени, либо вблизи участка-мишени. Когда участок-мишень представляет собой опухоль, может быть использован линкер, который

расщепляется в условиях, существующих в области опухоли (например, под воздействием ассоциированных с опухолью ферментов или кислого pH).

Специалистам известен ряд различных расщепляемых линкеров. Смотри патенты США 4618492; 4542225 и 4625014. Иллюстративные расщепляемые линкеры включают, но без ограничения, кислото-неустойчивые линкеры, расщепляемые протеазой линкеры, дисульфидные линкеры и т.п. Кислото-неустойчивые линкеры разработаны таким образом, что являются стабильными при уровнях pH, обнаруживаемых в крови, но становятся неустойчивыми и разлагаются в среде с низким pH в лизосомах. Расщепляемые протеазой линкеры также разработаны таким образом, что являются стабильными в крови/плазме, но быстро высвобождают свободное лекарственное средство внутри лизосом в раковых клетках при расщеплении лизосомальными ферментами. Они используют высокие уровни протеазной активности внутри лизосом и обычно включают пептидную последовательность, которая распознается и расщепляется этими протеазами, *например*, как это происходит с дипептидной связью Val-Cit, которая быстро гидролизуетсся катепсинами. Дисульфидные линкеры используют высокий уровень внутриклеточного восстановленного глутатиона для высвобождения свободного лекарственного средства внутри клетки.

Принимая во внимание большое количество способов, которые были описаны для присоединения ряда радиодиагностических соединений, радиотерапевтических соединений, лекарственных средств, токсинов и других агентов к антителам, специалист сможет определить подходящий способ для присоединения заданного агента к антителу или другому полипептиду.

Конъюгирование хелатов

В некоторых вариантах осуществления эффектор представляет собой хелат, который присоединен к антителу или эпитопной метке. Анти-CD46 антитело несет соответствующую эпитопную метку или антитело, в результате чего простое контактирование антитела с хелатом приводит к присоединению антитела к эффектору. Стадия объединения может быть выполнена до использования фрагмента (таргетная стратегия) или ткань-мишень может быть связана с антителом до доставки хелата. Способы получения хелатов, подходящих для связывания с различными нацеливающими фрагментами, хорошо известны специалистам в данной области (*смотри, например*, патенты США: 6190923, 6187285, 6183721, 6177562, 6159445, 6153775, 6149890, 6143276, 6143274, 6139819, 6132764, 6123923, 6123921, 6120768, 6120751, 6117412, 6106866, 6096290, 6093382, 6090800, 6090408, 6088613, 6077499, 6075010, 6071494, 6071490,

6060040, 6056939, 6051207, 6048979, 6045821, 6045775, 6030840, 6028066, 6022966, 6022523, 6022522, 6017522, 6015897, 6010682, 6010681, 6004533 и 6001329).

Получение белков слияния

Когда антитело и/или эффектор является относительно коротким (*например*, менее чем около 50 аминокислот), они могут быть синтезированы с использованием стандартных методов химического пептидного синтеза. Когда обе молекулы являются относительно короткими, химерная молекула может быть синтезирована в виде одиночного непрерывного полипептида. Альтернативно, нацеливающая молекула и молекула эффектора могут быть синтезированы отдельно, а затем слиты путем конденсации амино-конца одной молекулы с карбоксильным концом другой молекулы с образованием пептидной связи. Альтернативно, нацеливающая и эффекторная молекулы, каждая, могут быть конденсированы с одним концом молекулы пептидного спейсера с образованием непрерывного белка слияния.

Твердофазный синтез, в котором С-концевую аминокислоту последовательности присоединяют к нерастворимой подложке с последующим последовательным добавлением остальных аминокислот в последовательности, является предпочтительным способом химического синтеза полипептидов согласно настоящему изобретению. Методики твердофазного синтеза описаны Barany and Merrifield, *Solid-Phase Peptide Synthesis*; pp. 3-284 in *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology. Vol. 2: Special Methods in Peptide Synthesis, Part A.*, Merrifield, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 85: 2149-2156 (1963), и Stewart et al., *Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd ed.* Pierce Chem. Co., Rockford, Ill. (1984).

В некоторых вариантах осуществления химерные белки слияния согласно настоящему изобретению синтезированы с использованием методологии получения рекомбинантных ДНК. Как правило, указанная методология включает создание последовательности ДНК, которая кодирует белок слияния, помещение ДНК в экспрессионной кассете под контроль конкретного промотора, экспрессию белка в хозяине, выделение экспрессирующегося белка и, по необходимости, ренатурирование белка.

ДНК, кодирующая белки слияния согласно настоящему изобретению, может быть получена с помощью любого подходящего способа, например, клонирования и рестрикции соответствующих последовательностей или прямого химического синтеза с помощью способов, таких как способ фосфотриэфира, описанный Narang et al. (1979) *Meth. Enzymol.* 68: 90-99; способ фосфодиэфира, предложенный Brown et al. (1979) *Meth. Enzymol.* 68: 109-151; способ диэтилфосфорарамидата, предложенный Beaucage et al.

(1981) *Tetra. Lett.*, 22: 1859-1862; и способ твердой подложки, описанный в патенте США 4458066.

Химический синтез обеспечивает получение одноцепочечного олигонуклеотида. Он может быть превращен в двухцепочечную ДНК путем гибридизации с комплементарной последовательностью или путем полимеризации с ДНК-полимеразой с использованием одиночной цепи в качестве темплата. Специалисту будет понятно, что химический синтез ДНК ограничен последовательностями примерно 100 оснований, при этом более длинные последовательности могут быть получены путем лигирования более коротких последовательностей.

Альтернативно, в некоторых вариантах осуществления последовательности могут быть клонированы и подходящие последовательности расщеплены с использованием подходящих ферментов рестрикции. Фрагменты могут быть затем лигированы с получением желательной ДНК-последовательности.

В некоторых вариантах осуществления ДНК, кодирующая белки слияния согласно настоящему изобретению, может быть клонирована с использованием методов PCR-клонирования.

Несмотря на то, что в некоторых вариантах осуществления антитело и эффектор преимущественно соединены напрямую, специалисту следует учесть, что молекулы могут быть отделены спейсером, *например*, пептидным спейсером, состоящим из одной или нескольких аминокислот (*например*, (Gly₄Ser)₃, SEQ ID NO:80). Как правило, спейсер не будет обладать специфической биологической активностью, кроме соединения белков, или сохранения некоторой минимальной дистанции или других пространственных расположений между ними. Однако конститутивные аминокислоты спейсера могут быть выбраны для воздействия на отдельное свойство молекулы, такое как сворачивание, суммарный заряд или гидрофобность.

Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие белки слияния, могут быть экспрессированы в различных клетках-хозяевах, включая *E. coli*, другие бактериальные хозяева, дрожжи и различные клетки высших эукариот, такие как клеточные линии COS, СНО и HeLa, и клеточные линии миеломы. Ген рекомбинантного белка будет оперативно связан с соответствующими экспрессионными контрольными последовательностями для каждого хозяина.

Плазмиды согласно изобретению могут быть перенесены в выбранную клетку-хозяина с помощью хорошо известных способов, таких как трансформация с использованием хлорида кальция для *E. coli* и обработка фосфатом кальция или электропорация для клеток млекопитающего. Клетки, трансформированные плазмидами,

могут быть отобраны по устойчивости к антибиотикам, наделенной генами, содержащимися на плаزمиде, такими как гены *amp*, *gpt*, *neo* и *hyg*.

После экспрессии рекомбинантные белки слияния можно очищать в соответствии со стандартными процедурами, известными в данной области, включая осаждение сульфатом аммония, аффинную хроматографию, колоночную хроматографию, гель-электрофорез и т.п. (смотри, в основном, R. Scopes (1982) *Protein Purification*, Springer-Verlag, N.Y.; Deutscher (1990) *Methods in Enzymology Vol. 182: Guide to Protein Purification*, Academic Press, Inc. N.Y.). Для фармацевтических применений предпочтительными являются по существу чистые композиции, гомогенные по меньшей мере на около 90-95%, и наиболее предпочтительные гомогенные на 98-99% или более. После очистки, частичной или до требующейся степени гомогенности, по необходимости, полипептиды могут быть затем использованы терапевтически.

Специалисту в данной области должно быть очевидно, что после химического синтеза, биологической экспрессии или очистки конформация белка слияния может существенно отличаться от нативных присущих полипептидам конформаций. В этом случае часто необходимо денатурировать и восстанавливать полипептид и затем осуществлять повторную укладку полипептида с получением предпочтительной конформации. Методы восстановления и денатурации белков и индукции повторной укладки хорошо известны специалистам в данной области (смотри, например, Debinski *et al.* (1993) *J. Biol. Chem.*, 268: 14065-14070; Kreitman and Pastan (1993) *Bioconjug. Chem.*, 4: 581-585; и Buchner, *et al.* (1992) *Anal. Biochem.*, 205: 263-270).

Специалисту будет понятно, что могут быть сделаны модификации для белков слияния без ослабления их биологической активности. Некоторые модификации могут быть сделаны для содействия клонированию, экспрессии или встраиванию нацеливающей молекулы в белок слияния. Такие модификации хорошо известны специалистам в данной области и включают, например, метионин, добавленный на амино-конце для обеспечения сайта инициации, или дополнительные аминокислоты, помещенные на любом конце для создания удобно расположенных сайтов рестрикции или кодонов терминации.

Фармацевтические композиции

Анти-CD46 антитела, описанные здесь (например, YS5, YS5F, YS5vID, SB1HGNY, YS12, 3G7RY (aka 3G8), YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и/или UA8kappa), и/или их иммуноконъюгаты можно применять для парентерального, местного, перорального или локального введения (например, инъекции в участок опухоли), аэрозольного введения или трансдермального введения для профилактического, но главным образом для терапевтического лечения.

Фармацевтические композиции можно вводить в виде разнообразных стандартных лекарственных форм в зависимости от способа введения. Например, стандартные лекарственные формы, подходящие для перорального введения, включают порошок, таблетки, драже, капсулы и пастилки. Следует признать, что описанные здесь антитела и/или их иммуноконъюгаты, а также фармацевтические композиции, содержащие описанные здесь антитела и/или их иммуноконъюгаты, при пероральном введении предпочтительно защищены от разложения. Это может быть осуществлено с помощью ряда способов, известных специалистам в данной области, *например*, путем образования комплекса белка с композицией для наделения его устойчивостью к кислотному и ферментативному гидролизу или путем упаковки белка в подходящий устойчивый носитель, такой как липосома. Средства защиты белков от разложения хорошо известны в данной области.

В различных вариантах осуществления предлагается композиция, *например*, фармацевтическая композиция, содержащая одно анти-CD46 антитело или его антигенсвязывающую часть, или комбинацию анти-CD46 антител или их антигенсвязывающие части, или их иммуноконъюгаты, составленные вместе с фармацевтически приемлемым носителем.

Используемый здесь «фармацевтически приемлемый носитель» включает любой или все возможные растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и задерживающие абсорбцию агенты и т.п., которые являются физиологически совместимыми. Предпочтительно носитель является подходящим для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (*например*, путем инъекции или инфузии). В зависимости от способа введения активное соединение, *то есть* антитело, иммуноконъюгат может быть покрыт материалом для защиты соединения от действия кислот и других естественных условий, которые могут инактивировать соединение.

В некоторых вариантах осуществления антитело и/или иммуноконъюгат можно вводить в «нативной» форме или, по желанию, в форме солей, сложных эфиров, амидов, пролекарств, производных и т.п., при условии, что соль, сложный эфир, амид, пролекарство или производное является подходящим фармакологически, *то есть* эффективным в способе(ах) согласно настоящему изобретению. Соли, сложные эфиры, амиды, пролекарства и другие производные активных агентов могут быть получены с использованием стандартных процедур, известных специалистам в области синтетической органической химии, описанных, например, March (1992) *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure*, 4th Ed. N.Y. Wiley-Interscience, и как описано выше.

В качестве иллюстрации, фармацевтически приемлемая соль может быть получена для любого из антител и/или иммуноконъюгатов, описанных здесь, имеющих функциональную группу, способную образовывать соль. Фармацевтически приемлемой солью может быть любая соль, которая сохраняет активность исходного соединения и не оказывает отрицательного или неблагоприятного эффекта на субъект, которому ее вводят, и в условиях, в которой ее вводят.

В различных вариантах осуществления фармацевтически приемлемые соли могут быть получены из органических или неорганических оснований. Соль может представлять собой моно- или поливалентный ион. Особый интерес представляют неорганические ионы лития, натрия, калия, кальция и магния. Органические соли могут быть получены с аминами, в частности, аммонийные соли, такие как моно-, ди- и триалкиламины или этаноламины. Такие соли могут быть также образованы с кофеином, трометамином и подобными молекулами.

Способы изготовления фармацевтически активных агентов в виде солей, сложных эфиров, амидов, пролекарств и т.п. хорошо известны специалистам в данной области. Например, соли могут быть получены из свободного основания с использованием общепринятой методики, которая обычно включает взаимодействие с подходящей кислотой. В целом, лекарственное средство в форме основания растворяют в полярном органическом растворителе, таком как метанол или этанол, и добавляют кислоту. Полученная соль осаждается или может быть выведена из раствора добавлением менее полярного растворителя. Подходящие кислоты для получения кислотно-аддитивных солей включают, но без ограничения, органические кислоты, *например*, уксусную кислоту, пропионовую кислоту, гликолевую кислоту, пировиноградную кислоту, щавелевую кислоту, яблочную кислоту, малоновую кислоту, янтарную кислоту, малеиновую кислоту, фумаровую кислоту, винную кислоту, лимонную кислоту, бензойную кислоту, коричную кислоту, миндальную кислоту, метансульфоновую кислоту, этансульфоновую кислоту, п-толуолсульфоновую кислоту, салициловую кислоту и т.п., а также неорганические кислоты, *например*, соляную кислоту, бромистоводородную кислоту, серную кислоту, азотную кислоту, фосфорную кислоту и т.п. Кислотно-аддитивная соль может быть повторно превращена в свободное основание обработкой подходящим основанием. Некоторые особенно предпочтительные кислотно-аддитивные соли активных агентов в настоящем документе включают галогениды, полученные с использованием соляной или бромистоводородной кислоты. В свою очередь, получение основных солей активных агентов согласно настоящему изобретению выполняют аналогичным способом с использованием фармацевтически приемлемого основания, такого как гидроксид натрия,

гидроксид калия, гидроксид аммония, гидроксид кальция, триметиламин или т.п. Особенно предпочтительные основные соли включают соли щелочных металлов, например, соль натрия и соли меди.

Для получения солевых форм основных лекарственных средств предпочтительно, чтобы значение pK_a противоиона было по меньшей мере на 2 единицы pH ниже, чем значение pK_a лекарственного средства. Аналогичным образом, для получения солевых форм кислотных лекарственных средств предпочтительно, чтобы значение pK_a противоиона было по меньшей мере на 2 единицы pH выше, чем pK_a лекарственного средства. Это приводит к тому, что за счет противоиона снижается значение pH раствора до значения ниже pH_{max} с достижением плато концентрации соли, при которой растворимость соли лучше растворимости свободной кислоты или основания. Общее правило подразумевает, что разница в единицах pK_a для ионизируемой группы активного фармацевтического ингредиента (API) и кислоты или основания становится такой, чтобы сделать протонный перенос энергетически благоприятным. Когда pK_a API и противоиона различаются незначительно, может образоваться твердый комплекс, но быстро диспропорционировать (то есть распадаться на отдельные молекулы лекарственного средства и противоиона) в водной среде.

Предпочтительно, противоион представляет собой фармацевтически приемлемый противоион. Подходящие анионные соли включают, но без ограничения, ацетат, бензоат, бензилат, битартрат, бромид, карбонат, хлорид, цитрат, эдетат, эдисилат, эстолат, фумарат, глюцептат, глюконат, гидробромид, гидрохлорид, иодид, лактат, лактобионат, малат, малеат, манделат, мезилат, метилбромид, метилсульфат, мукат, напсилат, нитрат, памоат (эмбонат), фосфат и дифосфат, салицилат и дисалицилат, стеарат, сукцинат, сульфат, тартрат, тозилат, триэтиодид, валерат и т.п., при этом подходящие катионные соли включают, но без ограничения, алюминий, бензатин, кальций, этилендиамин, лизин, магний, меглумин, калий, прокаин, натрий, трометамин, цинк и т.п.

Получение сложных эфиров обычно включает функционализацию гидроксильных и/или карбоксильных групп, которые присутствуют в молекулярной структуре антитела и/или иммуноконъюгата. В некоторых вариантах осуществления сложные эфиры обычно представляют собой ацилзамещенные производные свободных спиртовых групп, *то есть* фрагменты, которые получены из карбоновых кислот формулы $RCOOH$, где R обозначает алкил и предпочтительно низший алкил. Сложные эфиры могут быть опять превращены в свободные кислоты, по необходимости, с использованием общепринятых процедур гидрогенолиза или гидролиза.

Амиды могут быть также получены с использованием методик, известных специалистам в данной области или описанных в относящейся к этому вопросу литературе. Например, амиды могут быть получены из сложных эфиров с использованием подходящих аминовых реагентов, или из ангидрида или хлорангидрида путем взаимодействия с аммиаком или низшим алкиламином.

Фармацевтические композиции, содержащие антитела и/или иммуноконъюгаты, описанные здесь, можно вводить отдельно или в виде комбинированной терапии, *то есть* в комбинации с другими агентами. Например, комбинированная терапия может включать антитело или иммуноконъюгат по меньшей мере с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами, такими как агенты против рака, описанные ниже. Фармацевтические композиции можно также вводить в сочетании с радиационной терапией и/или хирургией.

Композиции, содержащие антитела и/или иммуноконъюгаты, описанные здесь, можно вводить различными способами, известными в данной области. Как будет понятно специалистам в данной области, путь и/или способ введения будет различаться в зависимости от желаемых результатов. Активные соединения могут быть составлены с носителями, которые будут защищать соединение от быстрого высвобождения, то есть возможны лекарственные составы с контролируемым высвобождением активного вещества, включая имплантаты, трансдермальные пластыри и микроинкапсулированные системы доставки. Можно использовать биоразлагаемые биологически совместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, сложные полиортоэфир и полимолочная кислота. Многие способы изготовления лекарственных составов запатентованы или в целом известны специалистам в данной области (*смотри, например, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978).

В некоторых вариантах осуществления введению анти-CD46 антитела или иммуноконъюгата может способствовать покрытие композиции антитела или иммуноконъюгата, или совместное введение антитела или иммуноконъюгата с материалом, который будет предупреждать его инактивацию. Например, соединение можно вводить субъекту в подходящем носителе, например, липосомах или разбавителе. Фармацевтически приемлемые разбавители включают, но без ограничения, солевой раствор и водные буферные растворы. Липосомы включают, но без ограничения, эмульсии CGF типа «вода в масле в воде», а также общепринятые липосомы (Strejan *et al.* (1984) *J. Neuroimmunol*, 7: 27).

Фармацевтически приемлемые носители включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для экстенпорального приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Применение такой среды или агентов для фармацевтически активных веществ известно в данной области. Рассматривается применение любой общепринятой среды или агента в фармацевтических композициях, за исключением случаев их несовместимости с активным соединением. Также, в композиции могут быть включены вспомогательные активные соединения.

В различных вариантах осуществления терапевтические композиции являются, как правило, стерильными и стабильными в условиях изготовления и хранения. Композиция(и) может быть составлена в виде раствора, микроэмульсии, в липиде или липосоме, или другой упорядоченной структуры, подходящей для содержания высокой концентрации(й) лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), и их подходящие смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, используя покрытие, такое как лецитиновое покрытие, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и использования поверхностно-активных веществ. Во многих случаях будет предпочтительно включение изотонических агентов, например, сахаров, полиспиртов, таких как маннитол, сорбитол или хлорид натрия в композицию. Пролонгированная абсорбция композиций для инъекций может быть достигнута включением в композицию агента, который задерживает абсорбцию, например, солей моностеарата и желатина.

Стерильные инъекционные растворы можно приготовить включением активного соединения (*например*, антител и/или иммуноконъюгатов, описанных здесь) в необходимом количестве в соответствующий растворитель с одним ингредиентом или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, при необходимости, с последующей стерилизацией микрофильтрованием. Как правило, дисперсии готовят включением активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду, и затем включением других необходимых ингредиентов из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для последующего получения стерильных инъекционных растворов, иллюстративными способами приготовления являются вакуумная сушка и сушка замораживанием (лиофилизация), которая обеспечивает порошок активного ингредиента плюс любой другой дополнительный желательный ингредиент из его предварительно стерилизованного фильтрованием раствора.

Режимы дозирования можно регулировать для получения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического ответа). Например, можно вводить одну дозу болюсом, можно вводить несколько дробных доз в течение периода времени или дозу можно пропорционально снижать или повышать в зависимости от терапевтической ситуации. Например, в некоторых вариантах осуществления антитела и/или иммуноконъюгаты, описанные здесь, можно вводить один или два раза в сутки, или один или два раза в неделю, или один или два раза в месяц путем подкожной инъекции.

Особенно предпочтительно составление парентеральных композиций в виде стандартной лекарственной формы для простоты введения и однообразия дозировки. Используемая здесь стандартная лекарственная форма относится к физически дискретным единицам, пригодным в качестве единичных доз субъектов, получающих лечение. Каждая единица содержит определенное количество активного соединения, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта, в сочетании с требуемым фармацевтическим носителем. Характеристики стандартных лекарственных форм продиктованы и напрямую зависят от (а) уникальных характеристик активного соединения и конкретного терапевтического эффекта, который предполагается достигнуть, и (б) ограничений, свойственных способу составления такого активного соединения для лечения индивидуумов.

В некоторых вариантах осуществления композиция содержит фармацевтически приемлемый антиоксидант. Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов включают: (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, цистеина гидрохлорид, бисульфат натрия, натрия метабисульфит, сульфит натрия и т.п.; (2) растворимые в масле антиоксиданты, такие как аскорбила палмитат, бутилированный гидроксианизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и т.п.; и (3) металл-хелатирующие агенты, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и т.п.

В плане терапевтических композиций составы описанных здесь антител и/или иммуноконъюгатов включают композиции, подходящие для перорального, назального, наружного (в том числе буккального и сублингвального), ректального, вагинального и/или парентерального введения. Составы могут быть удобным образом представлены в виде стандартной лекарственной формы и могут быть изготовлены любыми способами, известными в области фармацевтики. Количество активного ингредиента, которое может быть смешано с материалом носителя для стандартной лекарственной формы, будет изменяться в зависимости от субъекта, получающего лечение, и конкретного способа

введения. Количество активного ингредиента, которое может быть смешано с материалом носителя для получения стандартной лекарственной формы, будет, как правило, представлять собой такое количество композиции, которое обеспечивает терапевтический эффект. Как правило, из расчета на сто процентов, данное количество будет находиться в интервале примерно от 0,001% до 90% активного ингредиента, предпочтительно в диапазоне примерно от 0,005% до 70%, наиболее предпочтительно в диапазоне примерно от 0,01% до 30%.

Составы антител и/или иммуноконъюгатов, описанных здесь, которые являются подходящими для вагинального введения, также включают пессарии, тампоны, кремы, гели, пасты, пены или составы в виде спрея, содержащие носители, которые, как известно в данной области, являются подходящими. Дозированные формы для местного или трансдермального введения антител и/или иммуноконъюгатов, описанных здесь, включают порошки, спреи, мази, пасты, кремы, лосьоны, гели, растворы, пластыри и ингаляторы. В некоторых вариантах осуществления активное соединение можно смешивать в стерильных условиях с фармацевтически приемлемым носителем и с любыми консервантами, буферами или пропеллантами, которые могут потребоваться.

Используемые здесь выражения «парентеральное введение» и «вводят парентерально» означают способы введения, отличные от энтерального и наружного введения, обычно путем инъекции, и включают без ограничения внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, внутриоболочечную, интракапсулярную, внутриглазничную, внутрисердечную, интрадермальную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субэпидермальную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интрастернальную инъекцию и инфузию.

Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые можно применять в фармацевтических композициях, содержащих описанные здесь антитела и/или иммуноконъюгаты, включают, но без ограничения, воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и пригодные для инъекции органические сложные эфиры, такие как этилолеат и т.п. Надлежащая текучесть может поддерживаться, например, использованием создающих оболочку материалов, таких как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсий, и использованием поверхностно-активных веществ.

В различных вариантах осуществления данные композиции могут также содержать адьюванты, такие как консерванты, увлажняющие агенты, эмульгирующие агенты и

диспергирующие агенты. Конкретные примеры адъювантов, хорошо известных в данной области, включают, например, неорганические адъюванты (такие как соли алюминия, *например*, фосфат алюминия и гидроксид алюминия), органические адъюванты (*например*, сквален), адъюванты на масляной основе, виросомы (*например*, виросомы, которые содержат мембраносвязанный гемагглютинин и нейраминидазу вируса гриппа).

Предупреждение появления микроорганизмов в составах может обеспечиваться процедурами стерилизации и/или введением различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, парабена, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты и т.п. Может быть желательным также включение в композиции изотонических агентов, таких как сахара, хлорид натрия и т.п. Кроме того, пролонгированная абсорбция инъекционной фармацевтической формы может быть достигнута за счет введения агентов, которые замедляют абсорбцию, таких как моностеарат алюминия и желатин.

