

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092981** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2021.07.23

(22) Дата подачи заявки
2019.06.27

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
G01N 33/574 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) **АНТИТЕЛА К L1CAM И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) 10-2018-0075955; 62/865,871

(32) 2018.06.29; 2019.06.24

(33) KR; US

(86) PCT/IB2019/055472

(87) WO 2020/003210 2020.01.02

(71) Заявитель:

**КАНГВОН НЭЙШНЛ
ЮНИВЕРСИТИ ЮНИВЕРСИТИ-
ИНДАСТРИ КООПЕРЭЙШН
ФАУНДЭЙШН (KR)**

(72) Изобретатель:

**Хонг Хайо Джеонг, Чае Хису, Хонг
Джису (KR)**

(74) Представитель:

**Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф.,
Гизатуллина Е.М., Лебедев В.В.,
Парамонова К.В., Джермакян Р.В.,
Христофоров А.А., Угрюмов В.М.,
Костюшенкова М.Ю., Лыу Т.Н. (RU)**

(57) В данном изобретении предложены антитела, которые специфически связываются с L1CAM, и композиции, содержащие такие антитела. В данном документе также предложены способы предотвращения или лечения заболеваний или патологических состояний, которые включают опухоль, с использованием антител к L1CAM.

A1

202092981

202092981

A1

АНТИТЕЛА К L1CAM И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] В данной заявке заявлен приоритет предварительной заявки США № 62/865871, поданной 24 июня 2019 г. и корейской заявки №10-2018-0075955, поданной 29 июня 2018 г., каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ, ПРЕДСТАВЛЕННЫЙ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

[0002] Содержимое представленного в электронном виде перечня последовательностей в текстовом файле ASCII (имя: 4372_001PC02_SL_ST25.txt; размер: 82704 байта; и дата создания: 27 июня 2019 г.), поданном вместе с заявкой, полностью включено в данный документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] В данном изобретении предложены антитела, которые специфически связываются с молекулой адгезии клеток L1 (L1CAM), композиции, содержащие такие антитела, и способ применения таких антител для предотвращения или лечения заболеваний или патологических состояний, которые включают опухоль (например, рак желчных протоков, меланому, рак поджелудочной железы, глиому, рак молочной железы, лимфому, рак легких, рак почек, рак простаты, фибросаркому, аденокарциному толстой кишки, рак печени и/или рак яичников) у субъекта.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Молекула клеточной адгезии L1 (L1CAM) является одной из молекул клеточной адгезии (CAM) суперсемейства иммуноглобулинов, которая опосредует межклеточную адгезию на поверхности клетки. Ее молекулярная масса составляет 200-220 кДа. L1CAM был сначала известен как белок, который опосредует адгезию нейронов и участвует в росте нейритов и миграции нейронов. Lee V. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74:5021-5025 (1997); McGuire JC. *et al.*, *Cell.* 15(2):357-365 (1978).

[0005] L1CAM преимущественно экспрессируется в нормальном мозге человека. Кроме того, экспрессия L1CAM обнаруживается в некоторых гематopoэтических и почечных клетках, периферических нервах, клетках кишечных крипт и ганглиях, но не обнаруживается в других нормальных клетках. Huszar M. *et al.*, *Human Pathology* 37:1000-1008 (2006).

[0006] Антитело, которое избирательно связывается с белком L1CAM, можно использовать для диагностики и предотвращения или лечения заболеваний, при которых L1CAM сверхэкспрессируется (например, рака). Соответственно, существует необходимость в разработке антител, которые избирательно связываются с L1CAM и способны модулировать активность L1CAM.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] Один аспект данного изобретения относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое избирательно связывается с тем же эпитопом молекулы адгезии клеток L1 (L1CAM), что и эталонное антитело, содержащее варибельную область тяжелой цепи (VH) и варибельную область легкой

цепи (VL), причем: (a) VH эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 23 и VL эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 24, (b) VH эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 25 и VL эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 26, (c) VH эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 27 и VL эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 28, (d) VH эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 29 и VL эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 30 или (e) VH эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 31 и VL эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 32.

[0008] Также в данном документе предложено антитело к L1CAM или его антигенсвязывающий фрагмент, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющую комплементарность область 1 (CDR1) VH, CDR2 VH и CDR3 VH, и CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, причем по меньшей мере одна аминокислота в CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и/или CDR3 VL антитела или его антигенсвязывающего фрагмента отличается от CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и/или CDR3 VL антитела mAb417, и причем CDR1 VH антитела mAb417 содержит RFGMH (SEQ ID NO: 2); CDR2 VH антитела mAb417 содержит FISNDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 9); CDR3 VH антитела mAb417 содержит GRAYGSGSLFDP (SEQ ID NO: 10); CDR1 VL антитела mAb417 содержит RASRTISIVVN (SEQ ID NO: 6); CDR2 VL антитела mAb417 содержит AASNLHS (SEQ ID NO: 7); и CDR3 VL антитела mAb417 содержит QQSIGRQVVT (SEQ ID NO: 11).