При применении описанных здесь антител и/или иммуноконъюгатов в качестве фармацевтических препаратов у человека и животных, они могут вводиться отдельно или в виде фармацевтической композиции, содержащей, например, от 0,001 до 90% (более предпочтительно от 0,005 до 70%, например, от 0,01 до 30%) активного ингредиента в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем.

Независимо от выбранного способа введения, описанные здесь антитела и/или иммуноконъюгаты можно применять в подходящей гидратированной форме, и/или фармацевтические композиции готовят в виде фармацевтически приемлемых лекарственных форм традиционными способами, известными специалистам в данной области.

Фактические уровни доз активных ингредиентов (например, антител и/или иммуноконъюгатов, описанных здесь) в фармацевтических композициях согласно настоящему изобретению могут изменяться таким образом, чтобы получить количество активного ингредиента, которое является эффективным для достижения желаемого терапевтического ответа для конкретного пациента, конкретной композиции и конкретного способа введения без проявления токсичности у данного пациента. Выбранный уровень дозы будет зависеть от различных фармакокинетических факторов, включая активность конкретных используемых композиций согласно настоящему изобретению или их сложного эфира, соли или амида, способ введения, время введения, скорость выведения конкретного используемого соединения, продолжительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, используемые в комбинации с конкретными применяемыми композициями, возраст, пол, массу, патологическое состояние, общее состояние здоровья и предыдущую историю болезни

пациента, подлежащего лечению, и подобные факторы, хорошо известные в области медицины. Обычный врач или ветеринар может легко определить и прописать эффективное количество необходимой фармацевтической композиции. Например, врачу или ветеринару следует начинать с более низких доз соединений согласно изобретению, используемых в фармацевтической композиции, чем дозы, требующиеся для достижения желаемого терапевтического эффекта, и постепенно повышать дозировку до получения желаемого эффекта. Как правило, подходящая дневная доза антител и/или иммуноконъюгатов, описанных здесь, будет представлена таким количеством соединения, которое является самой низкой дозой, эффективной для получения терапевтического эффекта. Данная эффективная доза будет в основном зависеть от вышеописанных факторов. В некоторых вариантах осуществления предпочтительным является внутривенное, внутримышечное, внутрибрюшинное или подкожное введение, предпочтительно осуществляемое около области мишени. Если желательно, эффективная дневная доза терапевтической композиции может вводиться в виде единой дозы или в виде двух, трех, четырех, пяти, шести или более субдоз, которые вводят отдельно через надлежащие интервалы в течение дня, необязательно в стандартных лекарственных формах. Хотя описанные здесь антитела и/или иммуноконъюгаты можно вводить отдельно, как правило, предпочтительным является введение соединения(й) в виде фармацевтического состава (композиции).

В некоторых вариантах осуществления терапевтические композиции можно вводить с помощью медицинских устройств, известных в данной области. Например, в иллюстративном варианте осуществления антитела и/или иммуноконъюгаты, описанные здесь, можно вводить с помощью безыгольного гиподермического инъекционного устройства, такого как устройства, описанные в патентах США 5399163, 5383851, 5312335, 5064413, 4941880, 4790824 или 4596556. Примеры хорошо известных имплантатов и модулей, используемых в данном изобретении, включают, например: патент США 4487603, в котором описан имплантируемый насос для микровливаний с целью введения лекарственного средства с контролируемой скоростью; патент США 4486194, в котором описано терапевтическое устройство для введения лекарственных средств через кожу; патент США 4447233, в котором описан насос для вливания лекарственного средства с целью его доставки при точной скорости вливания; патент США 4447224, в котором описано имплантируемое устройство для вливаний с изменяющимся потоком для непрерывного введения лекарственного средства; патенте США 4439106, в котором описана осмотическая система для доставки лекарственного средства с многокамерными отделениями, и патент США 4475196, в котором описана

осмотическая система для доставки лекарственного средства. Специалистам в данной области хорошо известно много других подобных имплантатов, систем для доставки и модулей.

В некоторых вариантах осуществления анти-CD46 антитела и/или иммуноконъюгаты, описанные здесь, могут быть составлены так, чтобы обеспечить надлежащую локализацию *in vivo*. Например, гематоэнцефалический барьер (BBB) исключает многие соединения с высокой гидрофильностью. Чтобы обеспечить прохождение терапевтических соединений согласно изобретению через BBB (если это желательно), они могут быть приготовлены, например, в липосомах. Способы изготовления липосом смотри, например, в патентах США 4522811; 5374548; и 5399331. Липосомы могут содержать один или более фрагментов, которые избирательно транспортируются в специфические клетки или органы, таким образом, увеличивая направленную доставку лекарственного средства (смотри, *например*, Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29: 685). Иллюстративные нацеливающие фрагменты включают, но без ограничения, фолат или биотин (смотри, *например*, патент США 5416016); маннозиды (Umezawa *et al.*, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153: 1038); антитела (Bloeman *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 357:140; Owais *et al.* (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); рецептор поверхностно-активного белка А (Briscoe *et al.* (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134).

Наборы

В случае, когда используют радиоактивный или другой эффектор в качестве диагностического и/или терапевтического агента, часто невозможно предоставить пользователю готовую к использованию композицию по причине короткого срока хранения радиоактивно меченого соединения и/или короткого периода полураспада используемого радионуклида. В таких случаях пользователь может осуществить реакцию мечения радионуклидом в клинической больнице, кабинете терапевта или лаборатории. С этой или другими целями различные ингредиенты реакции могут быть предложены пользователю в форме так называемого «набора». Набор предпочтительно разработан таким образом, что манипуляции, необходимые для выполнения требуемой реакции, должны быть настолько это возможно простыми, чтобы пользователь смог приготовить из набора желаемую композицию, используя средства, находящиеся в его распоряжении. Таким образом, изобретение также относится к набору для приготовления композиции в соответствии с данным изобретением.

В некоторых вариантах осуществления такой набор содержит одно или несколько описанных здесь антител или иммуноконъюгатов. При необходимости могут быть обеспечены антитела или иммуноконъюгаты с добавленным инертным фармацевтически

приемлемым носителем и/или препаратобразующими агентами и/или адъювантами. Кроме того, набор может необязательно включать раствор соли или хелата подходящего радионуклида (или другого активного агента), и (iii) инструкции по применению с рекомендациями по введению и/или взаимодействию ингредиентов, содержащихся в наборе.

Набор, поставляемый пользователю, может также содержать ингредиент(ы), указанные выше, вместе с инструкциями по применению, при этом раствор соли или хелата радионуклида, указанный в пункте (iii) выше, имеющий ограниченный срок хранения, может предоставляться пользователю отдельно.

Набор необязательно может дополнительно содержать восстанавливающий агент и/или при необходимости хелатор, и/или инструкции по применению композиции, и/или предписание по взаимодействию ингредиентов набора с образованием желаемого продукта(ов). При необходимости ингредиенты набора могут быть объединены при условии их совместимости.

В некоторых вариантах осуществления иммуноконъюгат может быть легко получен путем смешивания компонентов в нейтральной среде и индукции их взаимодействия. Для этой цели эффектор может быть презентируем антителу, например, в форме хелата.

Когда составляющий набор компонент(ы) применяют в качестве компонента(ов) для фармацевтического введения (*например*, в виде инъекционной жидкости), он является предпочтительно стерильным. Когда составляющий компонент(ы) присутствует в сухом состоянии, пользователь предпочтительно использует в качестве растворителя стерильный физиологический солевой раствор. При желании составляющий набор компонент(ы) можно стабилизировать общепринятым способом с помощью подходящих стабилизаторов, например, аскорбиновой кислоты, гентизиновой кислоты или солей этих кислот, или он может содержать другие вспомогательные агенты, например, наполнители, такие как глюкоза, лактоза, маннитол и т.п.

Хотя инструкции, в случае, когда они присутствуют, обычно представлены в виде написанных или напечатанных материалов, указанные инструкции ими не ограничиваются. В настоящем изобретении предусматривается любой носитель, который может хранить такие инструкции и передавать содержащуюся в них информацию конечному пользователю. Такой носитель включает, но без ограничения, электронный носитель информации (*например*, магнитные диски, кассеты, картриджи, чипы), оптический носитель (*например*, CD ROM) и т.п. Такая среда может включать адреса сайтов Интернета, которые представляют данные инструкционные материалы.

ПРИМЕРЫ

Следующие примеры предлагаются для иллюстрации, но не ограничения заявленного изобретения.

Пример 1

Новые анти-CD46 антитела и их применение

Для идентификации новых антител против человеческого CD46 создавали рекомбинантные Fc-белки слияния, состоящие из Sushi-доменов 1 и 2 человеческого CD46. Поскольку элементы комплемента связываются преимущественно с доменами 3 и 4, выбор доменов 1 и 2 сводит к минимуму селекцию антител, которые могут значительно препятствовать нормальной функции комплемента. Данное слияние CD46-Fc получали и очищали из трансфицированных клеток НЕК293 с помощью аффинной хроматографии на белке А. Для селекции человеческого антитела создавали библиотеку фагмидного дисплея, состоящую из 5×10^9 членов, используя объединенные в пул кДНК из мононуклеарных клеток периферической крови от 426 здоровых доноров-людей, и библиотеку подвергали селекции против рекомбинантного белка слияния CD46-Fc. После трех циклов селекции связывающиеся фагмиды подвергали скринингу с помощью FACS и секвенировали. Параллельно использовали альтернативную стратегию, которая включает сначала селекцию библиотеки на живых опухолевых клетках с последующим переносом полученного в цикле 1 селекции фагмид в вектор дрожжевого дисплея и затем селекции с помощью FACS с использованием лигандов с низкой концентрацией для обогащения высокоаффинных связывающих агентов рекомбинантным белком слияния CD46-Fc. Полученные антитела связываются с высокой аффинностью как с живыми опухолевыми клетками, так и рекомбинантным человеческим белком CD46. Все связывающиеся клоны секвенировали и уникальные последовательности представлены в таблице 1.

scFvs превращали в полные человеческие IgG1 и аффинности связывания измеряли на живых опухолевых клетках. Данные FACS по связыванию аппроксимировали для получения величин KD (фигура 2 для YS5 на Du-145, и фигура 3 для YS12 на Du-145). Значения аффинности находились в диапазоне от низко- до субнанолярных (нМ) значений для исследуемых антител.

Дополнительно к человеческому CD46, антитела, описанные здесь, связываются с CD46 макак-крабоедов (фигура 4) со схожими аффинностями (фигура 5 для YS5 на CHO-huCD46 и фигура 6 YS5 на CHO-synoCD46), идентифицируя, таким образом, подходящие виды для нормативных токсикологических исследований.

Все из анти-CD46 антител, вместе с ранее идентифицированными UA20 и 2B10, связываются с Sushi-доменами 1 и 2 CD46. Эту область дополнительно анализировали для выявления различий между эпитопами. Сначала выполняли эксперименты по конкурентному связыванию на основе FACS на живых опухолевых клетках и обнаружили, что антитела согласно изобретению либо конкурируют, либо не конкурируют с UA20-Fc: группа 1 состоит из YS5 и других, и группа 1 состоит из SB1HGNY (фигура 7). Для антител в группе 1 наблюдаются дополнительные различия между эпитопами, о чем свидетельствует селективный эффект связывания антитела с различными мутантами CD46 (таблица 3). Например, антитело YS5 отличается от других антител, так как мутация в положении 39 единственным образом влияет на его связывание (таблица 3), на основании чего можно предположить, что положение 39, наряду с положением 40, которое влияет на связывание для всех антител, является частью эпитопа для связывания YS5 с CD46.

Таблица 3. Снимок аланина выявляет различия в эпитопах. Указаны изменения остатка CD46 (верхний ряд, E13A, положение 13, изменение с E на A, и т.д.). Связывание с клетками CHO, трансфицированными различными мутантными конструкциями, количественно оценивали с помощью FACS со значениями средней интенсивности флуоресценции (MFI), нормализованными против клеток дикого типа, трансфицированных CD46. Значительная утрата связывания обозначена затемнением серого цвета. R40A снижал связывание для всех антител, что указывает на то, что положение 40 является важным участком контакта для всех антител. D39A единственным образом влияет на связывание с YS5, что указывает на то, что положение 39 является единственным участком контакта, который способствует связыванию с YS5 (и YS6), но не с другими антителами, указанными в таблице. YS6 отличается от YS5, так как на него селективно влияет мутация в положении 31 (P31A).

	E13A	E16A	P31A	T36A	D39A	R40A
YS5	120	124	111	104	76	56
YS12	96	157	89	88	121	77
UA20FC	133	123	113	136	120	73
3G8	212	132	117	83	129	70
YS6	90	96	57	111	81	65
2B10	81	113	86	104	107	76

Все антитела конкурируют с белком вируса кори Н лабораторного штамма (Эдмонстона). Вирус кори проникает в клетки-мишени путем макропиноцитоза (Crimeen-Irwin *et al.* (2003) *J. Biol. Chem.* 278: 46927-46937). Белок Н отвечает за связывание и сшивание с белком CD46 на клеточной поверхности, который требуется для проникновения вируса (*Id.*). Для определения, конкурируют ли антитела согласно

изобретению с белком Н за связывание с CD46, создавали слияние рекомбинантный белок Н-Fc и тестировали с помощью FACS на конкуренцию с анти-CD46 антителами. Было обнаружено, что подтвержденные тестированию антитела конкурируют с белком Н (фигура 8), на основании чего можно сделать предположение о перекрывании участков связывания.

Так как вирус кори проникает в клетки-мишени посредством макропиноцитоза, далее определяли, интернализуются ли также анти-CD46 натителя опухолевыми клетками посредством макропиноцитоза. Используя декстран нейтральной плотности 70 кДа (ND70) в качестве индикатора макропиноцитоза (Ha *et al.* (2014) *Mol. Cell Proteomics*. 13(12): 3320-3331), было обнаружено, что анти-CD46 антитела без сомнения интернализуются путем макропиноцитоза (фигура 9). Макропиноцитоз по своей природе является опухоль-селективными (Commisso *et al.* (2013) *Nature*, 497: 633-637; Ha *et al.* (2014) *Mol. Cell Proteomics*. 13(12): 3320-3331; Reyes-Reyes *et al.* (2010) *Cancer Res.* 70: 8617-8629), наделяя тем самым анти-CD46 антитела дополнительной селективностью в отношении опухолевых клеток.

Для подтверждения того, что CD46 является мишенью для разработки таргетных лекарственных средств, тканевую специфичность эпитопа CD46 определяли путем иммуногистохимии. Сначала исследовали экспрессию эпитопа CD46 в опухолях. Иммуногистохимические исследования выполняли как на замороженных, так и фиксированных в формалине, заключенных в парафин (FFPE) тканях рака предстательной железы. На замороженных тканях 18 случаев из 18 (100%) показали сильные сигналы окрашивания, что указывает на сверхэкспрессию во всех случаях. На FFPE-тканях сильное окрашивание CD46 было обнаружено в 63 случаях из 87, умеренное окрашивание в 23 случаях из 87, и слабое окрашивание в 1 случае из 87, подтверждая вывод о том, что CD46 сверхэкспрессируется подавляющим большинством опухолей предстательной железы. Сводные результаты иммуногистохимического анализа показаны в таблице 4 и на фигуре 10.

Таблица 4. Результаты иммуногистохимического анализа экспрессии CD46 в тканях рака предстательной железы. Показаны положительные случаи в сравнении с общим числом случаев. FFPE: фиксированные в формалине, заключенные в парафин (ткани). Бiotин-меченые антитела против человеческого CD46.

Тип ткани	Сильное	Умеренное	Слабое	Отрицательное
Замороженные	18/18	0	0	0
FFPE	63/87	23/87	1/87	0

Указанные выше исследования всецело поддерживают разработку лекарственных средств против рака у человека на основе нацеленных на CD46 моноклональных антител. В этом отношении конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) разрабатывали с использованием панели новых анти-CD46 антител. Монометил ауристатин F (MMAF) конъюгировали посредством линкера MC-vc-PAB (McDonagh *et al.* (2008) *Mol. Canc. Therap.* 7: 2913-2923; Sutherland *et al.* (2006) *J. Biol. Chem.* 281: 10540-10547) с YS5 IgG1. Путем хроматографии с гидрофобным взаимодействием (HIC) было определено, что в среднем около 3 лекарственных средств было конъюгировано на молекулу антитела (фигура 11). Опухоль-уничтожающие активности *in vitro* затем тестировали с использованием панели клеточных линий метастатического кастрационно-резистентного рака предстательной железы (LNCaP-C4-2B и Du145). Эффективное уничтожение опухолевых клеток наблюдалось со значениями EC50 в диапазоне от низких до субнанолярных (нМ) (фигуры 12 и 13).

Противоопухолевую активность *in vivo* анти-CD46 ADC тестировали с использованием подкожной модели ксенотрансплантата LNCaP-C4-2B. Наблюдалось сильное ингибирование роста опухоли и выживаемость, при этом объем опухоли уменьшался до недетектируемых уровней после 5 доз при 5 мг/кг (фигура 14). Отсутствовало повторное возникновение опухоли в течение указанного периода после инъекции ADC (фигура 14).

Дополнительно к раку предстательной железы было обнаружено, что анти-CD46 ADC активно уничтожают различные другие виды опухолей, которые экспрессируют CD46. Например, было обнаружено, что дополнительно к раку предстательной железы CD46 также высоко экспрессируется на клеточной поверхности множественной миеломы (фигура 15). Кроме того, анти-CD46 ADC эффективно уничтожает линию клеток множественной миеломы RPMI8226 (фигура 16) со значением EC50 в субнанолярном (нМ) диапазоне. В заключение, было показано, что анти-CD46 ADC значительно уменьшает нагрузку множественной миеломы *in vivo*. Экспрессирующую репортерную линию (RPMI8226-Luc, которая экспрессирует ген люциферазы светлячка) инъецировали через хвостовую вену мышам с ослабленным иммунитетом и оставляли для установления диссеминированных опухолевых клеток в костях и суставах. Затем инъецировали четыре дозы анти-CD46 ADC при 5 мг/кг (каждые 4 дня) и статус опухоли наблюдали путем биолюминесценции. Было обнаружено, что анти-CD46 ADC были высокоэффективными в отношении снижения массы опухоли *in vivo* (фигура 17). Данные по выживаемости, полученные после лечения ADC (фигура 18), показали «излечение» 60% подвергнутых

лечению мышей и значительно задерживали смертельный исход остальных 40% на протяжении всего эксперимента.

Для расширения применения анти-CD46 ADC проводили исследование с использованием второй клеточной линии – клеточной линии множественной миеломы MM1.S, экспрессирующей репортер люциферазу. Высокую активность анти-CD46 ADC в отношении уничтожения опухолей наблюдали *in vivo*. Четыре дозы при 4 мг/кг полностью устранили опухолевые клетки MM1.S (фигура 20 **Error! Reference source not found.**). Напротив, контрольный ADC (MMAF, конъюгированный с несвязывающим антителом) не обладал никаким эффектом при этой же дозе и частоте дозирования. Более того, даже однократная доза анти-CD46 ADC при 4 мг/кг значительно уменьшала массу опухоли, вызывая значительное ингибирование развития опухоли (фигура 20). Четыре дозы анти-CD46 ADC при 0,8 мг/кг также вызвали длительное ингибирование развития ксенотрансплантата MM1.S (фигура 20). В заключение, даже голое антитело (YS5 IgG1) вызывало значительное ингибирование опухоли в этой модели ксенотрансплантата (фигура 20), поэтому может быть предположена интересная возможность потенциальной терапии на основе голых антител для определенных подтипов множественной миеломы.

Выполняли анализ Каплана-Мейера для определения выживаемости после лечения. Группы, подвергнутые лечению CD46 ADC, показали более высокую выживаемость по сравнению с контрольными группами (фигура 21). Все мыши, которые получали 4 дозы по 4 мг/кг CD46 ADC, выжили до конца эксперимента (день 212).

Помимо указанного выше рака предстательной железы и множественной миеломы, было обнаружено, что CD46 высоко экспрессируется в широкой панели раковых линий клеток, включая, но без ограничения, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, мезотелиому, рак легких, рак молочной железы, рак яичника, рак мочевого пузыря, рак печени, глиому и нейробластому. Более того, анти-CD46 ADC эффективно уничтожают эти клетки *in vitro*. Например, анти-CD46 ADC являются высокоэффективными в отношении уничтожения клеток колоректального рака (фигура 19 для YS5, фигура 22 для YS12 на HT29, и фигура 23 для SB1HGNY на HT29), клеток рака поджелудочной железы (фигура 24), клеток мезотелиомы (фигура 25) и клеток рака яичников (фигура 26).

Для оценки потенциальной токсичности YS5 ADC тестировали на панели контрольных клеток, которые не экспрессируют CD46 (BPH-1) или экспрессируют его на умеренных уровнях (*например*, HS27). Значительно сниженная цитотоксичность наблюдалась на этих клетках (фигура 27 для YS5 ADC на BPH-1, фигура 28 для YS5 ADC на HS27, фигура 29 для YS5 ADC на нормальных Т-клетках и фигура 30 для YS5 ADC на CD14-обедненных мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC)), на

основании чего можно предположить, что они совсем не поглощают ADC. Дифференциальная интернализация путем макропиноцитоза является вероятным механизмом, который повышает селективность ADC против CD46.

Токсичность ADC также исследовали *in vivo* с использованием трансгенных мышей, которые экспрессируют человеческий CD46. Не существует истинного мышинового ортолога для человеческого CD46 и мышиный CD46 выполняет совершенно иную физиологическую роль, чем ортолог человеческого CD46. Антитела не связывались с мышиным CD46. Таким образом, не существует хорошей малой животной модели для оценки потенциальной токсичности анти-CD46 ADC, за исключением трансгенной модели. Анти-CD46 ADC инъецировали в дозе 6 мг/кг трансгенным мышам, экспрессирующим человеческий CD46, и животных наблюдали ежедневно на проявление признаков токсичности. Животных умерщвляли на день 14 и жизненно важные органы извлекали для гистологического исследования повреждений ткани. Как показано на фигуре 31, не существует значительного различия между мышами, подвергнутыми лечению анти-CD46 ADC, и мышами, получавшими контрольный ADC. Признаков возникновения токсичности не наблюдалось на протяжении данного эксперимента при этой дозе тестируемого ADC. Следует понимать, что нормативные токсикологические исследования необходимо проводить на нечеловеческих приматах, таких как макаки-крабоеды, CD46 которых распознается анти-CD46 антителами, как показано выше.

Учитывая, что человеческий ген CD46 расположен на коротком плече хромосомы 1 (1q32.2), и при условии, что приобретение 1q часто наблюдается в различных видах рака, особенно имеющих слабый прогноз, вполне вероятно, что терапевтические средства на основе анти-CD46 антител, включая, но без ограничения, ADC, можно применять для широкого спектра злокачественных новообразований на поздних стадиях, требующих немедленного лечения. Например, было показано, что в раке предстательной железы область, охватывающая 1q32.2, приобретает диссеминированную метастатическую форму заболевания, когда текущие терапевтические средства являются неэффективными (Hanamura *et al.* (2006) *Blood*, 108: 1724-1732), что делает метастатический кастрационно-резистентный рак предстательной железы отличным кандидатом для лечения с помощью анти-CD46 ADC согласно изобретению. В отношении множественной миеломы приобретение 1q также часто наблюдалось у рецидивирующих пациентов (*Id.*), идентифицируя, таким образом, важную популяцию пациентов, которым могут потенциально помочь анти-CD46 ADC согласно изобретению. Корреляция между приобретением 1q (и особенно 1q32.2) и слабым прогнозом наблюдалась также для других видов рака, делая 1q потенциальным биомаркером для анти-CD46 ADC для

стратификации пациентов и мониторинга результатов лечения для этих злокачественных новообразований. Для оценки статуса 1q можно использовать пробу FISH, детектирующую 1q32.2. Циркулирующую ДНК также можно использовать для детекции приобретения 1q в качестве минимально инвазивного биомаркера (Fan *et al.* (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105: 16266-16271) для CD46-экспрессирующего рака со слабым прогнозом.

Анти-CD46 антитела, описанные здесь, можно применять в качестве визуализирующего зонда для мониторинга статуса опухоли *in vivo* либо в виде индивидуального визуализирующего средства или сопутствующего диагностического средства для анти-CD46 ADC. Ранее метили исходное анти-CD46 антитело UA20 и показали, что оно обладает отличной визуализирующей способностью *in vivo* для нацеливания на рак предстательной железы (He *et al.* (2010) *J. Nucl. Med.* 51: 427-432). Помимо визуализации, анти-CD46 антитела можно применять в качестве биомаркеров в иммуногистохимическом исследовании для оценки экспрессии CD46 в образцах биопсии и хранящихся образцах от пациентов, в анализах ELISA для оценки уровней CD46 в сыворотке, и FACS или анализах на основе чипов для оценки экспрессии CD46 на клеточной поверхности диссеминированных и/или циркулирующих опухолевых клеток.

Пример 2

CD46 ADC обладает высокой активностью в модели ксенотрансплантата внутрибедренного mCRPC

Так как свыше 95% метастазов рака предстательной железы расположено в участке кости, дополнительно исследовали эффективность анти-CD46 ADC в модели ксенотрансплантата кости. Клеточную линию метастатического кастрационно-резистентного рака предстательной железы (mCRPC) LNCaP C4-2B, которая несет репортер люциферазу светлячка, вводили в бедро мышам NSG для создания внутри кости модели ксенотрансплантата mCRPC. CD46 ADC (YS5-mcvsrab-MMAF) инъецировали через 7 дней после прививания каждые 4 дня в общем количестве 4 дозы. Статус опухоли наблюдали путем биолюминесцентной визуализации во время и после лечения. Как показано на фигуре 32, мыши, обработанные CD46 ADC, показали значительное ингибирование опухоли, которое продолжалось на протяжении периода после лечения до конца эксперимента (день 65), что дает основание предположить, что CD46 ADC согласно изобретению является высокоэффективным в этой внутрибедренной модели ксенотрансплантата mCRPC.

CD46 высоко экспрессируется в тканях CRPC и mCRPC

Дополнительно к первичным опухолям выполняли иммуногистохимические исследования на образцах ткани кастрационно-резистентного рака предстательной железы (CRPC) и метастатического кастрационно-резистентного рака предстательной железы (mCRPC). Как показано на фигуре 33, CD46 высоко экспрессируется в образцах CRPC. Кроме того, исследовали образцы mCRPC и обнаружили широко распространенную (100% из исследуемых случаев или 12/12) и высокую экспрессию CD46 в метастазах в кости (фигура 34), метастазах в лимфатические узлы (фигура 35) и метастазах в мочевой пузырь (фигура 36).

CD46 сверхэкспрессируется нейроэндокринным раком предстательной железы

Около 30% пациентов являются резистентными к лечению абиратероном и энзалутамидом. Возникновение мелкоклеточного/нейроэндокринного рака предстательной железы является частым событием (~30-40% случаев). В отличие от аденокарциномы, нейроэндокринный рак предстательной железы часто не экспрессирует типичные маркеры, такие как простатоспецифический антиген (PSA) и простатоспецифический мембранный антиген (PSMA). Таким образом, проводили исследование с помощью FACS экспрессии CD46 клеточной линией нейроэндокринного рака предстательной железы H660. Как показано на фигуре 37, левая панель, CD46 высоко экспрессируется клетками H660. Вестерн-блот-анализ подтвердил, что клетки H660 экспрессируют CD46 и маркер опухолей нейроэндокринного происхождения нейронспецифическую энолазу (NSE) (фигура 37, правая панель). Анти-CD46 антитело (YS5) интернализировалось клетками H660 и совместно локализовалось с лизосомальным маркером LAMP1 (фигура 38). При инкубации с клетками H660 анти-CD46 ADC показал высокую цитотоксическую активность *in vitro* со значением EC50 < 1 нМ (фигура 39).

CD46, кроме того, экспрессируется на повышенном уровне клетками рака предстательной железы после лечения абиратероном или энзалутамидом, делая их чувствительными к CD46 ADC

Было обнаружено, что лечение линии mCRPC LNCaP-C4-2B с помощью 10 мкМ абиратерона в течение 7 дней вызывает значительное повышение экспрессии поверхностного CD46 (фигура 40). Удивительно, что эта повышенная экспрессия коррелирует с усиленным уничтожением опухолевых клеток (фигура 41) со значениями EC50, падающими от 169 пМ до 21 пМ. Аналогично, при инкубации клеточной линии нейроэндокринного рака предстательной железы H660 с 10 мкМ энзалутамида в течение 7 дней наблюдалась значительное повышение экспрессии CD46 на клеточной поверхности (фигура 42). Аналогично тому, что наблюдалось в клетках LNCaP-C4-2B, клетки H660

стали более чувствительными к CD46 ADC после лечения энзалутамидом со значением EC50, падающим в 4-5 раз.

Экспрессия CD46 на дополнительных опухолях

Дополнительно к раку предстательной железы и множественной миеломе было обнаружено, что CD46 сверхэкспрессируется в широком диапазоне типов рака человека. С помощью иммуногистохимических анализов было обнаружено положительное окрашивание на CD46 в 82% случаях колоректального рака (81 из 99 случаев), при этом 70 случаев из 99 показали сильное окрашивание (71%) (фигура 43). Удивительно, что примерно в 100% случаях метастатический колоректальный рак экспрессирует CD46 (метастазы в печень на фигуре 44, метастазы в лимфатические узлы на фигуре 45, и метастазы в мочевой пузырь на фигуре 46).

Положительное окрашивание на CD46 также наблюдалось в 41 случае из 50 (82%) мезотелиомы, при этом в 31 случае из 50 наблюдалось сильное окрашивание (62%) (фигура 47). В раке поджелудочной железы положительное окрашивание на CD46 наблюдалось в 28 случаях из 50 (56%) (фигура 48). В мультиформной глиобластоме (GBM) положительное окрашивание наблюдалось в 30 случаях из 40 (75%) (фигура 49).

Положительное окрашивание также наблюдалось в других опухолях, включая, но без ограничения, рак мочевого пузыря, рак яичника, рак желудка, рак легких, рак печени, рак молочной железы и лимфому.

CD46 ADC является эффективным против других опухолей

Дополнительно к исследованиям *in vitro* выполняли исследование *in vivo* CD46 ADC на ксенотрансплантатах мезотелиомы у мышей NSG. Как показано на фигуре 50, YS5-mcvcrap-MMAF является высоко эффективным в отношении ингибирования развития ксенотрансплантата опухоли.

В частности, предложены следующие варианты осуществления.

Вариант 1. Выделенное человеческое антитело, которое специфически связывается с CD46 и интернализуется клеткой, экспрессирующей или сверхэкспрессирующей CD46, при этом: указанное антитело представляет собой антитело, которое специфически связывается с клетками, которые экспрессируют или сверхэкспрессируют CD46, при этом указанное антитело специфически связывается с эпитопом, связанным одним или несколькими антителами, выбранными из группы, состоящей из YS5, YS5F, YS5v1D, SB1HGNY, YS12, 3G7RY, YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и/или UA8каппа; и указанное антитело интернализуется указанной клеткой путем макропиноцитоза.

Вариант 2. Антитело согласно варианту 1, отличающееся тем, что указанное антитело связывается с доменом 1 и/или доменом 2 CD46.

Вариант 3. Антитело по пунктам 1 или 2, отличающееся тем, что указанное антитело не связывается с доменом 3 и/или доменом 4 CD46.

Вариант 4. Антитело согласно любому из вариантов 1-3, отличающееся тем, что указанные клетки, которые экспрессируют или сверхэкспрессируют CD46, представляют собой раковые клетки.

Вариант 5. Антитело согласно любому из вариантов 1-4, отличающееся тем, что указанные клетки, которые экспрессируют или сверхэкспрессируют CD46, представляют собой клетки рака предстательной железы.

Вариант 6. Антитело согласно варианту 5, отличающееся тем, что указанное антитело связывается с клетками клеточной линии, выбранной из группы, состоящей из клеток DU145, клеток PC3 и клеток LnCaP.

Вариант 7. Антитело согласно любому из вариантов 1-6, отличающееся тем, что указанное антитело связывается с опухолевыми клетками предстательной железы с аффинностью (K_D) по меньшей мере примерно 5-10 нМ при измерении на живых опухолевых клетках предстательной железы с помощью FACS.

Вариант 8. Антитело согласно варианту 7, отличающееся тем, что указанное антитело связывается с опухолевыми клетками предстательной железы с аффинностью (K_D) по меньшей мере 3 нМ при измерении на живых опухолевых клетках предстательной железы с помощью FACS.

Вариант 9. Антитело согласно любому из вариантов 1-8, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой по существу интактный иммуноглобулин.

Вариант 10. Антитело согласно варианту 9, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой IgA, IgE или IgG.

Вариант 11. Антитело согласно варианту 9, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой IgG1.

Вариант 12. Антитело согласно любому из вариантов 1-8, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой фрагмент антитела, который специфически связывается с клетками, которые экспрессируют или сверхэкспрессируют CD46.

Вариант 13. Антитело согласно варианту 12, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из Fv, Fab, (Fab')₂, (Fab')₃, IgGΔCH2 и минитела.

Вариант 14. Антитело согласно любому из вариантов 1-8, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой одноцепочечное антитело.

Вариант 15. Антитело согласно любому из вариантов 1-14, отличающееся тем, что указанное антитело конкурирует с одним или несколькими из YS5, YS5F, YS5vID, SB1HGNY, YS12, 3G7RY, YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и/или UA8kappa за связывание с CD46.

Вариант 16. Антитело согласно любому из вариантов 1-14, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VH CDR1 и/или VH CDR2, и/или VH CDR3, и/или VL CDR1, и/или VL CDR2, и/или VL CDR3 антитела, выбранного из группы, состоящей из YS5, YS5F, YS5vID, SB1HGNY, YS12, 3G7RY, YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и UA8kappa.

Вариант 17. Антитело согласно любому из вариантов 1-14, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 антитела, выбранного из группы, состоящей из YS5, YS5F, YS5vID, SB1HGNY, YS12, 3G7RY, YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и UA8kappa.

Вариант 18. Антитело согласно варианту 17, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную легкую (VL) цепь антитела, выбранного из группы, состоящей из YS5, YS5F, YS5vID, SB1HGNY, YS12, 3G7RY, YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и UA8kappa.

Вариант 19. Антитело согласно любому из вариантов 1-18, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3 антитела, выбранного из группы, состоящей из YS5, YS5F, YS5vID, SB1HGNY, YS12, 3G7RY, YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и UA8kappa.

Вариант 20. Антитело согласно варианту 19, отличающееся тем, что указанное антитело содержит переменную тяжелую (VH) цепь антитела, выбранного из группы, состоящей из YS5, YS5F, YS5vID, SB1HGNY, YS12, 3G7RY, YS6, YS1, YS3, YS4, YS8, YS7, YS9, YS10, YS11, 3G7HY, 3G7NY, 3G7, SB2, 2C8 и UA8kappa.

Вариант 21. Антитело согласно любому из вариантов 1-14, отличающееся тем, что указанное антитело содержит: переменную легкую (VL) цепь антитела YS5 и переменную тяжелую (VH) цепь антитела YS5; или переменную легкую (VL) цепь антитела YS5F и переменную тяжелую (VH) цепь антитела YS5F; или переменную легкую (VL) цепь антитела YS5vID и переменную тяжелую (VH) цепь антитела YS5vID; или переменную легкую (VL) цепь антитела SB1HGNY и переменную тяжелую (VH) цепь антитела SB1HGNY; или переменную легкую (VL) цепь антитела YS12 и переменную тяжелую (VH) цепь антитела YS12; или переменную легкую (VL) цепь антитела 3G7RY и переменную тяжелую (VH) цепь антитела 3G7RY; или переменную легкую (VL) цепь антитела YS6 и переменную тяжелую (VH) цепь антитела YS6; или

вариабельную легкую (VL) цепь антитела YS1 и вариабельную тяжелую (VH) цепь антитела YS1; или вариабельную легкую (VL) цепь антитела YS3 и вариабельную тяжелую (VH) цепь антитела YS3; или вариабельную легкую (VL) цепь антитела YS4 и вариабельную тяжелую (VH) цепь антитела YS4; или вариабельную легкую (VL) цепь антитела YS8 и вариабельную тяжелую (VH) цепь антитела YS8; или вариабельную легкую (VL) цепь антитела YS7 и вариабельную тяжелую (VH) цепь антитела YS7; или вариабельную легкую (VL) цепь антитела YS9 и вариабельную тяжелую (VH) цепь антитела YS9; или вариабельную легкую (VL) цепь антитела YS10 и вариабельную тяжелую (VH) цепь антитела YS10; или вариабельную легкую (VL) цепь антитела YS11 и вариабельную тяжелую (VH) цепь антитела YS11; или вариабельную легкую (VL) цепь антитела 3G7HY и вариабельную тяжелую (VH) цепь антитела 3G7HY; или вариабельную легкую (VL) цепь антитела 3G7NY и вариабельную тяжелую (VH) цепь антитела 3G7NY; или вариабельную легкую (VL) цепь антитела 3G7 и вариабельную тяжелую (VH) цепь антитела 3G7; или вариабельную легкую (VL) цепь антитела SB2 и вариабельную тяжелую (VH) цепь антитела SB2; или вариабельную легкую (VL) цепь антитела 2C8 и вариабельную тяжелую (VH) цепь антитела 2C8; или вариабельную легкую (VL) цепь антитела UA8карра и вариабельную тяжелую (VH) цепь антитела UA8карра.

Вариант 22. Антитело согласно любому из вариантов 1-22, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой человеческий одноцепочечный фрагмент Fv (scFv).

Вариант 23. Антитело согласно любому из вариантов 1-22, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой IgG человека.

Вариант 24. Иммуноконъюгат, содержащий антитело согласно любому из вариантов 1-23, присоединенное к эффектору, при этом указанный эффектор выбран из группы, состоящей из вторичного антитела, детектируемой метки, цитотоксина или цитостатического агента, липосомы, содержащей лекарственное средство, радионуклида, лекарственного средства, пролекарства, вирусной частицы, цитокина и хелата.

Вариант 25. Иммуноконъюгат согласно варианту 24, отличающийся тем, что указанное антитело присоединено к цитотоксину.

Вариант 26. Иммуноконъюгат согласно варианту 25, отличающийся тем, что указанное антитело присоединено к цитотоксину, выбранному из группы, состоящей из дифтерийного токсина, экзотоксина синегнойной палочки, рицина, абрина, сапорина и тимидинкиназы.

Вариант 27. Иммуноконъюгат согласно варианту 24, отличающийся тем, что указанное антитело присоединено к цитотоксическому и/или цитостатическому лекарственному средству.

Вариант 28. Иммуноконъюгат согласно варианту 25, отличающийся тем, что указанное антитело присоединено напрямую или посредством линкера к одному или нескольким из следующего: указанному лекарственному средству; липиду или липосоме, содержащей указанное лекарственное средство; полимерному носителю лекарственного средства, содержащему указанное лекарственное средство; и носителю лекарственного средства в форме наночастиц, содержащему указанное лекарственное средство.

Вариант 29. Иммуноконъюгат согласно любому из вариантов 27-28, отличающийся тем, что указанное лекарственное средство представляет собой лекарственное средство против рака.

Вариант 30. Иммуноконъюгат согласно любому из вариантов 27-28, отличающийся тем, что указанное лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из ингибитора микротрубочек, ДНК-повреждающих агентов и ингибитора полимеразы.

Вариант 31. Иммуноконъюгат согласно варианту 30, отличающийся тем, что лекарственное средство представляет собой ингибитор тубулина.

Вариант 32. Иммуноконъюгат согласно варианту 31, отличающийся тем, что лекарственное средство представляет собой лекарственное средство, выбранное из группы, состоящей из ауристатина, доластатина-10, синтетических производных природного продукта доластатина-10 и мэйтансина или производного мэйтансина.

Вариант 33. Иммуноконъюгат согласно варианту 31, отличающийся тем, что лекарственное средство представляет собой лекарственное средство, выбранное из группы, состоящей из монометилауристатина F (ММАF), ауристатина E (AE), монометилауристатина E (ММАЕ), *vc*ММАЕ и *vc*ММАF.

Вариант 34. Иммуноконъюгат согласно варианту 31, отличающийся тем, что лекарственное средство представляет собой мэйтансин, выбранный из группы, состоящей из мертансина (DM1), DM3 и DM4.

Вариант 35. Иммуноконъюгат согласно варианту 30, отличающийся тем, что лекарственное средство представляет собой ДНК-повреждающий агент.

Вариант 36. Иммуноконъюгат согласно варианту 35, отличающийся тем, что лекарственное средство представляет собой лекарственное средство, выбранное из группы, состоящей из калихеамицина, дуокармицина и пирролобензодиазепинов.

Вариант 37. Иммуноконъюгат согласно варианту 36, отличающийся тем, что лекарственное средство представляет собой калихеамицин или аналог калихеамицина.

Вариант 38. Иммуноконъюгат согласно варианту 36, отличающийся тем, что лекарственное средство представляет собой дуокармицин.

Вариант 39. Иммуноконъюгат согласно варианту 38, отличающийся тем, что лекарственное средство представляет собой дуокармицин, выбранный из группы, состоящей из дуокармицина А, дуокармицина В1, дуокармицина В2, дуокармицина С1, дуокармицина С2, дуокармицина D, дуокармицина SA, циклопропилбензоиндол дуокармицина (СС-1065), центанамицина, рахелмицина, адозелезина, бизелезина и карзелезина.

Вариант 40. Иммуноконъюгат согласно варианту 36, отличающийся тем, что лекарственное средство представляет собой пирролобензодиазепин или димер пирролобензодиазефина.

Вариант 41. Иммуноконъюгат согласно варианту 40, отличающийся тем, что лекарственное средство представляет собой лекарственное средство, выбранное из группы, состоящей из антрамицина (и его димеров), мазетрамицина (и его димеров), томаймицина (и его димеров), протракарцина (и его димеров), хикамицина (и его димеров), неотрамицина А (и его димеров), неотрамицина В (и его димеров), DC-81 (и его димеров), сибиромиицина (и его димеров), поротрамицина А (и его димеров), поротрамицина В (и его димеров), сибаномиицина (и его димеров), аббеймицина (и его димеров), SG2000 и SG2285.

Вариант 42. Иммуноконъюгат согласно любому из вариантов 27-28, отличающийся тем, что указанное лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из ауристатиона, доластатиона, колхицинона, комбрестиатиона и ингибиторов mTOR/PI3K.

Вариант 43. Иммуноконъюгат согласно любому из вариантов 27-28, отличающийся тем, что указанное лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из фторурацила (5-FU), капецитабина, 5-трифторметил-2'-дезоксинуридина, метотрексата натрия, ралтитрексата, пеметрексата, цитозин-арабинозида, 6-меркаптопурина, азатиоприна, 6-тиогуанина (6-TG), пентостатинона, флударабина фосфата, кладрибина, флоксуринидина (5-фтор-2), ингибитора рибонуклеотидредуктазы (RNR), циклофосфамида, неозара, ифосфамида, тиотепа, 1,3-бис(2-хлорэтил)-1-нитрозомочевинина (BCNU), 1-(2-хлорэтил)-3-циклогексил-нитрозомочевинина, (метил-CCNU), гексаметилмеламинина, бусульфана, прокарбазина HCL, дакарбазина (DTIC), хлорамбуцила, мелфалана, цисплатина, карбоплатина, оксалиплатина, бендамустина, кармустина, хлорметина, дакарбазина (DTIC), фотемустина, ломустина, манносульфана, неаплатина, нимустина, преднимустина, ранимустина, сатраплатина, семустина, стрептозоцина, темозоломида,

треосульфана, триазиквона, триэтиленмеламина, тиотепа, триплатина тетранитрата, трофосфамида, урамустина, доксорубицина, даунорубицина цитрата, митоксантрона, актиномицина D, этопозида, топотекана HCL, тенипозида (VM-26), иринотекана HCL (CPT-11), камптотецина, белотекана, рубитекана, винкристина, винбластина сульфата, винорелбина тартрата, виндезина сульфата, паклитаксела, доцетаксела, паклитаксела в форме наночастиц, абраксана, иксабепилона, ларотаксела, ортатаксела, тезетаксела, винфлунина, ретиноевой кислоты, производного ретиноевой кислоты, доксирубицина, винбластина, винкристина, циклофосфамида, ифосфамида, цисплатина, 5-фторурацила, производного камптотецина, интерферона, тамоксифена и таксола. В некоторых вариантах осуществления соединение против рака выбрано из группы, состоящей из абраксана, доксорубицина, динатрия памидроната, анастрозола, экземестана, циклофосфамида, эпирубицина, торемифена, летрозолола, трастузумаба, мегестролтамоксифена, паклитаксела, доцетаксела, капецитабина, гозерелина ацетата и золедроновой кислоты.

Вариант 44. Иммуноконъюгат согласно варианту 24, отличающийся тем, что указанное антитело присоединено к хелату, содержащему изотоп, выбранный из группы, состоящей из ^{99}Tc , ^{203}Pb , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{72}As , ^{111}In , ^{113}In , ^{97}Ru , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{52}Fe , ^{52}Mn , ^{51}Cr , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{77}As , ^{90}Y , ^{67}Cu , ^{169}Er , ^{121}Sn , ^{127}Te , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{161}Tb , ^{109}Pd , ^{165}Dy , ^{149}Pm , ^{151}Pm , ^{153}Sm , ^{157}Gd , ^{159}Gd , ^{166}Ho , ^{172}Tm , ^{169}Yb , ^{175}Yb , ^{177}Lu , ^{105}Rh и ^{111}Ag .

Вариант 45. Иммуноконъюгат согласно варианту 24, отличающийся тем, что указанное антитело присоединено к липиду или липосоме, образующей комплекс с лекарственным средством против рака или содержащей лекарственное средство против рака.

Вариант 46. Иммуноконъюгат согласно варианту 24, отличающийся тем, что указанное антитело присоединено к детектируемой метке.

Вариант 47. Фармацевтическая композиция, содержащая: фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество и антитело согласно любому из вариантов 1-23; и/или фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество и иммуноконъюгат согласно любому из вариантов 24-46.

Вариант 48. Фармацевтическая композиция согласно варианту 47, отличающаяся тем, что указанная композиция представлена в стандартной лекарственной формы.

Вариант 49. Композиция согласно любому из вариантов 47-48, отличающаяся тем, что указанная композиция изготовлена для введения способом, выбранным из группы, состоящей из перорального введения, назального введения, ректального введения,

интраперитонеальной инъекции, внутрисосудистой инъекции, подкожной инъекции, чрезкожного введения и внутримышечной инъекции.

Вариант 50. Способ ингибирования роста и/или пролиферации клетки, которая экспрессирует или сверхэкспрессирует CD46, при этом указанный способ включает: приведение в контакт указанной раковой клетки с антителом согласно любому из вариантов 1-23; и/или приведение в контакт указанной раковой клетки с иммуноконъюгатом, содержащим антитело согласно любому из вариантов 1-46, присоединенное к эффектору, который обладает цитостатической и/или цитотоксической активностью.

Вариант 51. Способ согласно варианту 50, отличающийся тем, что указанная клетка представляет собой раковую клетку.

Вариант 52. Способ согласно варианту 51, отличающийся тем, что указанная клетка представляет собой раковую клетку, которая сверхэкспрессирует CD46.

Вариант 53. Способ согласно варианту 51, отличающийся тем, что указанная раковая клетка выбрана из группы, состоящей из рака яичника, колоректального рака, рака молочной железы, рака легких, рака предстательной железы, рака почки, рака поджелудочной железы, мезотелиомы, лимфомы, рака печени, рака уротелия, рака желудка, множественной миеломы, мультиформной глиобластомы, глиомы, нейробластомы и рака шейки матки.

Вариант 54. Способ согласно варианту 51, отличающийся тем, что указанная раковая клетка представляет собой клетку рака предстательной железы.

Вариант 55. Способ согласно варианту 54, отличающийся тем, что указанная раковая клетка представляет собой клетку кастрационно-резистентного рака предстательной железы.

Вариант 56. Способ согласно любому из вариантов 51-55, отличающийся тем, что указанная клетка представляет собой метастатическую клетку.

Вариант 57. Способ согласно варианту 56, отличающийся тем, что указанная метастатическая клетка представляет собой метастазы в кости, метастазы в печень, метастазы в мочевой пузырь и/или метастазы в лимфатические узлы.

Вариант 58. Способ согласно любому из вариантов 51-56, отличающийся тем, что указанная клетка представляет собой клетку солидной опухоли.

Вариант 59. Способ согласно любому из вариантов 50-58, отличающийся тем, что указанный эффектор представляет собой радионуклид и/или цитостатическое лекарственное средство.

Вариант 60. Способ согласно варианту 59, отличающийся тем, что указанный эффектор представляет собой одно или несколько из следующего: цитотоксическое и/или цитостатическое лекарственное средство; липид или липосому, содержащую цитотоксическое и/или цитостатическое лекарственное средство; полимерный носитель лекарственного средства, содержащий цитотоксическое и/или цитостатическое лекарственное средство; и носитель лекарственного средства в форме наночастиц, содержащий цитотоксическое и/или цитостатическое лекарственное средство.

Вариант 61. Способ согласно варианту 60, отличающийся тем, что указанное лекарственное средство представляет собой лекарственное средство против рака.

Вариант 62. Способ согласно варианту 61, отличающийся тем, что указанное лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из ауристати́на, доластатина, колхицина, комбрестатина и ингибиторов mTOR/PI3K.

Вариант 63. Способ согласно варианту 61, отличающийся тем, что указанное лекарственное средство представляет собой монометил ауристин F.

Вариант 64. Способ согласно варианту 61, отличающийся тем, что указанное лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из фторурацила (5-FU), капецитабина, 5-трифторметил-2'-дезоксинуридина, метотрексата натрия, ралтитрекседа, пеметрекседа, цитозин-арабинозида, 6-меркаптопурина, азатиоприна, 6-тиогуанина (6-TG), пентостатина, флударабина фосфата, кладрибина, флоксуридина (5-фтор-2), ингибитора рибонуклеотидредуктазы (RNR), циклофосфамида, неозара, ифосфамида, тиотепа, 1,3-бис(2-хлорэтил)-1-нитрозомочевины (BCNU), 1-(2-хлорэтил)-3-циклогексилнитрозомочевины, (метил-CCNU), гексаметилмеламина, бусульфана, прокарбазина HCL, дакарбазина (DTIC), хлорамбуцила, мелфалана, цисплатина, карбоплатина, оксалиплатина, бендамустина, кармустина, хлорметина, дакарбазина (DTIC), фотемустина, ломустина, манносульфана, недаплатина, нимустина, преднимустина, ранимустина, сатраплатина, семустина, стрептозоцина, темозоломида, треосульфана, триазиквона, триэтиленмеламина, тиотепа, триплатина тетранитрата, трофосфамида, урамустина, доксорубицина, даунорубицина цитрата, митоксантрона, актиномицина D, этопозид, топотекана HCL, тенипозид (VM-26), иринотекана HCL (CPT-11), камптотецина, белотекана, рубитекана, винкристина, винбластин сульфата, винорелбина тартрата, виндезина сульфата, паклитаксела, доцетаксела, паклитаксела в форме наночастиц, абраксана, иксабепилона, лоратаксела, ортатаксела, тезетаксела, винфлунина, ретиноевой кислоты, производного ретиноевой кислоты, доксирубицина, винбластин, винкристина, циклофосфамида, ифосфамида, цисплатина, 5-фторурацила, производного камптотецина, интерферона, тамоксифена и таксола. В некоторых вариантах

осуществления соединения против рака выбрано из группы, состоящей из абраксана, доксорубицина, динатрия памидроната, анастрозола, экземестана, циклофосфамида, эпирубицина, торемифена, летрозолола, трастузумаба, мегестролтамоксифена, паклитаксела, доцетаксела, капецитабина, гозерелина ацетата и золедроновой кислоты.

Вариант 65. Способ согласно любому из вариантов 60-64, отличающийся тем, что указанное лекарственное средство конъюгировано напрямую с указанным антителом; или указанное лекарственное средство содержится в липиде или липосоме, присоединенной к указанному антителу; или указанное лекарственное средство содержится в полимерном носителе и/или носителе в виде наночастиц, присоединенном к указанному антителу.

Вариант 66. Способ согласно любому из вариантов 50-58, отличающийся тем, что указанный эффектор содержит цитотоксин.

Вариант 67. Способ согласно варианту 50, отличающийся тем, что указанный эффект представляет собой радионуклид.

Вариант 68. Способ согласно любому из вариантов 50-67, отличающийся тем, что указанный иммуноконъюгат или антитело вводят в фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель.

Вариант 69. Способ согласно любому из вариантов 50-68, отличающийся тем, что указанное введение включает введение человеку или не относящемуся к человеку млекопитающему.

Вариант 70. Способ согласно любому из вариантов 50-69, отличающийся тем, что указанное введение включает: парентеральное введение; и/или введение в опухоль или участок хирургического вмешательства.

Вариант 71. Способ согласно любому из вариантов 50-70, отличающийся тем, что указанное антитело и/или иммуноконъюгат вводят в качестве вспомогательной терапии при хирургическом вмешательстве и/или радиотерапии.

Вариант 72. Способ согласно любому из вариантов 50-71, отличающийся тем, что указанное антитело и/или иммуноконъюгат вводят в сочетании с другим лекарственным средством против рака и/или гормоном.

Вариант 73. Способ согласно варианту 72, отличающийся тем, что указанное антитело и/или иммуноконъюгат вводят в сочетании с абиратероном и/или энзалутамидом.

Вариант 74. Способ согласно варианту 73, отличающийся тем, что указанные клетки представляют собой клетки рака предстательной железы.

Вариант 75. Способ согласно варианту 74, отличающийся тем, что указанные клетки рака предстательной железы представляют собой клетки нейроэндокринного рака предстательной железы (NEPC).

Вариант 76. Способ согласно варианту 74, отличающийся тем, что указанные клетки рака предстательной железы представляют собой клетки метастатического кастрационно-резистентного рака предстательной железы (mCRPC), резистентные к абиратерону (Abi) или энзалутамиду (Enz).

Вариант 77. Способ детекции раковой клетки рака, который экспрессирует или сверхэкспрессирует CD46, при этом указанный способ включает: приведение в контакт указанной раковой клетки с иммуноконъюгатом, содержащим антитело согласно любому из вариантов 1-23, присоединенное к детектируемой метке; и детекцию присутствия и/или локализации указанной детектируемой метки, при этом присутствие и/или локализация являются индикатором локализации и/или присутствия раковой клетки.

Вариант 78. Способ согласно варианту 77, отличающийся тем, что указанная метка представляет собой метку, выбранную из группы, состоящей из радиоактивной метки, рентгеноконтрастной метки, метки для MRI, метки для PET и метки для SPECT.

Вариант 79. Способ согласно любому из вариантов 77-78, отличающийся тем, что указанная раковая клетка выбрана из группы, состоящей из рака яичника, колоректального рака, рака молочной железы, рака легких, рака предстательной железы, рака почки, рака поджелудочной железы, мезотелиомы, лимфомы, рака печени, рака уротелия, рака желудка, множественной миеломы, глиомы, нейробластомы и рака шейки матки.

Вариант 80. Способ согласно любому из вариантов 77-79, отличающийся тем, что указанное приведение в контакт включает введение указанного иммуноконъюгата не относящемуся к человеку млекопитающему или человеку.

Вариант 81. Способ согласно любому из вариантов 77-80, отличающийся тем, что указанная детекция представляет собой детекцию указанной метки *in vivo*.

Вариант 82. Способ согласно варианту 81, отличающийся тем, что указанная детекция включает использование способа детекции, выбранного из группы, состоящей из рентгеновского анализа, PET, SPECT, MRI и CAT.

Вариант 83. Способ согласно любому из вариантов 77-80, отличающийся тем, что указанная детекция включает детекцию указанной метки *ex vivo* в биопсии или образце, полученном из биопсии.

Вариант 84. Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело или фрагмент антитела согласно любому из вариантов 1-23.

Вариант 85. Экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту согласно варианту 84.

Вариант 86. Клетка, содержащая экспрессионный вектор согласно варианту 85.

Следует понимать, что примеры и варианты осуществления, описанные здесь, представлены только в иллюстративных целях и что в свете этого различные модификации или изменения будут предложены специалистам в данной области, которые не должны выходить за пределы сущности и границ данной заявки, а также объема прилагаемых пунктов формулы изобретения. Все публикации, патенты и патентные заявки, указанные здесь, включены тем самым путем ссылки во всей их полноте для всех целей.

ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное человеческое антитело, которое специфически связывается с CD46, причем указанное антитело представляет собой антитело, выбранное из группы, состоящей из:

антитела, содержащего области CDR антитела YS5, при этом указанные области CDR включают VH CDR1 (GLTVNNYA, остатки 26-33 в SEQ ID NO:1), VH CDR2 (ISYDGNNK, остатки 51-58 в SEQ ID NO:1), VH CDR3 (AKGGGYFDL, остатки 97-105 в SEQ ID NO:1), VL CDR1 (SSNIGAGYD, остатки 26-34 в SEQ ID NO:22), VL CDR2 (GNN, остатки 52-54 в SEQ ID NO:22) и VL CDR3 (SSYTSGTWL, остатки 91-99 в SEQ ID NO:22);

антитела, содержащего области CDR антитела YS5F, при этом указанные области CDR включают VH CDR1 (GFTVNNYA, остатки 26-33 в SEQ ID NO:2), VH CDR2 (ISYDGNNK, остатки 51-58 в SEQ ID NO:2), VH CDR3 (AKGGGYFDL, остатки 97-105 в SEQ ID NO:2), VL CDR1 (SSNIGAGYD, остатки 26-34 в SEQ ID NO:23), VL CDR2 (GNN, остатки 52-54 в SEQ ID NO:23) и VL CDR3 (SSYTSGTWL, остатки 91-99 в SEQ ID NO:23); и

антитела, содержащего области CDR антитела YS5v1d, при этом указанные области CDR включают VH CDR1 (GFTVNNYA, остатки 26-33 в SEQ ID NO:3), VH CDR2 (ISYDGNNK, остатки 51-58 в SEQ ID NO:3), VH CDR3 (AKGGGYFDL, остатки 97-105 в SEQ ID NO:3), VL CDR1 (SSNIGAGYD, остатки 26-34 в SEQ ID NO:24), VL CDR2 (GDN, остатки 52-54 в SEQ ID NO:24) и VL CDR3 (SSYTSGTWL, остатки 91-99 в SEQ ID NO:24).

2. Антитело по п. 1, отличающееся тем, что указанное антитело содержит области CDR антитела YS5, при этом указанные области CDR включают VH CDR1 (GLTVNNYA, остатки 26-33 в SEQ ID NO:1), VH CDR2 (ISYDGNNK, остатки 51-58 в SEQ ID NO:1), VH CDR3 (AKGGGYFDL, остатки 97-105 в SEQ ID NO:1), VL CDR1 (SSNIGAGYD, остатки 26-34 в SEQ ID NO:22), VL CDR2 (GNN, остатки 52-54 в SEQ ID NO:22) и VL CDR3 (SSYTSGTWL, остатки 91-99 в SEQ ID NO:22).

3. Антитело по п. 1, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VH- и VL-домены, выбранные из группы, состоящей из:

VH-домена антитела YS5 (SEQ ID NO:1) и VL-домена антитела YS5 (SEQ ID NO:22);

VH-домена антитела YS5F (SEQ ID NO:2) и VL-домена антитела YS5f (SEQ ID NO:23);

и

VH-домена антитела YS5v1D (SEQ ID NO:3) и VL-домена антитела YS5v1D (SEQ ID NO:24).

4. Антитело по п. 3, отличающееся тем, что указанное антитело содержит VH-домен антитела YS5 (SEQ ID NO:1) и VL-домен антитела YS5 (SEQ ID NO:22).

5. Антитело по любому из пп. 1-4, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой полноразмерный иммуноглобулин, Fv, Fab, (Fab')₂, (Fab')₃, IgGACH₂ или одноцепочечный фрагмент Fv (scFv).

6. Антитело по п. 5, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой иммуноглобулин IgG.

7. Антитело по п. 5, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой одноцепочечное антитело (scFv).

8. Антитело по п. 5, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой человеческий scFv или человеческий IgG.

9. Иммуноконъюгат для лечения рака, экспрессирующего или сверхэкспрессирующего CD46, причем иммуноконъюгат содержит антитело по любому из пп. 1-8, присоединенное к фрагменту, выбранному из группы, состоящей из антитела, цитотоксина или цитостатического агента, липосомы, содержащей лекарственное средство против рака, радионуклида, лекарственного средства, пролекарства, вирусной частицы и цитокина.

10. Иммуноконъюгат по п. 9, отличающийся тем, что указанное антитело присоединено к цитотоксину, выбранному из группы, состоящей из дифтерийного токсина, экзотоксина синегнойной палочки, рицина, абрина, сапорина и тимидинкиназы.

11. Иммуноконъюгат по п. 9, отличающийся тем, что указанное антитело присоединено к цитотоксическому и/или цитостатическому лекарственному средству.

12. Иммуноконъюгат, содержащий антитело по п. 1, линкер и лекарственное средство.

13. Иммуноконъюгат по любому из пп. 11-12, отличающийся тем, что указанное лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из ингибитора микротрубочек, ДНК-повреждающих агентов, ингибитора полимеразы и их комбинации.

14. Иммуноконъюгат по п. 12, отличающийся тем, что лекарственное средство представляет собой лекарственное средство, выбранное из группы, состоящей из ауристатина, доластатина-10, синтетических производных природного продукта доластатина-10 и мэйтансина или производного мэйтансина, монометилауристатина F (ММАF), ауристатина E (AE), монометилауристатина E (ММАЕ), vcММАЕ, vcММАF, мертансина (DM1), DM3, DM4,

дуокармицина А, дуокармицина В1, дуокармицина В2, дуокармицина С1, дуокармицина С2, дуокармицина D, дуокармицина SA, циклопропилбензоиндол дуокармицина (CC-1065), центанамицина, рахелмицина, адозелезина, бизелезина и карзелезина, антрамицина (и его димеров), мазетрамицина (и его димеров), томаймицина (и его димеров), протракарцина (и его димеров), хикамицина (и его димеров), неотрамицина А (и его димеров), неотрамицина В (и его димеров), DC-81 (и его димеров), сибиромицина (и его димеров), поротрамицина А (и его димеров), поротрамицина В (и его димеров), сибаномицина (и его димеров), аббеймицина (и его димеров), SG2000, SG2285, ауристати́на, доластатина, колхицина, комбрестатина и ингибиторов mTOR/PI3K, фторурацила (5-FU), капецитабина, 5-трифторметил-2'-дезоксинуридина, метотрексата натрия, ралтитрекседа, пеметрекседа, цитозин-арабинозида, 6-меркаптопурина, азатиоприна, 6-тиогуанина (6-TG), пентостатина, флударабина фосфата, кладрибина, флоксуридина (5-фтор-2), ингибитора рибонуклеотидредуктазы (RNR), циклофосфамида, неозара, ифосфамида, тиотепа, 1,3-бис(2-хлорэтил)-1-нитрозомочевины (BCNU), 1-(2-хлорэтил)-3-циклогексил-нитрозомочевины, метил-(CCNU), гексаметилмеламина, бусульфана, прокарбазина HCL, дакарбазина (DTIC), хлорамбуцила, мелфалана, цисплатина, карбоплатина, оксалиплатина, бендамустина, кармустина, хлорметина, дакарбазина (DTIC), фотемустина, ломустина, манносульфана, недаплатина, нимустина, преднимустина, ранимустина, сатраплатина, семустина, стрептозоцина, темозоломида, треосульфана, триазиквона, триэтиленмеламина, тиотепа, триплатина тетранитрата, трофосфамида, урамустина, доксорубицина, даунорубицина цитрата, митоксантрона, актиномицина D, этопозид, топотекана HCL, тенипозид (VM-26), иринотекана HCL (CPT-11), камптотецина, белотекана, рубитекана, винкристина, винбластина сульфата, винорелбина тартрата, виндезина сульфата, паклитаксела, доцетаксела, паклитаксела в форме наночастиц, абраксана, иксабепилона, ларотаксела, ортатаксела, тезетаксела, винфлунина, ретиноевой кислоты, производного ретиноевой кислоты, доксирубицина, винбластина, винкристина, циклофосфамида, ифосфамида, цисплатина, 5-фторурацила, производного камптотецина, интерферона, тамоксифена, таксола, абраксана, доксорубицина, динатрия памидроната, анастрозола, экземестана, циклофосфамида, эпирубицина, торемифена, летрозолола, трастузумаба, мегестролтамоксифена, паклитаксела, доцетаксела, капецитабина, гозерелина ацетата и золедроновой кислоты.

15. Иммуноконъюгат по п. 12, отличающийся тем, что лекарственное средство представляет собой лекарственное средство, выбранное из группы, состоящей из ауристати́на,

доластатина-10, монометилауристатина F (ММАF), ауристатина E (AE) и монометилауристатина E (ММАЕ).

16. Иммуноконъюгат по п. 14, в котором антитело присоединено к лекарственному средству через линкер MC-vc-PAB.

17. Иммуноконъюгат по п. 16, в котором два или четыре лекарственных средства конъюгированы с антителом.

18. Иммуноконъюгат по п. 12, отличающийся тем, что указанное антитело присоединено к липиду или липосоме, образующей комплекс с лекарственным средством против рака или содержащей лекарственное средство против рака.

19. Иммуноконъюгат, содержащий антитело по любому из пп. 1-8, присоединенное к детектируемой метке.

20. Иммуноконъюгат по п. 19, отличающийся тем, что указанное антитело присоединено к радионуклиду, представляющему собой изотоп, выбранный из группы, состоящей из ^{99}Tc , ^{203}Pb , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{72}As , ^{111}In , ^{113}In , ^{97}Ru , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{52}Fe , ^{52}Mn , ^{51}Cr , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{77}As , ^{90}Y , ^{67}Cu , ^{169}Er , ^{121}Sn , ^{127}Te , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{161}Tb , ^{109}Pd , ^{165}Dy , ^{149}Pm , ^{151}Pm , ^{153}Sm , ^{157}Gd , ^{159}Gd , ^{166}Ho , ^{172}Tm , ^{169}Yb , ^{175}Yb , ^{177}Lu , ^{105}Rh и ^{111}Ag .

21. Фармацевтическая композиция для лечения рака, экспрессирующего или сверхэкспрессирующего CD46, причем фармацевтическая композиция содержит фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество и антитело по любому из пп. 1-8.

22. Фармацевтическая композиция для лечения рака, экспрессирующего или сверхэкспрессирующего CD46, причем фармацевтическая композиция содержит фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество и иммуноконъюгат, содержащий антитело по любому из пп. 1-8, причем указанное антитело присоединено к цитотоксину или цитостатическому агенту, лекарственному средству против рака, липосоме, содержащей лекарственное средство против рака, или радионуклиду.

23. Применение антитела по любому из пп. 1-8 для лечения рака, который экспрессирует или сверхэкспрессирует CD46.

24. Применение иммуноконъюгата, содержащего антитело по любому из пп. 1-8, в котором указанное антитело присоединено к цитотоксину или цитостатическому агенту, лекарственному средству против рака, липосоме, содержащей лекарственное средство против рака, или радионуклиду, для лечения рака, который экспрессирует или сверхэкспрессирует CD46.

25. Применение по любому из пп. 23-24, отличающееся тем, что указанный рак выбран из группы, состоящей из рака предстательной железы, рака яичника, колоректального рака, рака молочной железы, рака легких, рака почки, рака поджелудочной железы, мезотелиомы, лимфомы, рака печени, рака уротелия, рака желудка, множественной миеломы, мультиформной глиобластомы, глиомы, нейробластомы и рака шейки матки.

26. Применение по п. 25, отличающееся тем, что указанный рак представляет собой клетки нейроэндокринного рака предстательной железы (NEPC) и/или клетки метастатического кастрационно-резистентного рака предстательной железы (mCRPC), резистентного к абиратерону (Abi) или энзалутамиду (Enz).

27. Применение иммуноконъюгата, содержащего антитело по любому из пп. 1-8, присоединенное к детектируемой метке, для детекции клетки рака, которая экспрессирует или сверхэкспрессирует CD46.

28. Применение по п. 27, отличающееся тем, что указанная детектируемая метка представляет собой метку, выбранную из группы, состоящей из радиоактивной метки, рентгеноконтрастной метки, метки для MRI, метки для PET и метки для SPECT.

29. Применение по любому из пп. 27-28, отличающееся тем, что указанная раковая клетка выбрана из группы, состоящей из рака яичника, колоректального рака, рака молочной железы, рака легких, рака предстательной железы, рака почки, рака поджелудочной железы, мезотелиомы, лимфомы, рака печени, рака уротелия, рака желудка, множественной миеломы, глиомы, нейробластомы и рака шейки матки.

30. Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело или фрагмент антитела по любому из пп. 1-4.

31. Экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 30.

32. Клетка для экспрессии антитела или фрагмента антитела, причем клетка содержит экспрессионный вектор по п. 31.

Фигура 1А

VH	Каркас- ный участок 1	CDR 1	Каркас- ный участко 2	CD R2	Каркасный участок 3	CDR3	Каркас- ный участок 4
YS5	QVQLVQSG GGVVQPGR SLRLACAA S	GLTV NNYA	MHWVRQA PGKGLEW VAV	ISY DGN NK	YYADSVKGRF TISRDN SKNT LYLQMNSLRA EDTAVYYC	AKGGGYF DL	WGRGTLVTV SS
YS5F	QVQLVQSG GGVVQPGR SLRLACAA S	GFTV NNYA	MHWVRQA PGKGLEW VAV	ISY DGN NK	YYADSVKGRF TISRDN SKNT LYLQMNSLRA EDTAVYYC	AKGGGYF DL	WGRGTLVTV SS
YS5vID	QVQLVQSG GGVVQPGR SLRLACAA S	GFTV NNYA	MHWVRQA PGKGLEW VAV	ISY DGN NK	YYADSVKGRF TISRDN SKNT LYLQMNSLRA EDTAVYYC	AKGGGYF DL	WGRGTLVTV SS
SB1HGN Y	QVQLQQSG GGVVQPGR SLRLSCAA S	GFTF SSYA	MHWVRQA PGKGLEW VAV	IRS DGS KK	YYADSVKGRF TISRDN SKNT LYLQMNSLRA EDTAVYYC	ARHGNYF DS	WGQGTLVTV SS
YS12	QVQLVESG GGVVQPGR SLRLSCAA S	GFTF STYG	MHWVRQA PGKGLEW LSF	ISY DGD EK	YYADSVKGRF TISRDN SKNT LYLQMNSLRA EDTAVYWC	AKASGYG MGILDY	WGQGTLVTV SS
3G7RY aka 3G8	EVQLVESG GGLVQPGG SLRLSCAA S	GFTF SDYY	MSWIRQA PGKGLEW VSY	ISS SGS TI	YYADSVKGRF TISRDN SKNT LYLQMNSLRA EDTAVYYC	ARDYGRI AAAGRRY	WGQGTLVTV SS
YS6	QVQLQESG GGVVRPGG SLRLSCAA S	GFTF SDYY	MSWIRQA PGKGLEW VSY	ISS SGS TI	YYADSVKGRF TISRDN SKNT LYLQMNSLRA EDTAVYYC	ARDYGRI AAAGRHY	WGQGTLVTV SS
YS1	EVQLVESG GGLVQPGG SLRLSCAA S	GFTF SDYY	MSWIRQA PGKGLEW VSY	ISS SGS TI	YYADSVKGRF TISRDN SKNT LYLQMNSLRA EDTAVYYC	ARDYGRI AAAGRHY	WGQGTLVTV SS

Фигура 1А (продолжение)

VH	Каркас- ный участок 1	CDR 1	Каркас- ный участок 2	CD R2	Каркасный участок 3	CDR3	Каркас- ный участок 4
YS3	QVQLQESG GGLVQPGG SLRLSCAA S	GFTF SSYW	MSWVRQA PGKGLEW VAD	IKQ DGS EK	YYVDSVKGRF TISGDNAKNS LYLQMNSLRA EDTAVYYC	AKDVGST AINYVRA YTWFDP	WGQGTLVTV SS
YS4	QVQLQESG GGLVQPGG SLRLSCAA S	GFTF SNYA	MSWVRQA PGKGLEW VST	ISG SGS ST	FYVDSVKGRF TISRDNKNT LYLQMNSLRA EDTAVYYC	AQGLYSS GWANWFD P	RGQGTLVTV SS
YS8	QVQLQESG GGVVQPGR SLRLSCAA S	GFTF SSYG	MHWVRQA PGKGLEW VAV	ISY DGS NK	YYADSVKGRF TISRDNKNT LYLQMNSLRA EDTAVYYC	AKVMGLA AAGLDAF DI	WGQGTIVTV SS
YS7	QVQLVQSG GGVVQPGR SLRLSCAA S	GFTF SSYA	MHWVRQA PGKGLEW VAV	ISY DGS NK	YYADSVKGRF TISRDTSTNT LYLQMNSLRA DDTAVYYC	GRESSGS PGV	WGQGTIVTV SS
YS9	QVQLVESG GGLIQPGG SLRLSCAA S	GFTV SSNY	MSWVRQA PGKGLEW VSV	IYT DGS T	YYADSVKGRF TISRDNKNT LYLQMNSLRA EDTAIYYC	ARDRGTS GYDWAFF DL	WGQGTLVTV SS
YS10	QVQLQESG GGLVQPGG SLRLSCAA S	GFTF SSYA	MSWVRQA PGKGLEW VSA	ISG SGG ST	YYADSVKGRF TISRDNKNT LYMQMNSLRA EDTAVYYC	AKDRYYY GSGKDAF DI	WGRGTMVTV SS
YS11	QVQLVESG GGLVQPGG SLGLSCAA S	GFTF SNYW	MSWVRQA PGKGLEW VAN	VRQ DGG QK	YYVDSVKGRF TISRDNKNS LYLQMNSLRT EDTAVYFC	VSQRNSG EHDY	WGQGTLVTV SS

Фигура 1А (продолжение)

VH	Каркас- ный участок 1	CDR 1	Каркас- ный участок 2	CD R2	Каркасный участок 3	CDR3	Каркас- ный участок 4
3G7HY	EVQLVESG GGLVQPGG SLRLSCAA S	GFTF SDYY	MSWIRQA PGKGLEW VSY	ISS SGS TI	YYADSVKGRF TISRDNKNT LYLQMNSLRA EDTAVYYC	ARDYGRI AAAGRHY	WGQGLVTV SS
3G7NY	EVQLVESG GGLVQPGG SLRLSCAA S	GFTF SDYY	MSWIRQA PGKGLEW VSY	ISS SGS TI	YYADSVKGRF TISRDNKNT LYLQMNSLRA EDTAVYYC	ARDYGRI AAAGRNY	WGQGLVTV SS
3G7	QVQLQESG GGVVRPGG SLRLSCAA S	GFTF SDYY	MSWIRQA PGKGLEW VSY	ISS SGS TI	YYADSVKGRF TISRDNKNT LYLQMNSLRA EDTAVYYC	ARDYGRI AAAGRHY	WGQGLVTV SS
SB2	EVQLVESG GGLVKPGG SLRLSCAA S	GFTF SDYY	MSWIRQA PGKGLEW VSY	ISS SGS SI	YYADSVKGRF TISRDNKNS LYLQMNSLKA EDTAVYYC	ARDITDV VGVSFY	WGQGLVTV SS
2C8	EVQLVESG GGVVQPGR SLRLSCAA S	GFTF SSYG	MHWVRQA PGKGLEW VAV	ISY DGS NK	YYADSVKGRF TISRDNKNT LYLQMNSLRA EDTAEYYC	AKVMGLA AAGLDAF DI	WGQGLVTV SS
UA8kappa	EVQLVESG GGVVQPGR SLRLSCAA S	GFTF SSFG	MHWVRRRA PGKGLEW VAV	ISY DGS NQ	YYADSVKGRF TISRDNKNT LYLQMNSLRA EDTAVYYC	GSRPGGG YASGSTV AY	WGQGLVTV SS

Фигура 1В

VL	Каркас- ный участок 1	CDR 1	Каркас- ный участок 2	CD R2	Каркасный участок 3	CDR3	Каркасный участок 4
YS5	QSVLTQPP SVSGAPGQ RVTISCTG S	SSNI GAGY D	VHWYQQ LPGTAPKL LIY	GNN	NRPSGVPDR FSGSKSGTS ASLAITGLQ AEDEADYYC	SSYTSGTW L	FGGGTKLTV L
YS5F	QSVLTQPP SVSGAPGQ RVTISCTG S	SSNI GAGY D	VHWYQQ LPGTAPKL LIY	GNN	NRPSGVPDR FSGSKSGTS ASLAITGLQ AEDEADYYC	SSYTSGTW L	FGGGTKLTV L
YS5vID	QSVLTQPP SVSGAPGQ RVTISCTG S	SSNI GAGY D	VHWYQQ LPGTAPKL LIY	GDN	NRPSGVPDR FSGSKSGTS ASLAITGLQ AEDEADYYC	SSYTSGTW L	FGGGTKLTV L
SB1HGN Y	DIQMTQSP SFLSASVG DRVTITCR AS	QGIS SY	LAWYQQ KPGKAPKL LIY	AAS	TLQSGVPSS FSGSGSGTE FTLTISLQ PEDFATYYC	QQLASYPL T	FGGGTKVDI K
YS12	SSELTQDP AVSVALGQ TVRITCQG D	SLRS YY	VSWFQQ KPGQAPVF VMY	GQN	NRPSGISER FSGSSSGNT ASLIITGAQ AEDEADYYC	HSRDSSGT HLRV	FGGGTKLTV L
3G7RY aka 3G8	QSALTQPP SASATPGQ RVTISCGR	TSNI GSNH	VYWYQQ LPGTAPKL LIY	RNN	QRPSGVPDR FSGSKSGTS ASLAISGLR SEDEADYYC	ATWDDSL SLSGEV	FGGGTKLTV L
YS6	SSELTQDP AVSVALGQ TVRITCQG D	SLRS YY	ASWYQQ KPGQAPVL VIY	GKN	NRPSGIPDR FSGSSSGNT ASLTITGAQ AEDEADYYC	NSRDSSGT HLEV	FGGGTKVTV L
YS1	SSELTQDP AVSVALGQ TVRITCQG D	TLST YY	ANWYQQ KPGQAPVL VIY	GKN	NRPSGIPDR FSGSSSGNT ASLTITGAQ AEDEADYYC	HSRDISGN YL	FASGTKLTV L

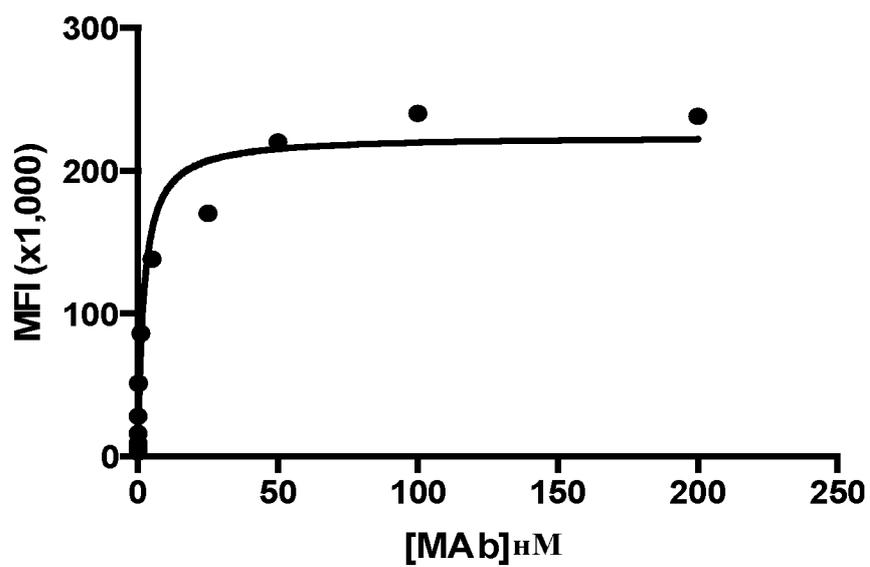
Фигура 1В (продолжение)

VL	Каркас- ный участок 1	CDR 1	Каркас- ный участок 2	CD R2	Каркасный участок 3	CDR3	Каркасный участок 4
YS3	QSVLTQPP SASGTPGQ RVTISCSG S	SSNI GSNT	VNWSRQL PGTAPKL LIY	SNN	QRPSGVPDR FSGSKSGTS ASLAISGLQ SEDEADYYC	AAWDDSLN VYV	FGTGTKVTV L
YS4	KIVLTQSP SSLSASVG DTVTIACR AS	RDIR ND	LAWYQQK PGKAPKL LIY	GAS	SLQSGVPSR FSGSGSGTE FILTISLQ PEDFATYYC	HRLNSYPL T FGGGTKVD IK	
YS8	NFMLTQPA SLSGSPGQ SITISCTG T	SSDV GGYN Y	VSWYQQH PGYAPKL MIY	DVS	NRPSGVSNR FSGSKSGNT ASLTISGLQ AEDEADYYC	SSYTSSST PWV	FGGGTKLTV L
YS7	SYVLTQDP AVSVALGQ TVRITCQG D	SLRS YY	ASWYQQK PGQAPVL VIY	GKN	NRPSGIPDR FSGSSSGNT ASLTITGAQ AEDEADYYC	NSRDSSGN Q	FGGGTKLTV L
YS9	SSELTQDP AVSVALGQ TVRITCQG D	SLRT YY	ASWYQQR PGQAPIL VLY	GKN	NRPSGIPDR FSGSSSGNT ASLTITGAQ AEDEADYYC	NSRDSSGN HVV	FGGGTKLTV L
YS10	QSVLTQPA SVSGSPGQ SITISCTG T	GSDV GSYN Y	VSWYQQN PGKAPKL MIY	EVS	NRPSGVSNR FSGSKSGNT ASLTISGLQ AEDEADYYC	SSYTSSST LV	FGGGTKVTV L
YS11	SELTQDPA VSVALGQT VRITCQGD	SLRS YY	ASWYQQK PGQAPVL VIY	GEN	SRPSGIPDR FSGSSSGNT ASLTITGAQ AEDEADYYC	NSWDSSGN HVV	FGGGTKLTV L
3G7HY	AIRMTQSP SSLSASVG DRVITCR AS	QSI SY	LNWYQQK PGKAPKL LIY	AAS	SLQSGVPSR FSGSGSGTD FTLTISLQ PEDFATYYC	QQSYSTPR T	FGQGTKLEI K

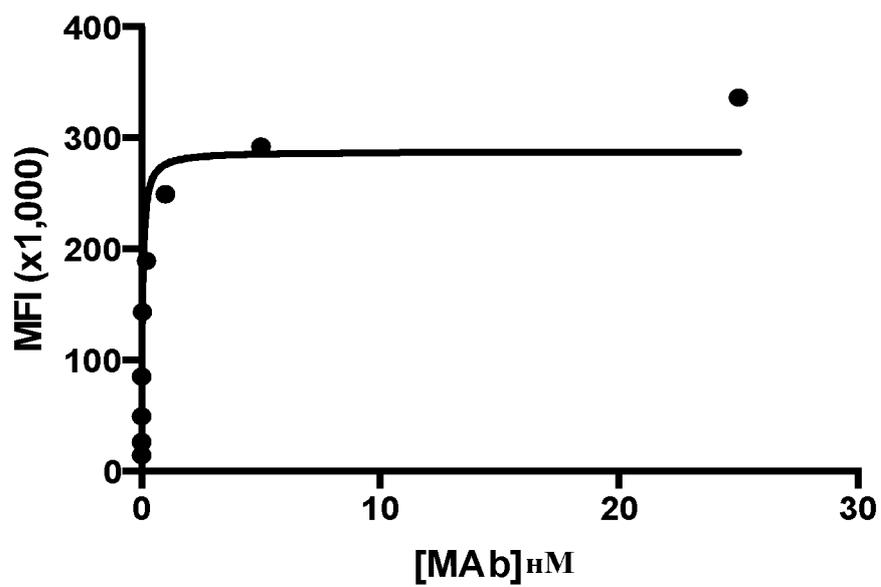
Фигура 1В (продолжение)

VL	Каркас- ный участок 1	CDR 1	Каркас- ный участок 2	CD R2	Каркасный участок 3	CDR3	Каркасный участок 4
3G7NY	DIVMTQSP LSLPVTPG EPASISCR SS	QSLL HSNG YDY	LDWYLQK PGQSPQL LIY	LGS	NRASGVDPDR FSGSGSGTD FTLKISRVE TEDVGIYYC	MQGLQTPS	FGQGTKLEI K
3G7	SSELTQDP AVSVALGQ TVRITCQG D	SLRS YY	ASWYQQK PGQAPVP VIY	GKN	NRPSGIPDR FSGSSSGNT ASLTITGAQ AEDEADYYC	NSRDSST HRGV	FGGGTKLTV L
SB2	DIQLTQSP SSLSASVG DRVTITCR AS	RSIS TY	LSWYQQK PGKAPKL LIY	DAS	RLQNGVPSR FSGSGSDTD FTLTISLQ PEDFATYFC	QQSYNPPW T	FGQGTKLEI K
2C8	QSALTQPA SVSGSPGQ SITISCTG T	SSDV GGYN Y	VSWYQQH PGKAPKL MIY	DVS	NRPSGVSNR FSGSKSGNT ASLTISGLQ AEDEAYYYC	SSYTSSSD PWV	FGGGTQLTV L
UA8kappa	NIQMTQSP SSLSASVG DRVTITCR AG	QPIS TY	VNWyQHK PGKAPKL LIY	GAS	NLQSGVPSR FSGGGSATD FTLTISLQ PEDFATYYC	QQSYSSLL T FGDGTKVE IK	

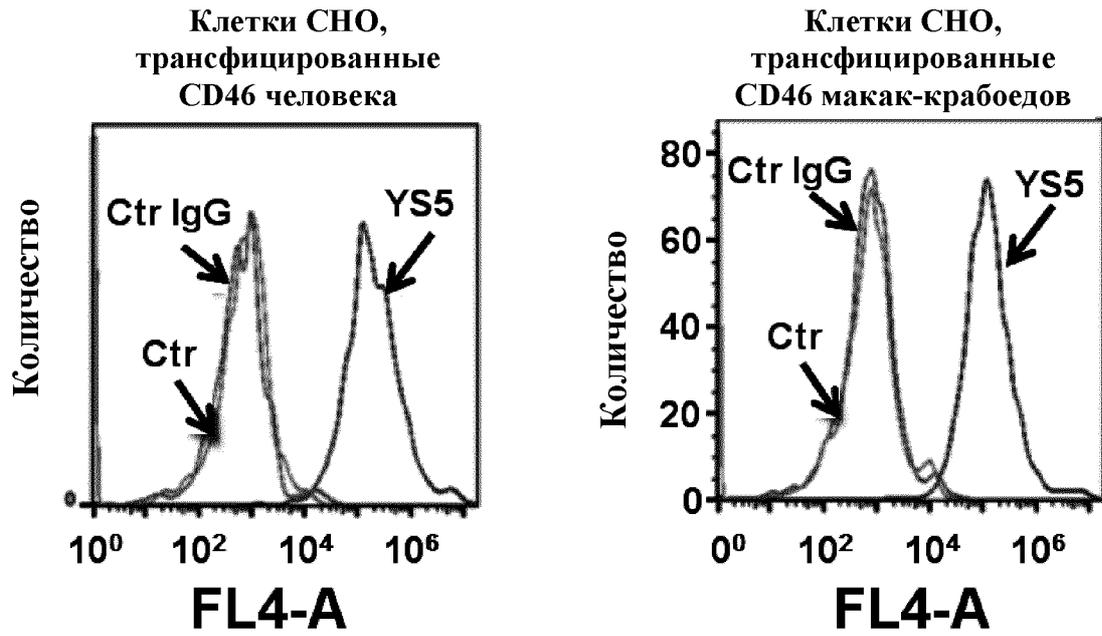
Фигура 2



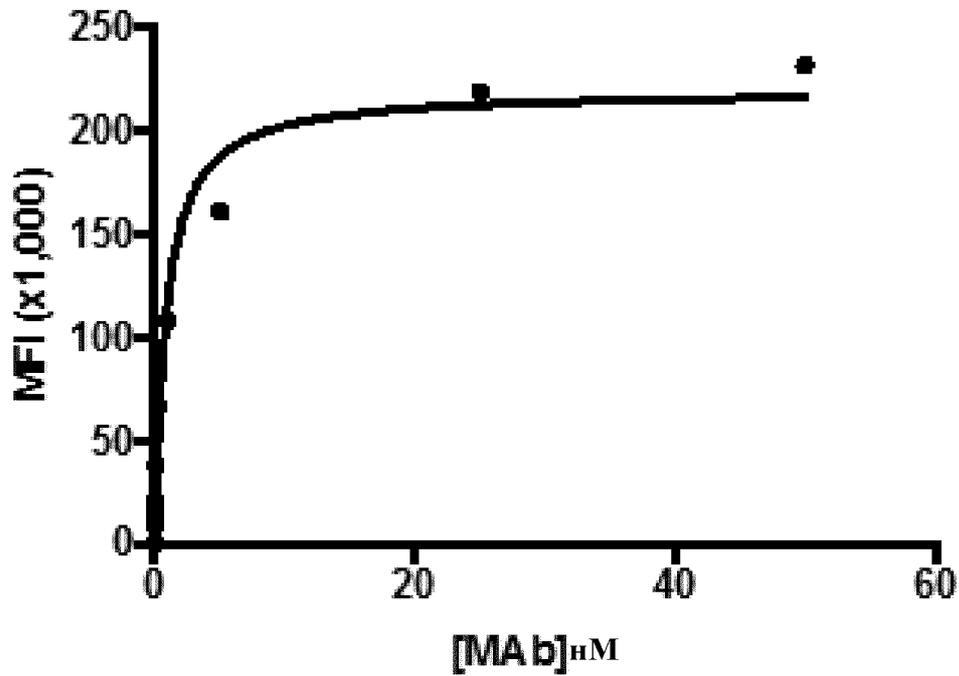
Фигура 3



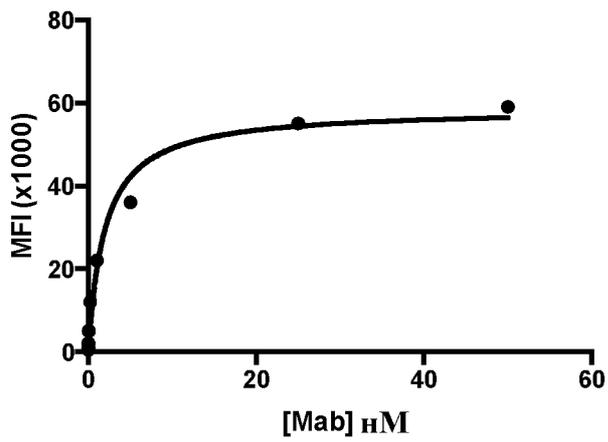
Фигура 4



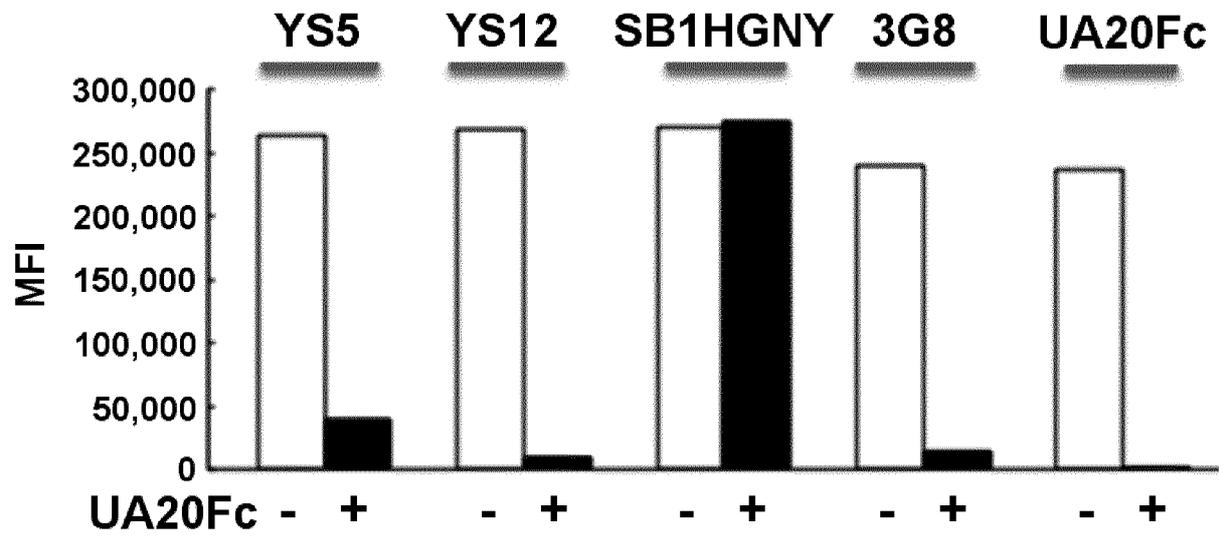
Фигура 5



Фигура 6



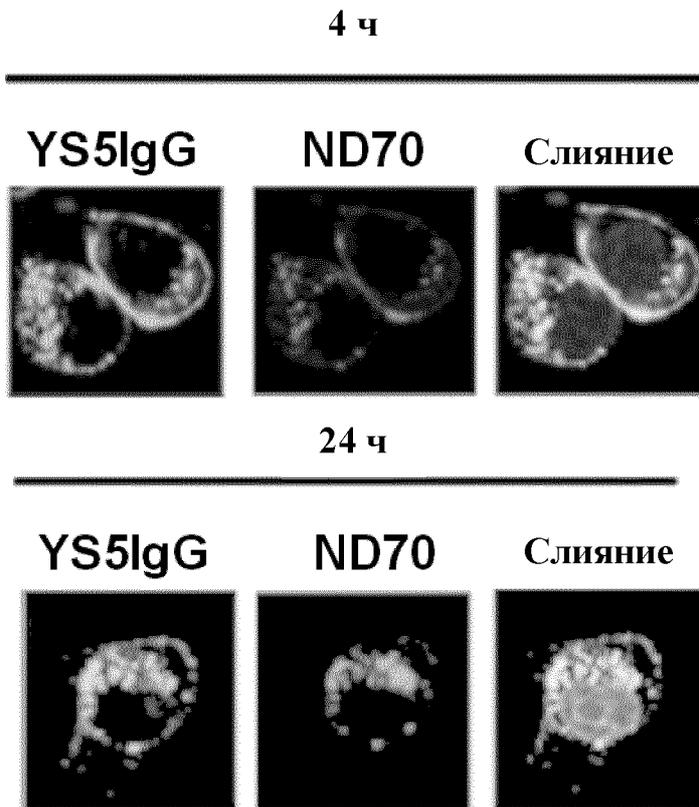
Фигура 7



Фигура 8



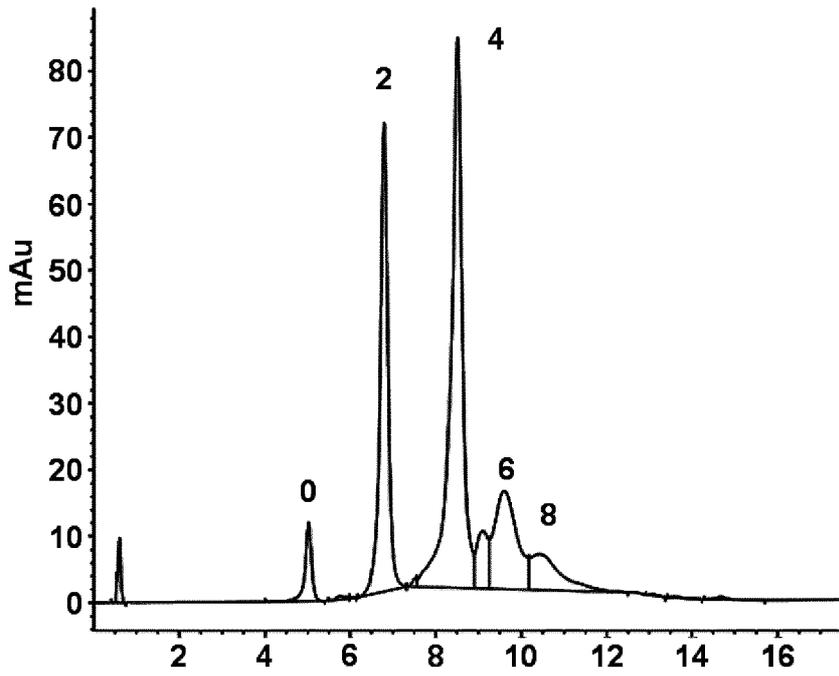
Фигура 9



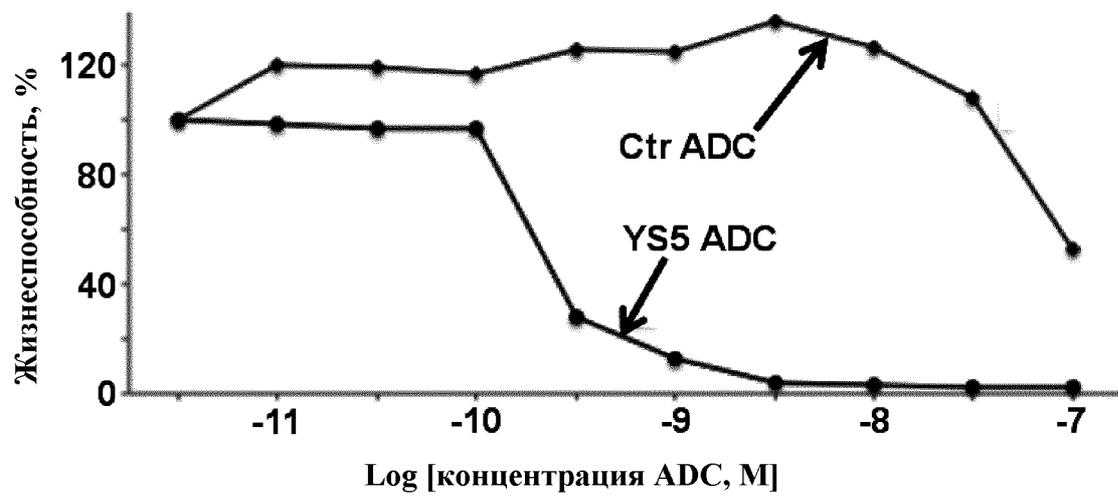
Фигура 10

орган	тип	окрашивание	орган	тип	окрашивание
Лимфоузел	Нормальный		Яичник	Нормальный	
Лимфоузел	Нормальный		Яичник	Нормальный	
Лимфоузел	Нормальный		Яичник	Нормальный	
Скелетная мышца	Нормальный		Поджелудочн. жел.	Нормальный	
Скелетная мышца	Нормальный		Поджелудочн. жел.	Нормальный	
Скелетная мышца	Нормальный		Поджелудочн. жел.	Нормальный	
Предстател. железа	Нормальный		Слюнная железа	Нормальный	
Предстател. железа	Нормальный		Слюнная железа	Нормальный	
Предстател. железа	Нормальный		Слюнная железа	Нормальный	
Почки	Нормальный		Гипофиз	Нормальный	
Почки	Нормальный		Гипофиз	Нормальный	
Почки	Нормальный		Гипофиз	Нормальный	
Печень	Нормальный		Плацента	Нормальный	
Печень	Нормальный		Плацента	Нормальный	
Печень	Нормальный		Плацента	Нормальный	
Легкие	Нормальный		Предстат. железа	Нормальный	
Легкие	Нормальный		Предстат. железа	Нормальный	
Легкие	Нормальный		Предстат. железа	Нормальный	
Желудок	Нормальный		Кожа	Нормальный	
Желудок	Нормальный		Кожа	Нормальный	
Желудок	Нормальный		Кожа	Нормальный	
Пищевод	Нормальный		Спинальный мозг	Нормальный	
Пищевод	Нормальный		Спинальный мозг	Нормальный	
Пищевод	Нормальный		Спинальный мозг	Нормальный	
Сердце	Нормальный		Селезенка	Нормальный	
Сердце	Нормальный		Селезенка	Нормальный	
Сердце	Нормальный		Селезенка	Нормальный	
Толстая кишка	Нормальный		Скелетная мышца	Нормальный	
Толстая кишка	Нормальный		Скелетная мышца	Нормальный	
Толстая кишка	Нормальный		Скелетная мышца	Нормальный	
Тонкая кишка	Нормальный		Яичко	Нормальный	
Тонкая кишка	Нормальный		Яичко	Нормальный	
Тонкая кишка	Нормальный		Яичко	Нормальный	
Периферич. нерв	Нормальный		Тимус	Нормальный	
Периферич. нерв	Нормальный		Тимус	Нормальный	
Периферич. нерв	Нормальный		Тимус	Нормальный	
Гладкая мышца	Нормальный		Щитовидная железа	Нормальный	
Гладкая мышца	Нормальный		Щитовидная железа	Нормальный	
Гладкая мышца	Нормальный		Щитовидная железа	Нормальный	
Мозжечок	Нормальный		Мочеточник	Нормальный	
Мозжечок	Нормальный		Мочеточник	Нормальный	
Мозжечок	Нормальный		Мочеточник	Нормальный	
Большой мозг	Нормальный		Шейка матки	Нормальный	
Большой мозг	Нормальный		Шейка матки	Нормальный	
Большой мозг	Нормальный		Шейка матки	Нормальный	

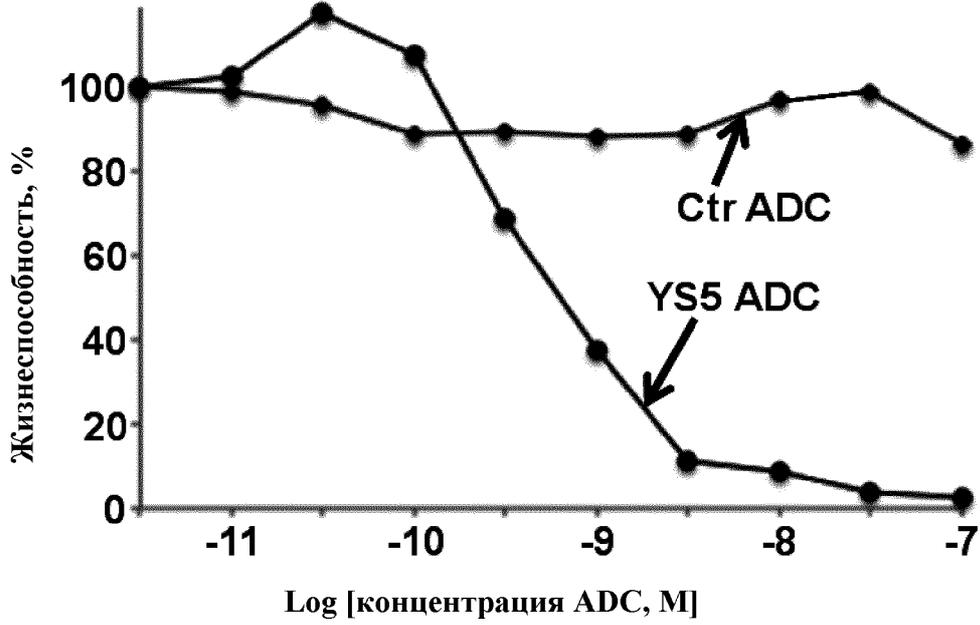
Фигура 11



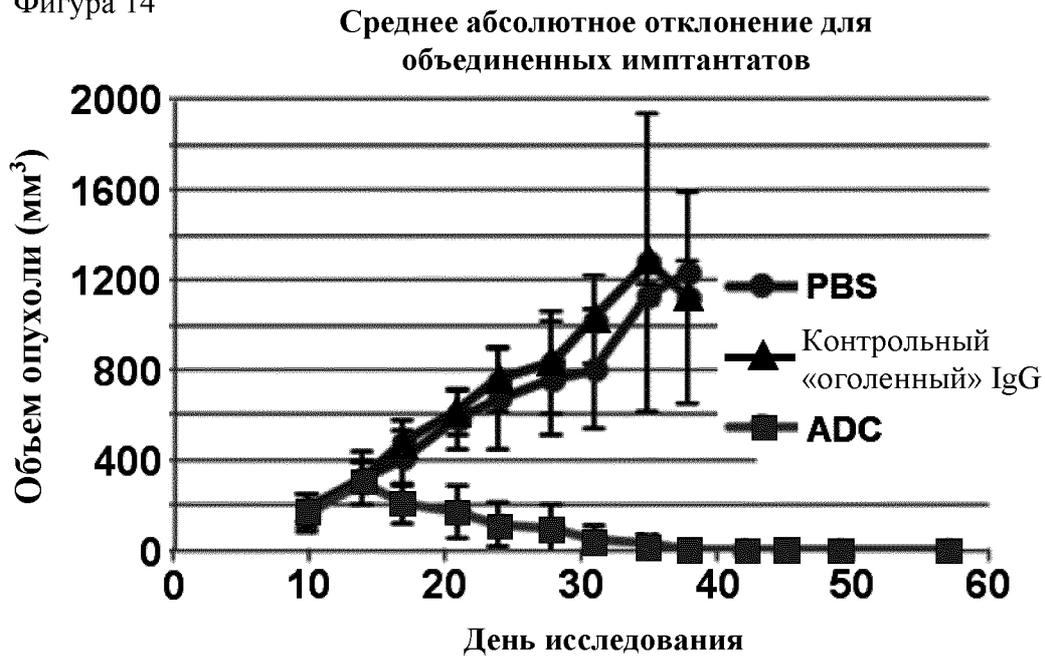
Фигура 12



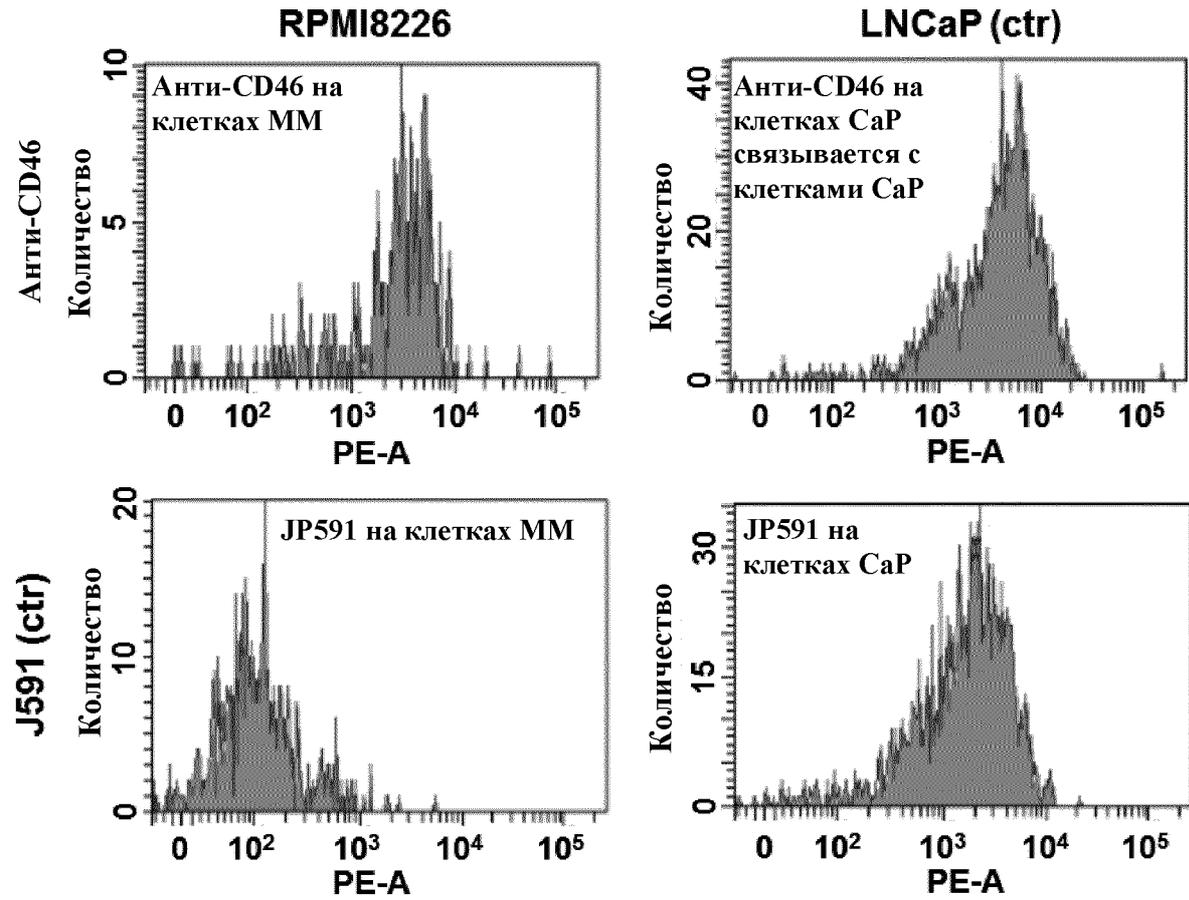
Фигура 13



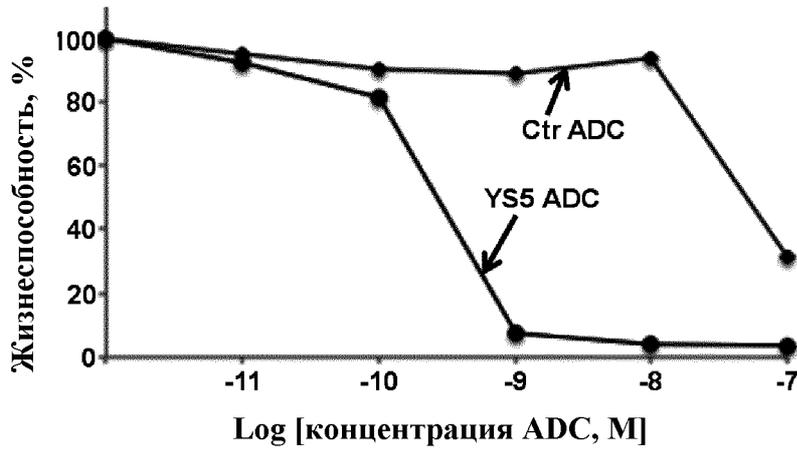
Фигура 14



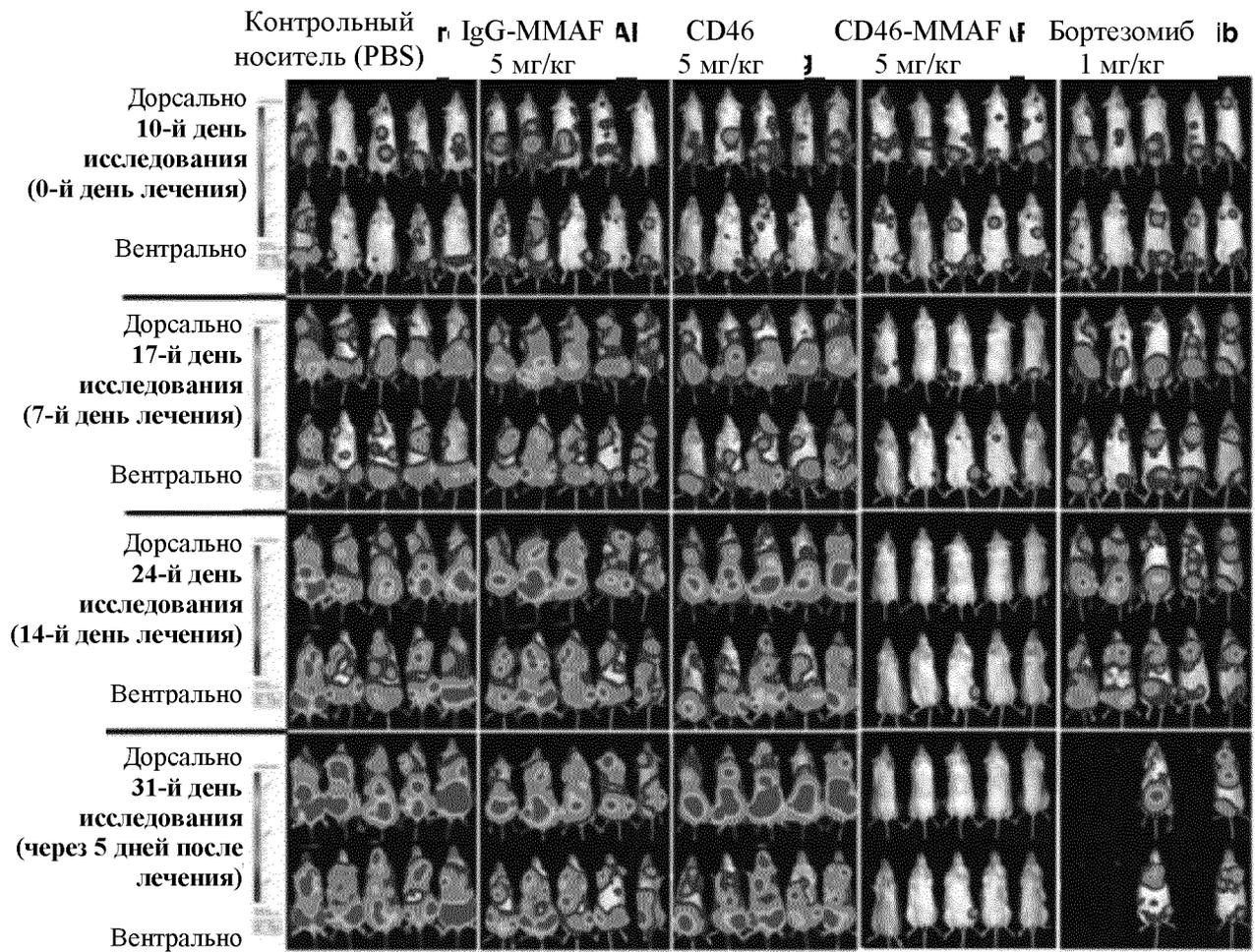
Фигура 15



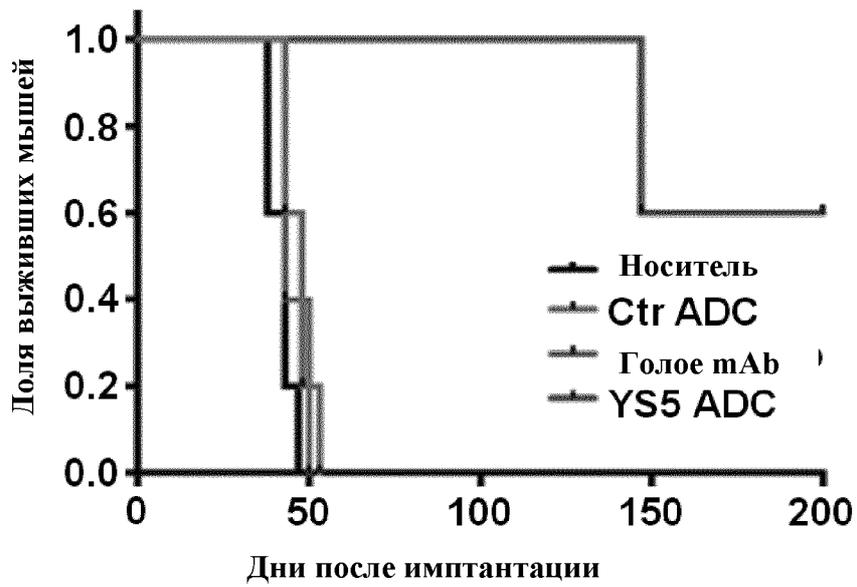
Фигура 16



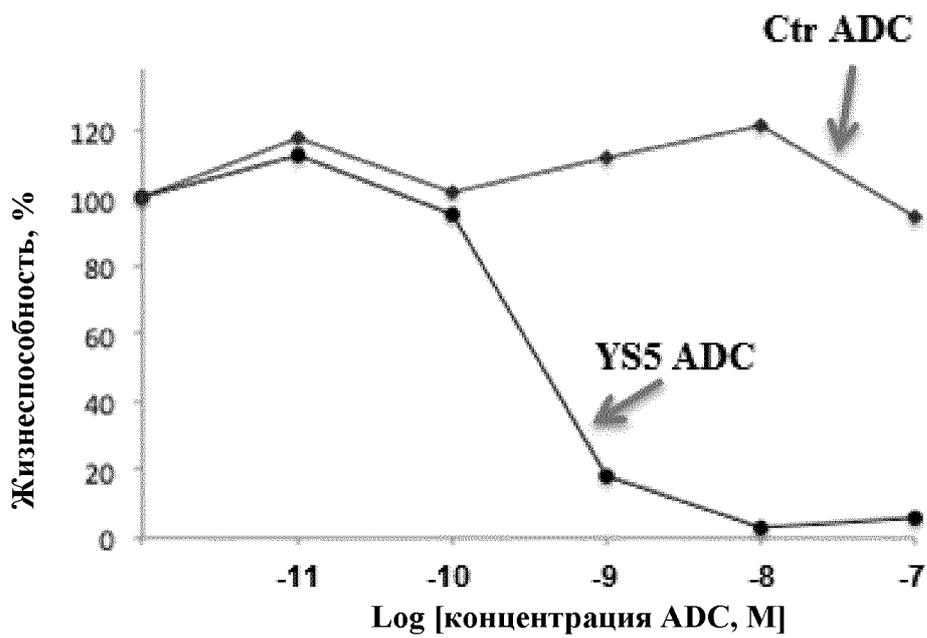
Фигура 17



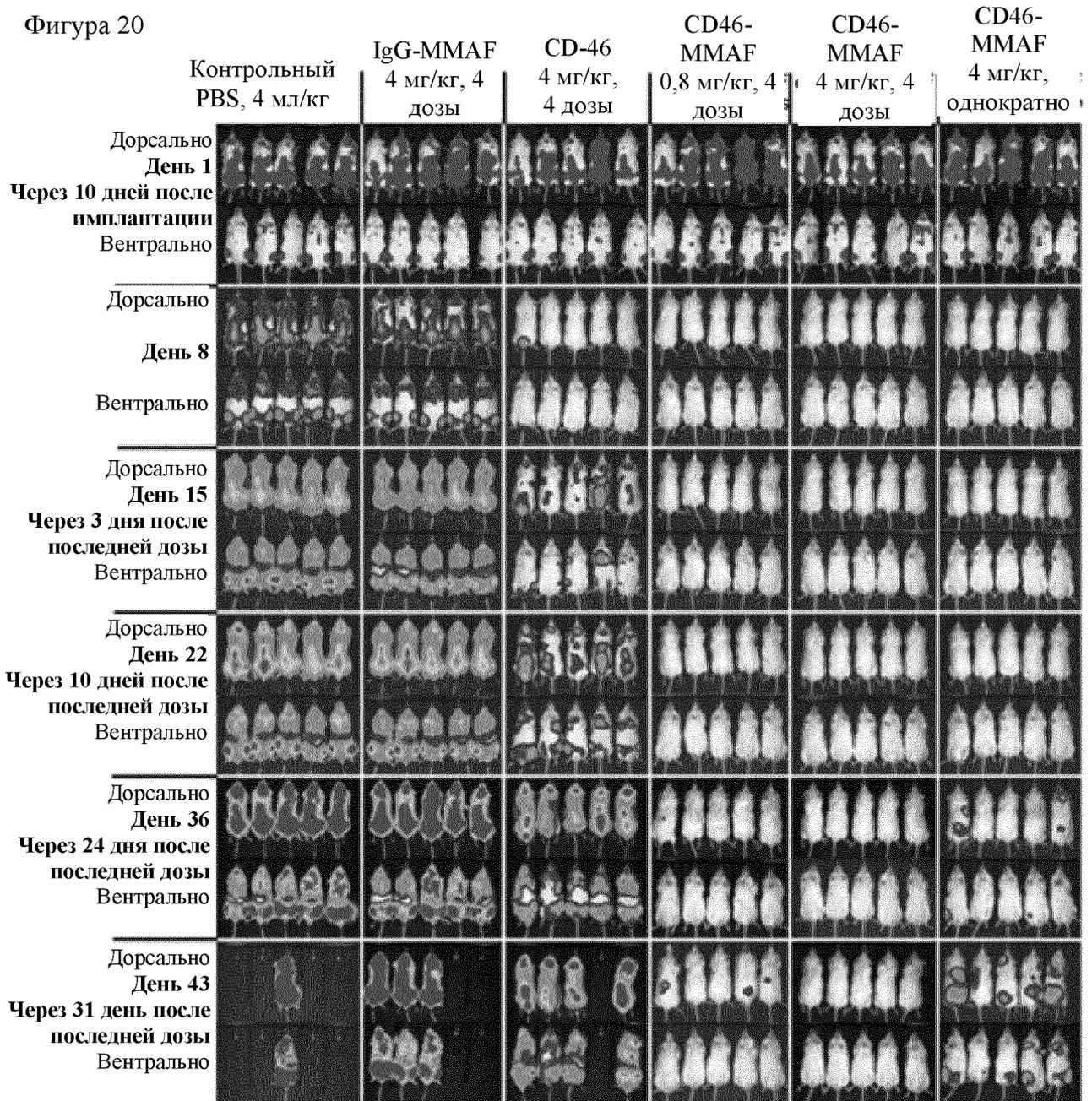
Фигура 18



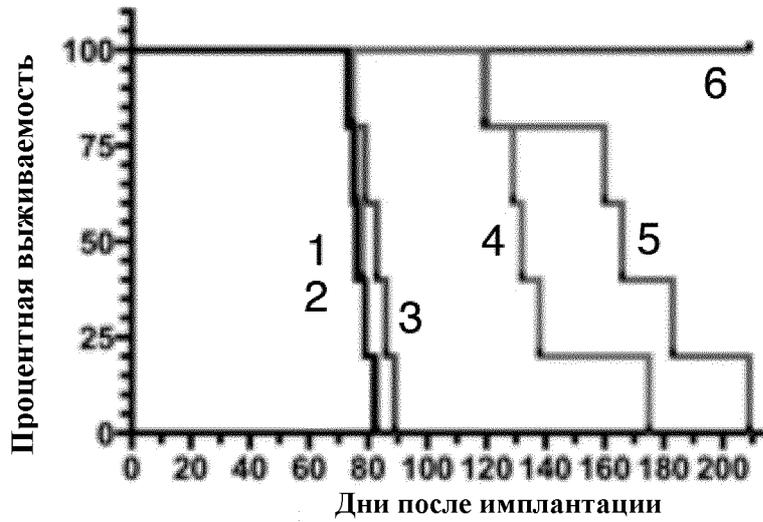
Фигура 19



Фигура 20

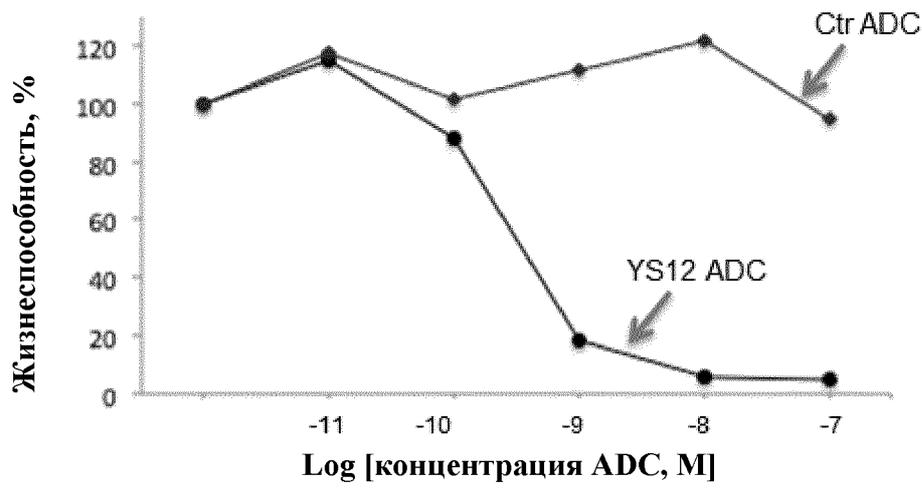


Фигура 21

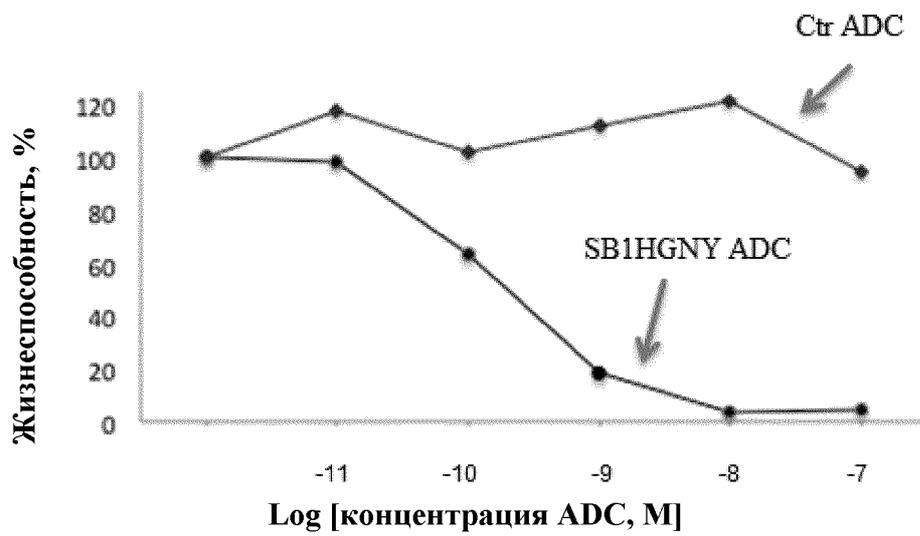


- 1 — PBS
- 2 — Контрольное ADC
- 3 — Голое анти-CD46 mAb
- 4 — Анти-CD46 ADC, 4 мг/кг, однократная доза
- 5 — Анти-CD46 ADC, 0,8 мг/кг, 4 дозы
- 6 — Анти-CD46 ADC, 4 мг/кг, 4 дозы

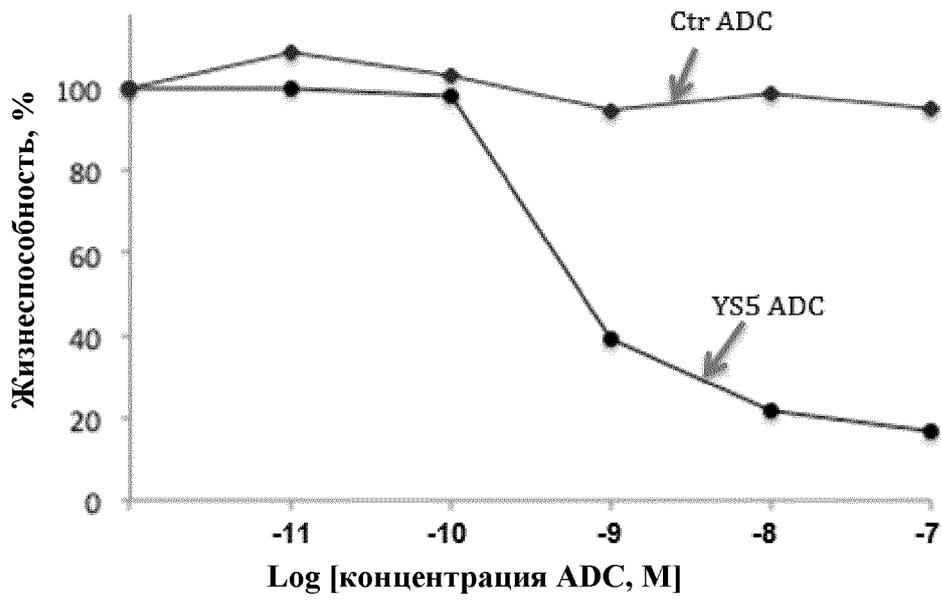
Фигура 22



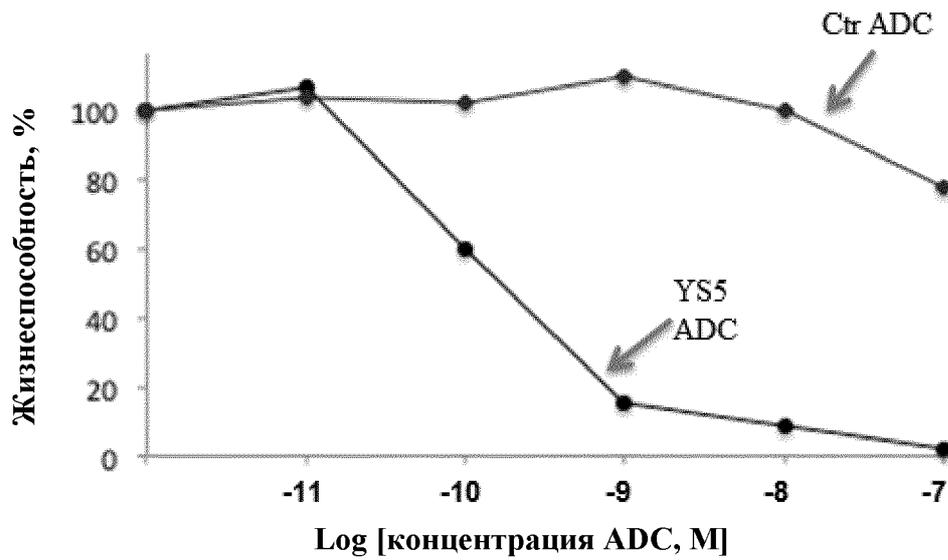
Фигура 23



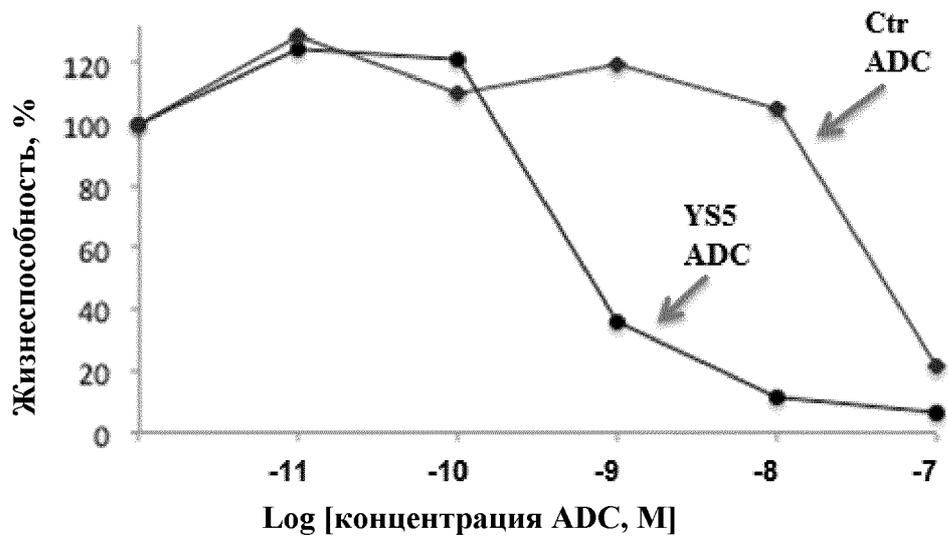
Фигура 24



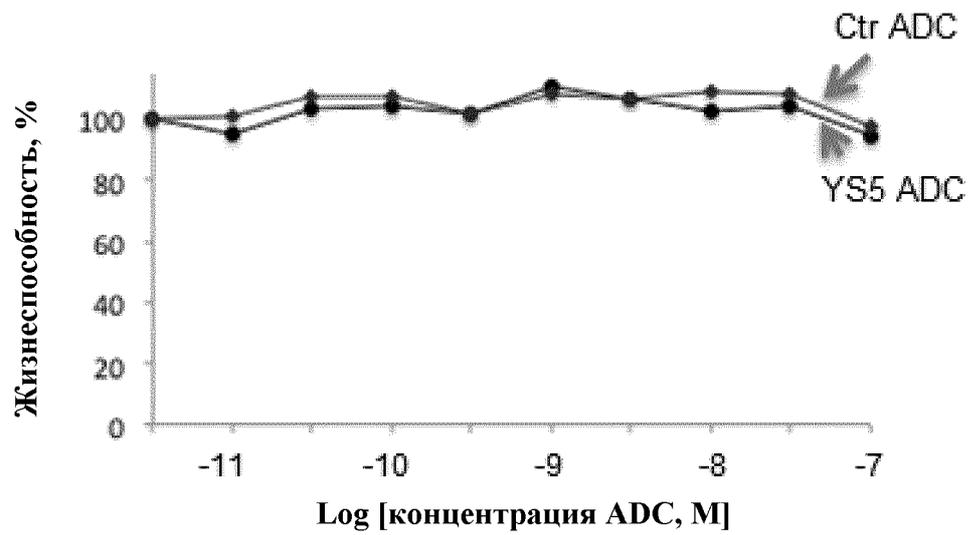
Фигура 25



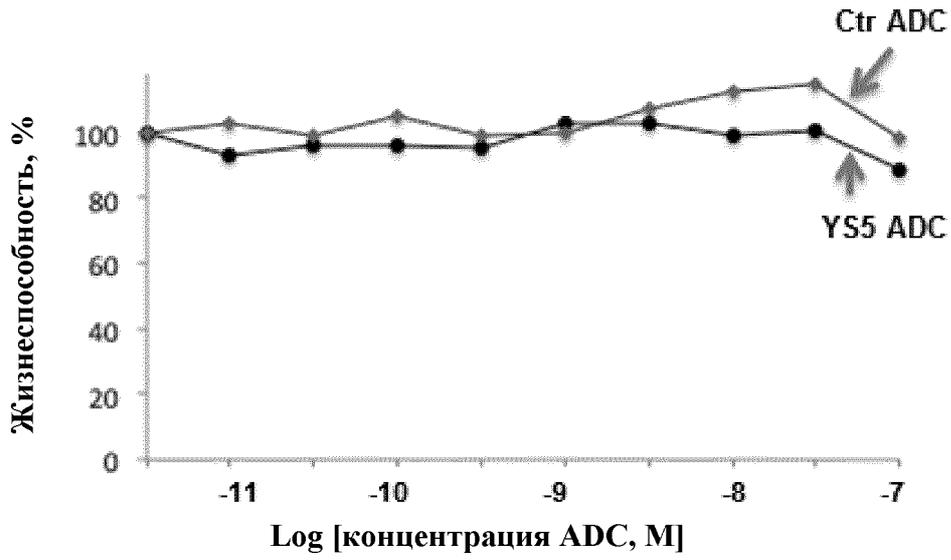
Фигура 26



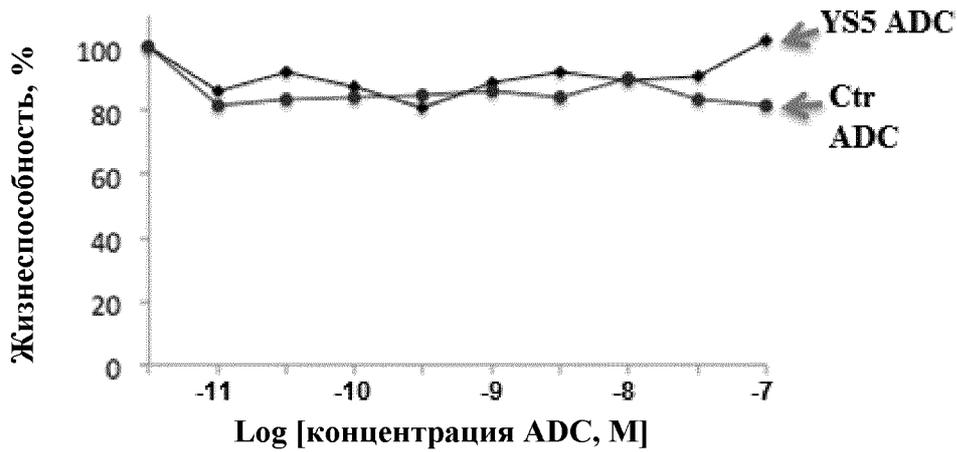
Фигура 27



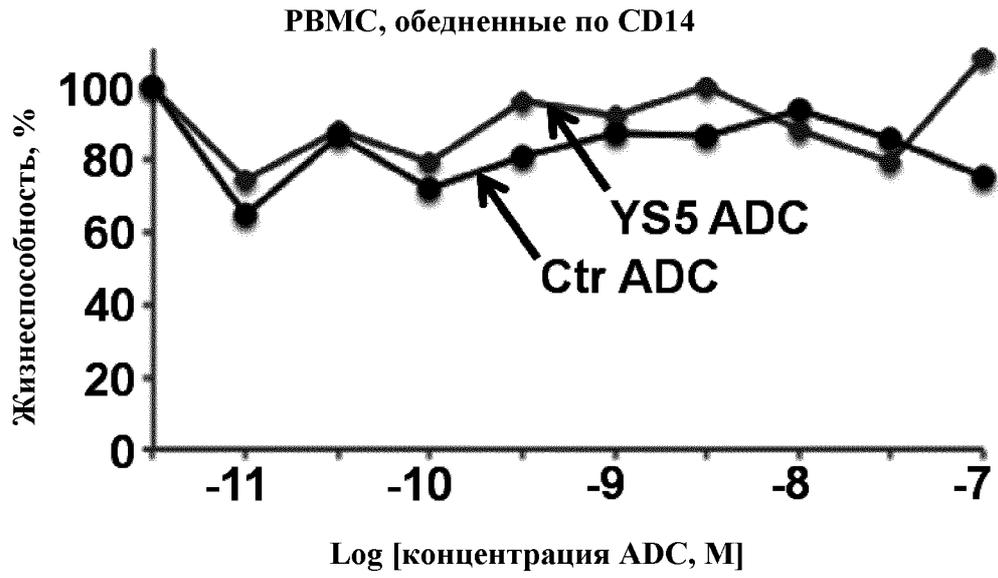
Фигура 28



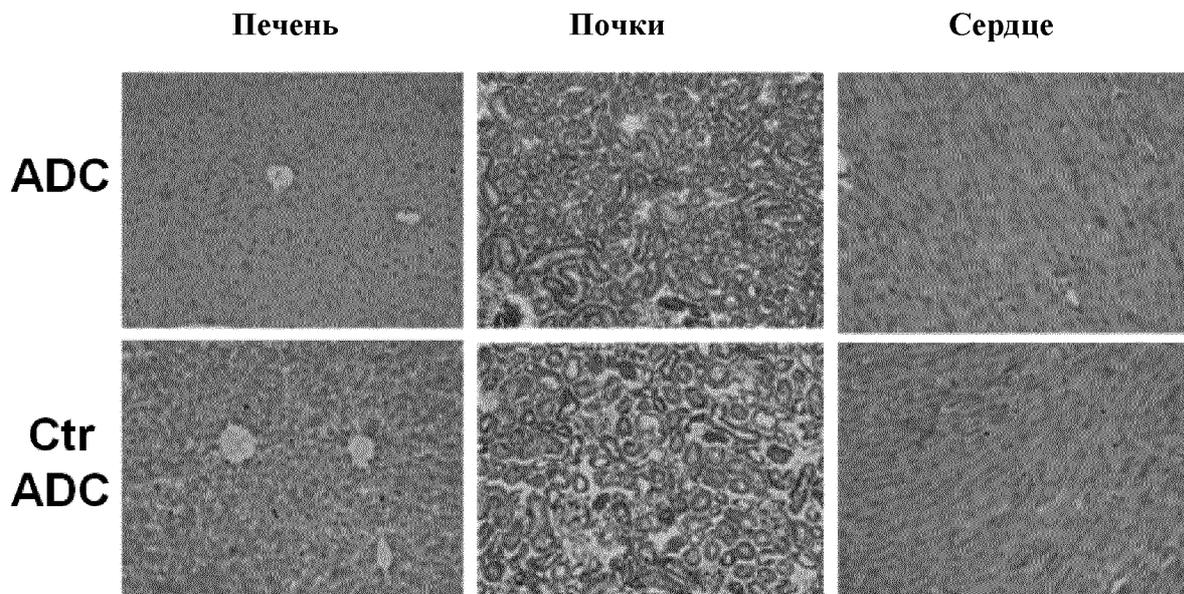
Фигура 29



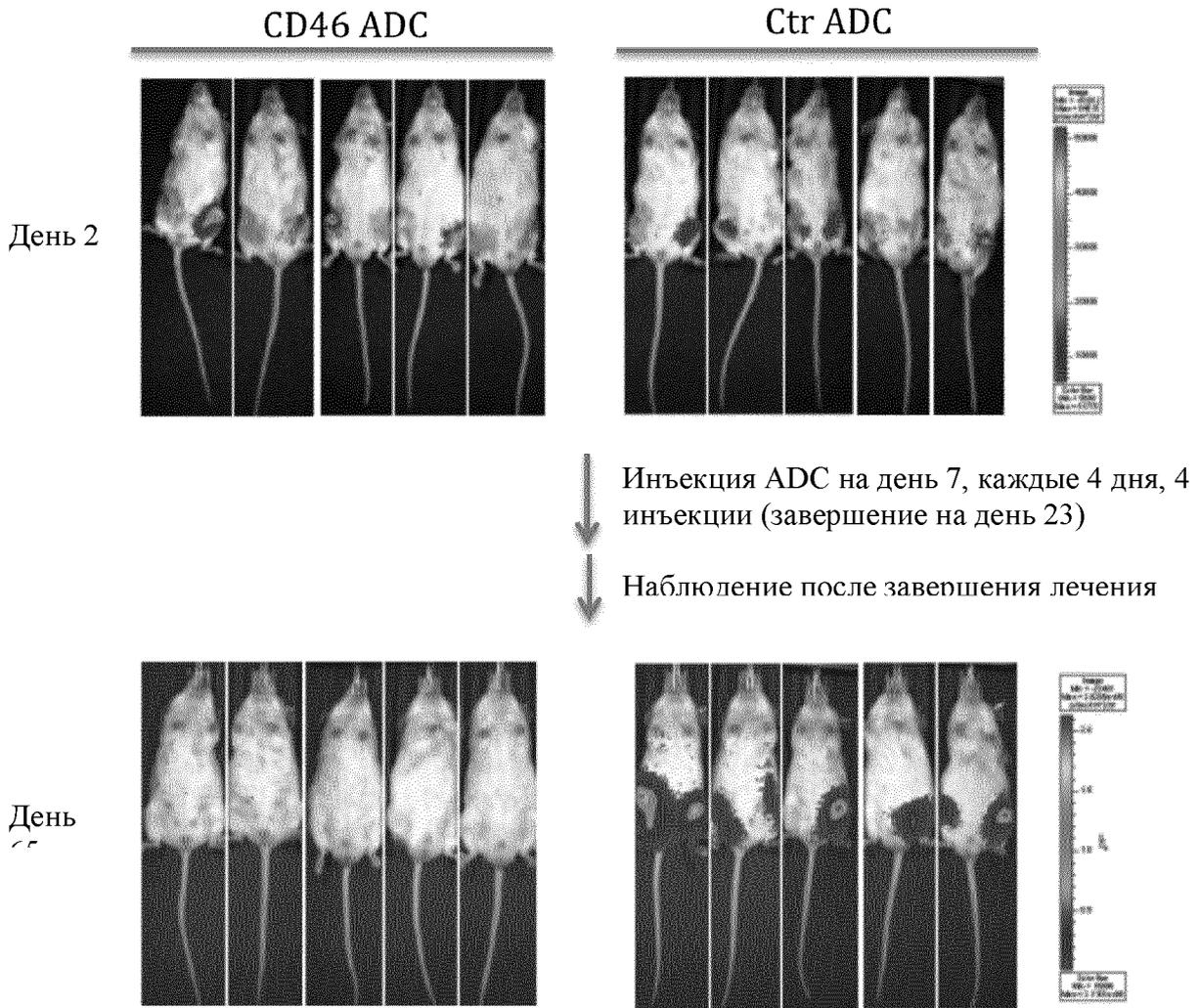
Фигура 30



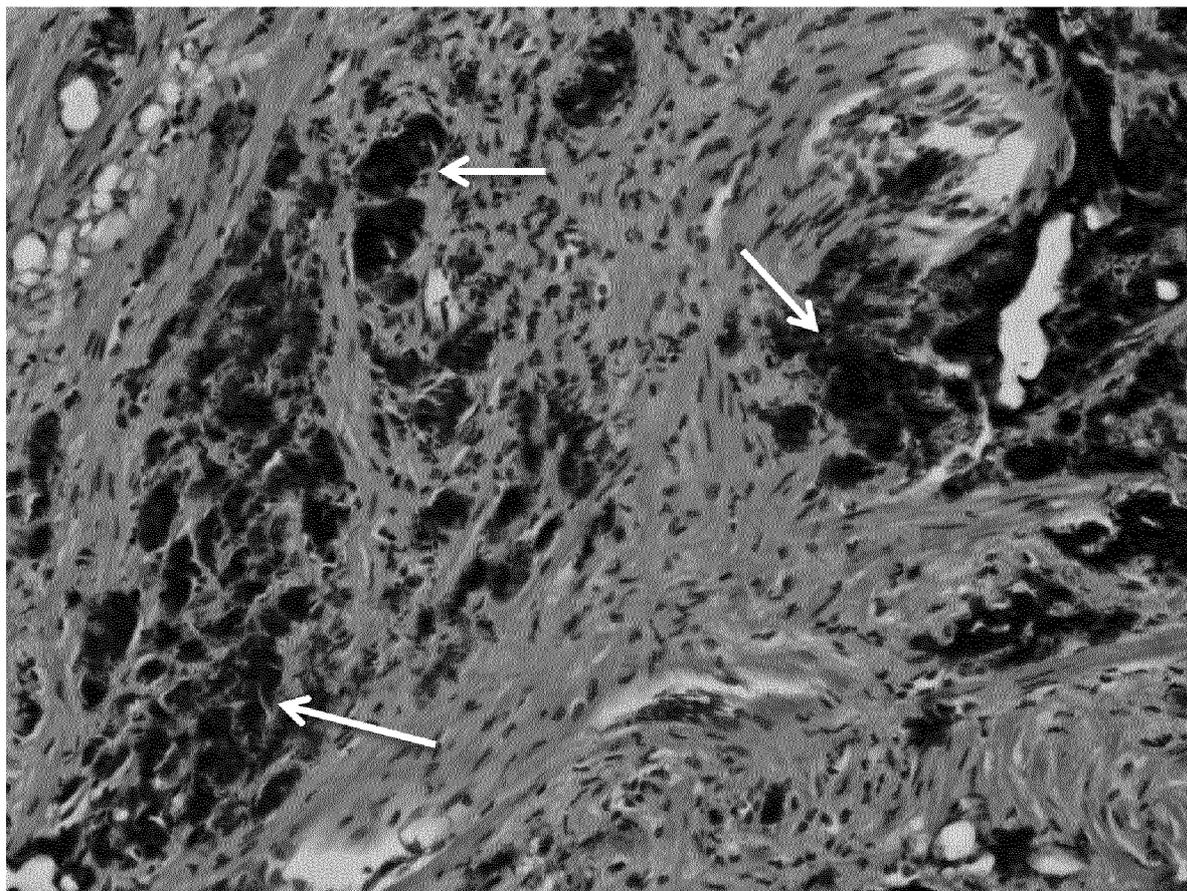
Фигура 31



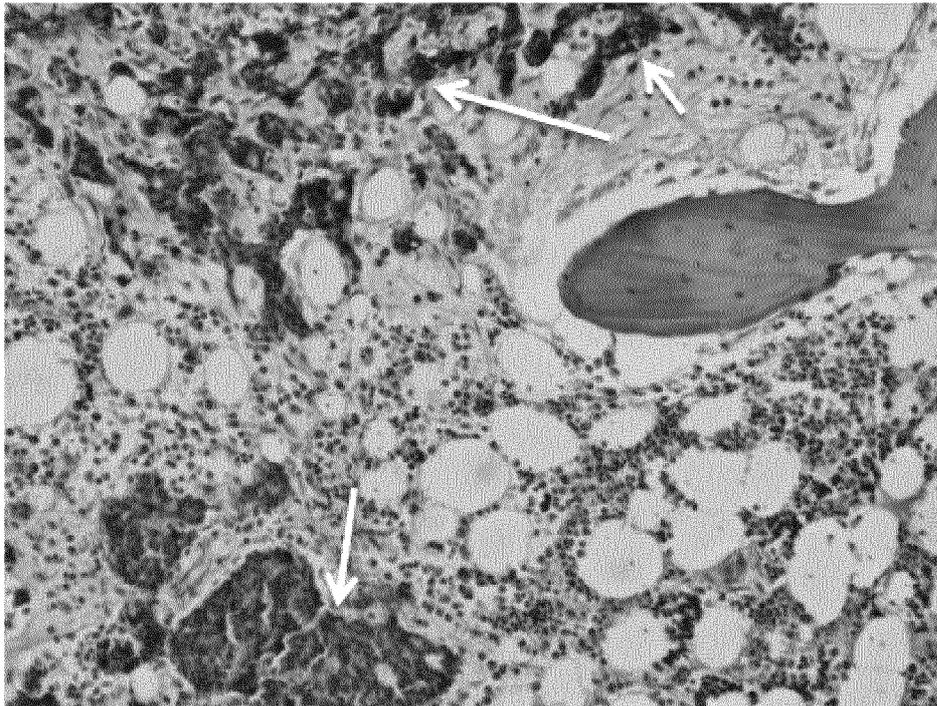
Фигура 32



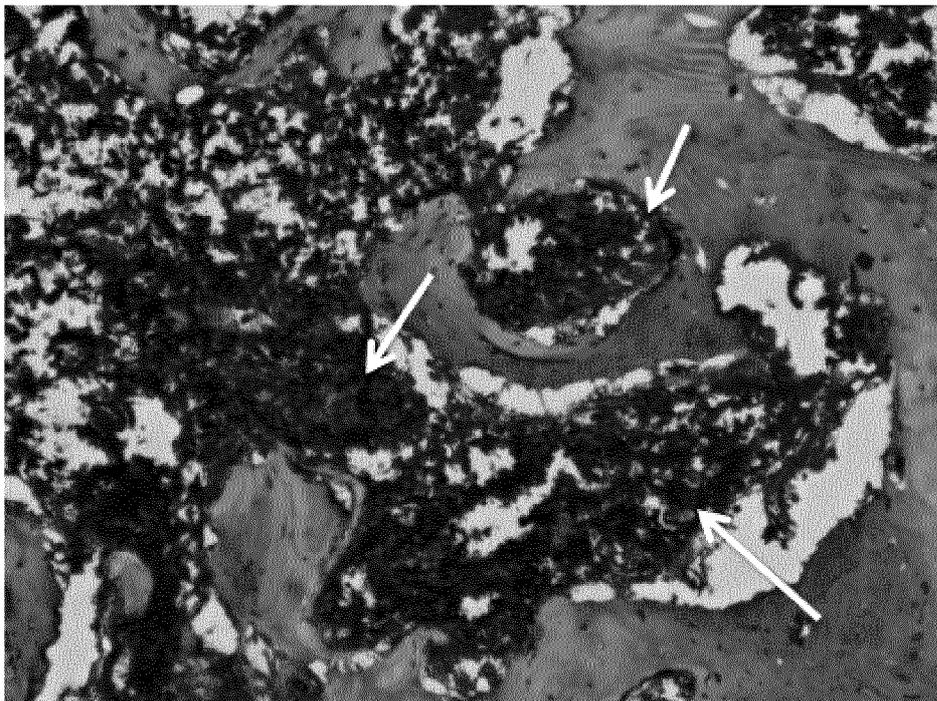
Фигура 33



Фигура 34

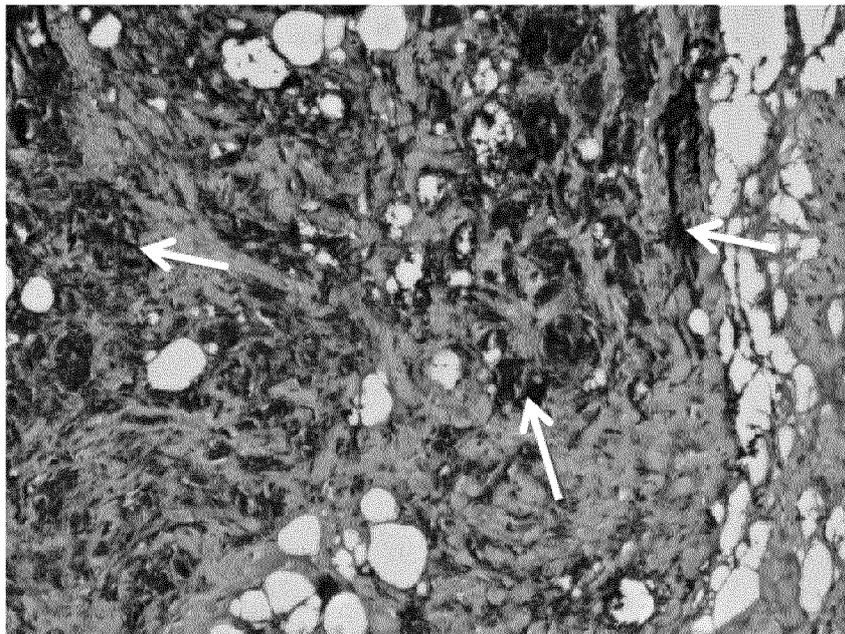


Случай 1

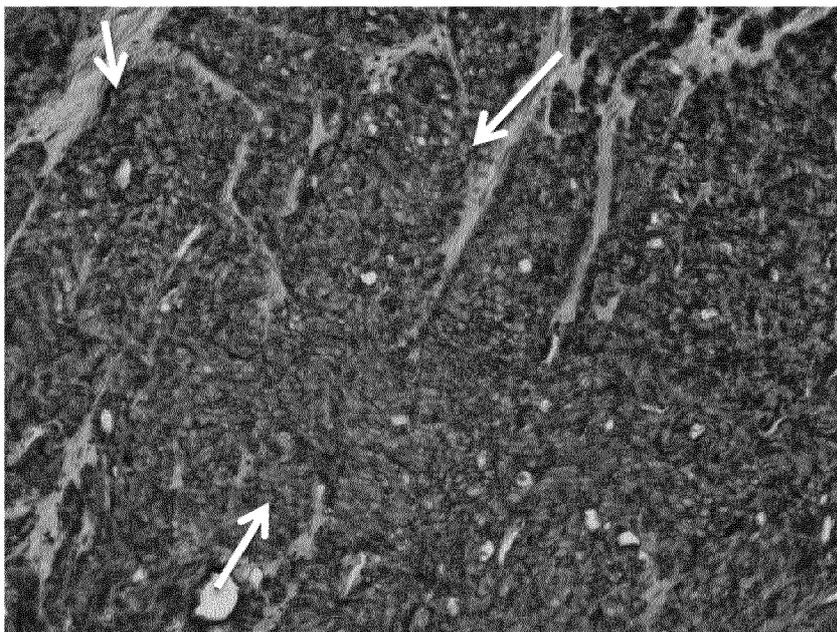


Случай 2

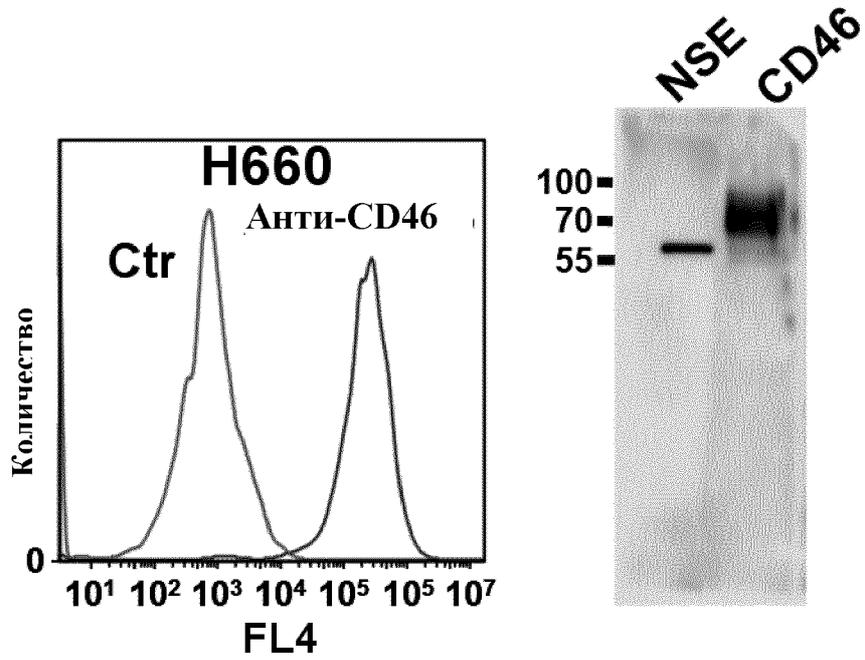
Фигура 35



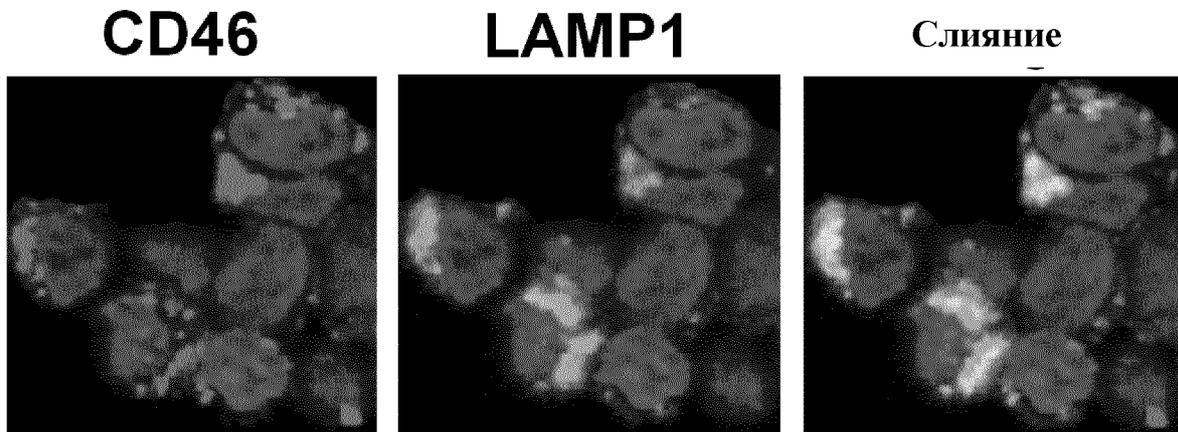
Фигура 36



Фигура 37

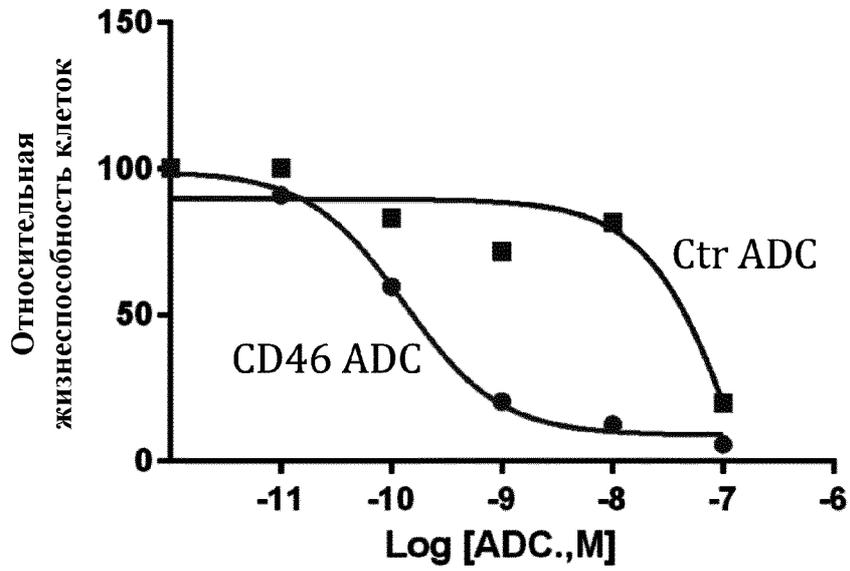


Фигура 38

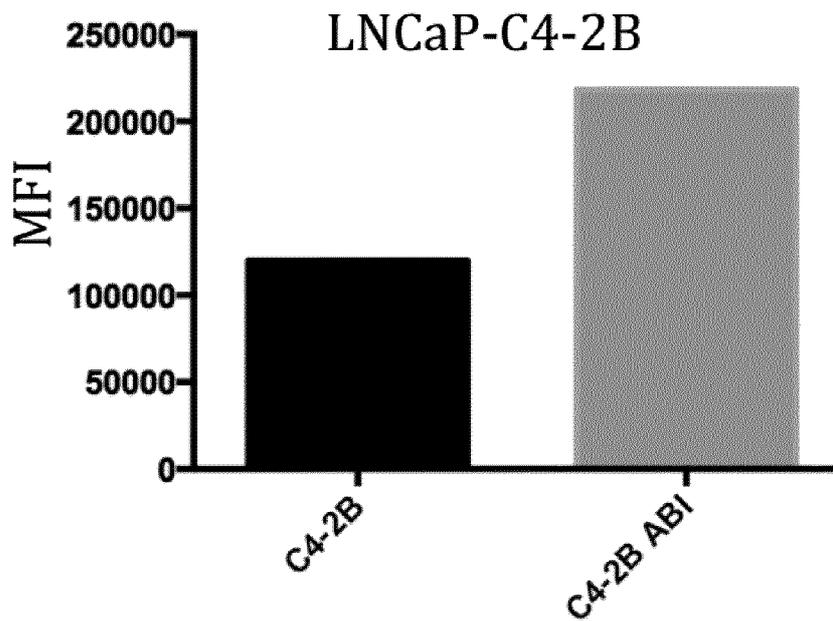
Интернализация и лизосомальный транспорт

Фигура 39

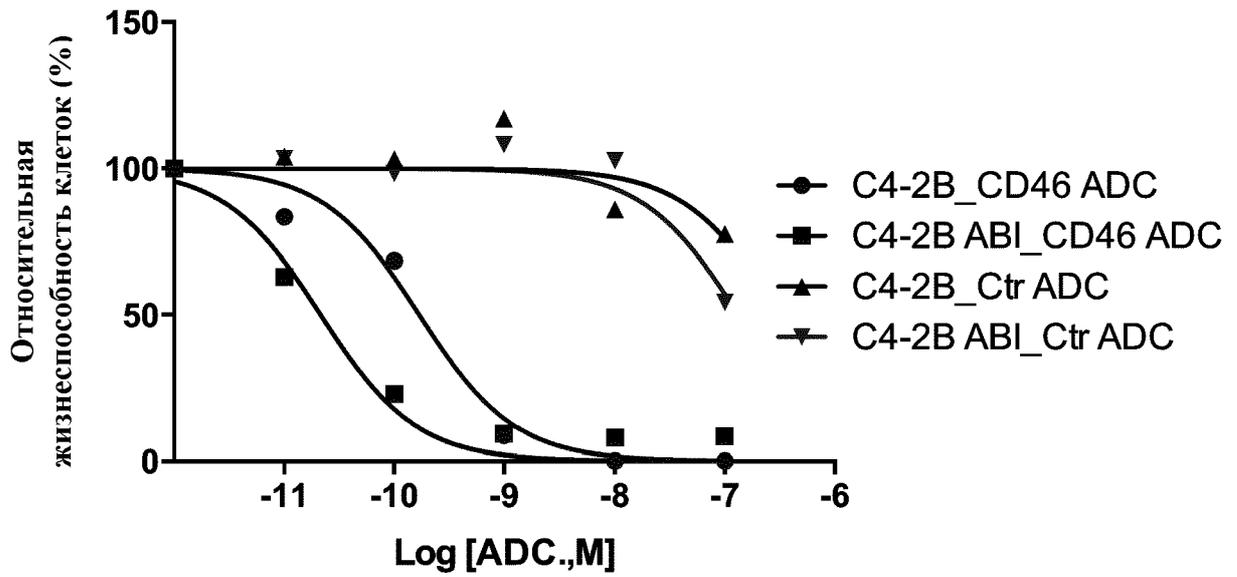
CD46 ADC уничтожает клетки нейроэндокринного рака предстательной железы



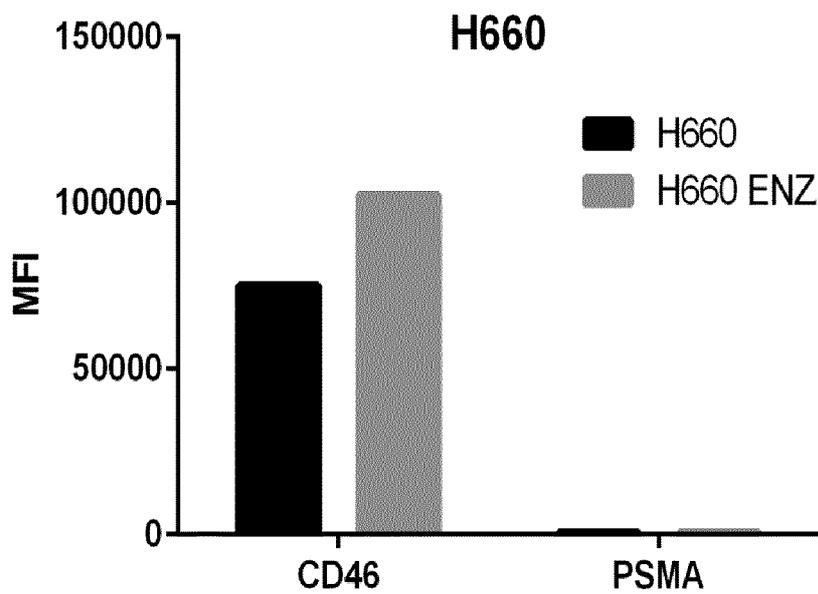
Фигура 40



Фигура 41



Фигура 42

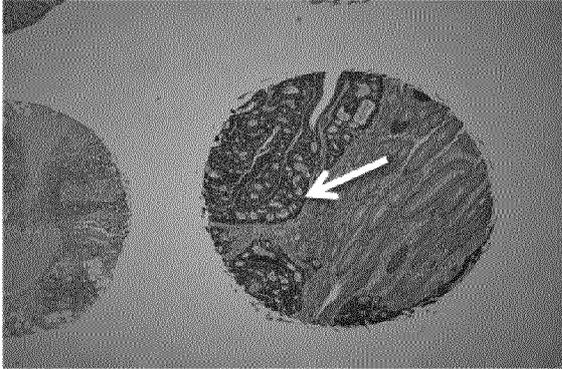


Фигура 43

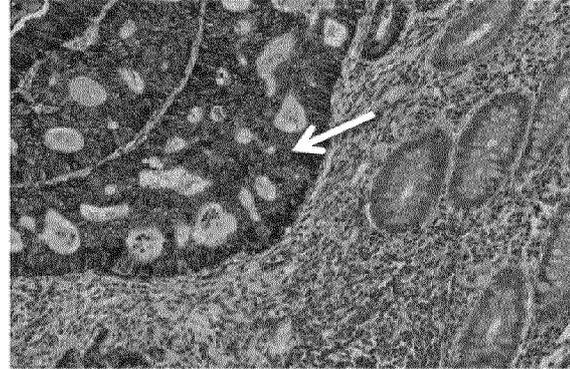
CD46 высоко экспрессируется первичным и метастатическим колоректальным раком

Первичный колоректальный рак

4x



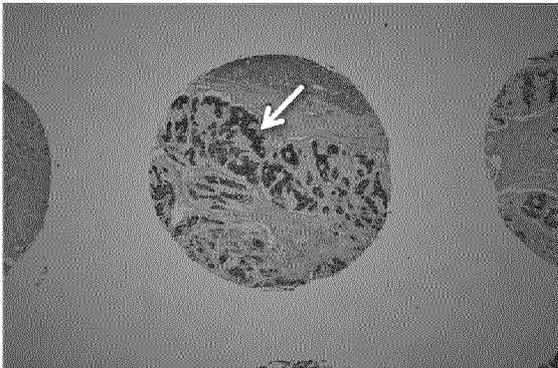
20x



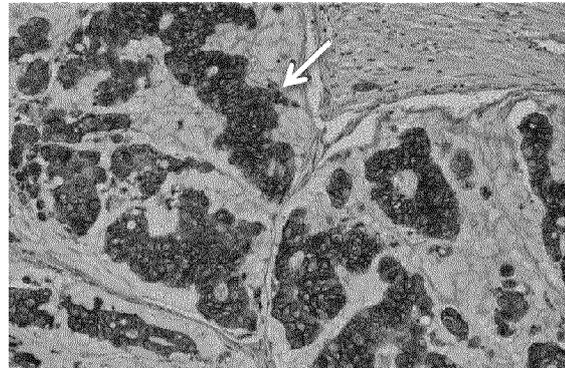
Фигура 44

Метастазы колоректального рака в печени

4x



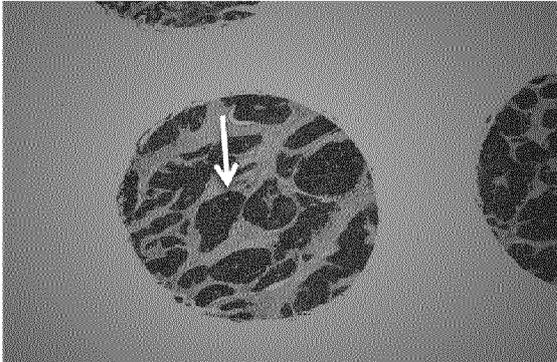
20x



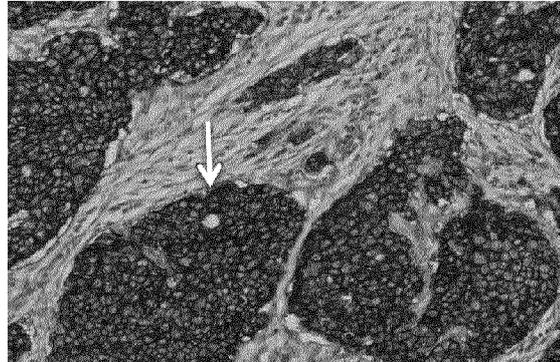
Фигура 45

Метастазы колоректального рака в лимфатических узлах

4x



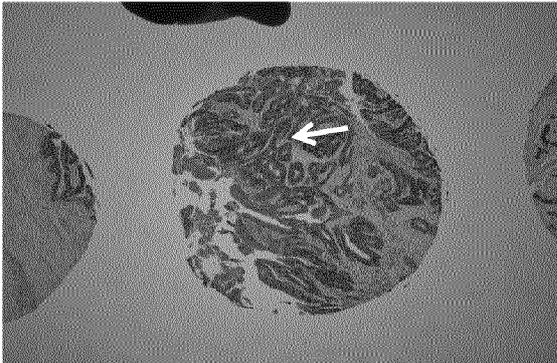
20x



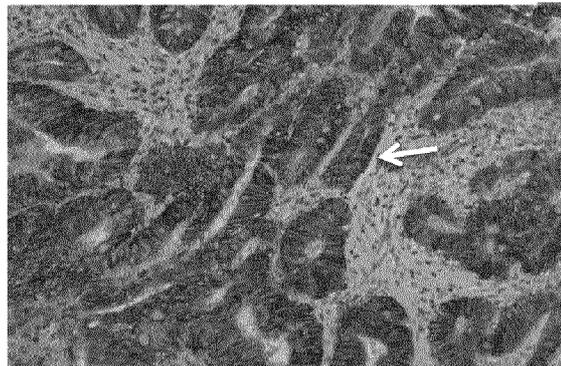
Фигура 46

Метастазы колоректального рака в мочевом пузыре

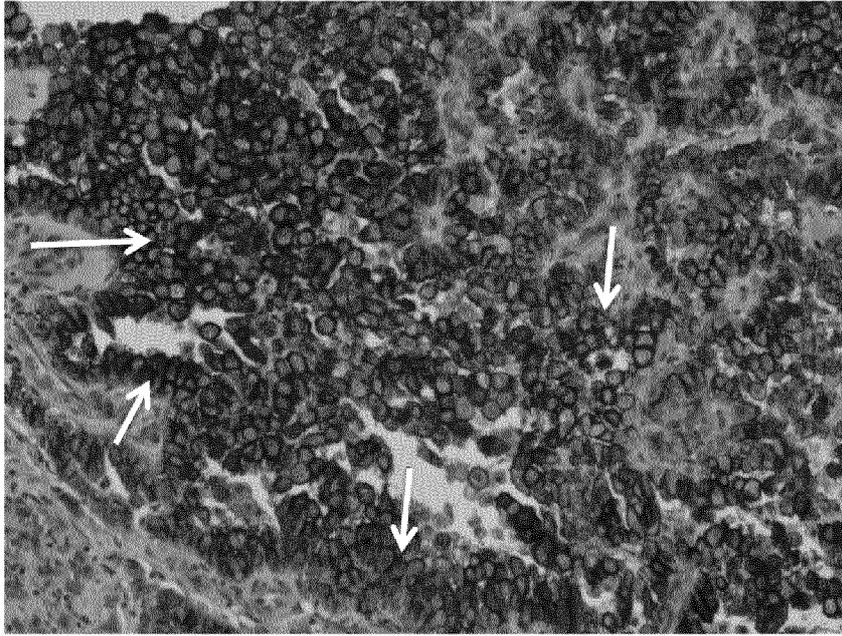
4x



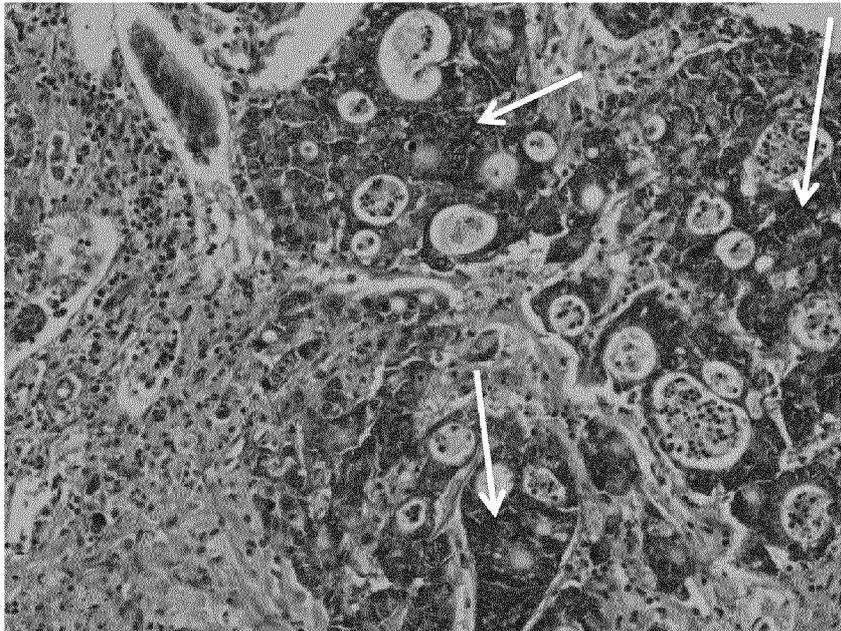
20x



Фигура 47

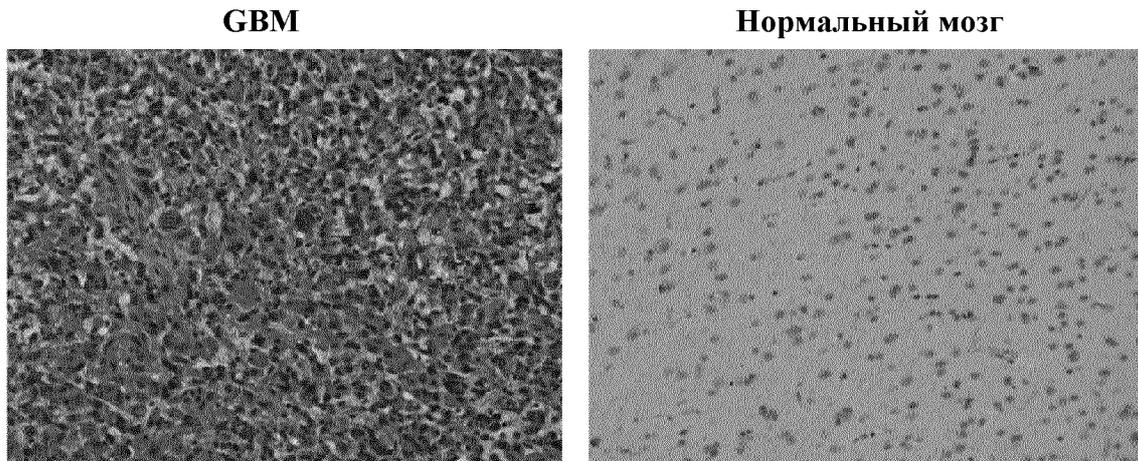


Фигура 48



Фигура 49

CD46 сверхэкспрессируется мультиформной глиобластомой (GBM)



Фигура 50