[0009] В настоящем изобретении дополнительно предложено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое перекрестно конкурирует за связывание с эпитопом L1CAM с эталонным антителом, содержащим переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), причем: (a) VH эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 23 и VL эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 24, (b) VH эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 25 и VL эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 26, (c) VH эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 27 и VL эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 28, (d) VH эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 29 и VL эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 30, или (e) VH эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 31 и VL эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 32, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющую комплементарность область 1 (CDR1) VH, CDR2 VH, и CDR3 VH, и CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, причем по меньшей мере одна аминокислота в CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и/или CDR3 VL антитела или его антигенсвязывающего фрагмента отличается от CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и/или CDR3 VL антитела mAb 417, и где CDR1 VH антитела mAb417 содержит RFGMH (SEQ ID NO: 2); CDR2 VH антитела mAb417 содержит FISNDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 9); CDR3 VH антитела mAb417 содержит GRAYGSGSLFDP (SEQ ID NO: 10); CDR1 VL антитела mAb417 содержит RASRTISIVVN (SEQ ID NO: 6); CDR2 VL антитела mAb417 содержит AASNLHS (SEQ ID NO: 7); и CDR3 VH антитела mAb417 содержит QQSIGRQVVT (SEQ ID NO: 11).

[0010] В некоторых аспектах по меньшей мере одно различие в аминокислотах включает (i) глутамин в 5 остатке в CDR2 VH; (ii) серин в 8 остатке в CDR1 VL; и/или (iii) пролин в 8 остатке в CDR3 VL антитела к L1CAM или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых аспектах по меньшей мере одно различие в аминокислотах включает (i) аланин, глицин, фенилаланин, тирозин, треонин, пролин и триптофан в остатках с 3 по 9, соответственно, в CDR3 VL; (ii) аланин, глицин, фенилаланин, тирозин, серин, пролин и триптофан на остатках с 3 по 9, соответственно, в CDR3 VL или (iii) лейцин, валин или гистидин, триптофан или фенилаланин, тирозин, пролин и триптофан в 4-9 остатках, соответственно, в CDR3 VL антитела к L1CAM или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых аспектах описанное в данном документе антитело к L1CAM или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR3 VL антитела или его антигенсвязывающий

фрагмент содержит SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19 или SEQ ID NO:21. В некоторых аспектах CDR1 VH антитела к L1CAM содержит RFGMH (SEQ ID NO:2). В некоторых аспектах CDR2 VH антитела к L1CAM содержит FISNEGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO:10). В некоторых аспектах CDR3 VH антитела к L1CAM содержит GRAYGSGSLFDP (SEQ ID NO:4). В некоторых аспектах CDR1 VL антитела к L1CAM содержит RASRTISSYVN (SEQ ID NO:12). В некоторых аспектах CDR2 VL антитела к L1CAM содержит AASNLHS (SEQ ID NO:7). В некоторых аспектах CDR3 VL антитела к L1CAM содержит QQSIGRGPVT (SEQ ID NO:13).

[0011] В некоторых аспектах антитело к L1CAM или его антигенсвязывающий фрагмент согласно данному изобретению содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, где CDR3 легкой цепи содержит QQSIGRGPVT (SEQ ID NO:13), QQAGFYTPWT (SEQ ID NO:15), QQAGFYSPWT (SEQ ID NO:17), QQSLHFYPWT (SEQ ID NO:19) или QQSLVWYPWT (SEQ ID NO:21).

[0012] В настоящем изобретении дополнительно предложено описанное в данном документе антитело к L1CAM или его антигенсвязывающий фрагмент, который имеет одну или более характеристик, выбранных из группы, состоящей из: (a) проявляет повышенную продуцируемость по сравнению с антителом mAb417; (b) проявляет повышенную аффинность, измеренную с помощью константы равновесной диссоциации (K_D), по сравнению с антителом mAb417; (c) проявляет повышенное значение PI по сравнению с антителом mAb417; (d) проявляет повышенную аффинность, измеренную с помощью константы ассоциации (K), по сравнению с антителом mAb417; или (e) любую их комбинацию.

[0013] В некоторых аспектах описанное в данном документе антитело к L1CAM или его антигенсвязывающий фрагмент проявляет повышенную продуцируемость по сравнению с антителом mAb417, где улучшенная продуцируемость составляет по меньшей мере 55 мг/л, по меньшей мере 56 мг/л, по меньшей мере 57 мг/л, по меньшей мере 58 мг/л, по меньшей мере 59 мг/л, по меньшей мере примерно 60 мг/л, по меньшей мере примерно 61 мг/л, по меньшей мере примерно 62 мг/л, по меньшей мере примерно 63 мг/л, по меньшей мере примерно 64 мг/л, по меньшей мере примерно 65 мг/л, по меньшей мере примерно 66 мг/л, по меньшей мере примерно 67 мг/л, по меньшей мере примерно 68 мг/л, по меньшей мере примерно 69 мг/л, по меньшей мере примерно 70 мг/л, по меньшей мере примерно 71 мг/л, по меньшей мере примерно 72 мг/л, по меньшей мере примерно 73 мг/л, по меньшей мере примерно 74 мг/л, по меньшей мере примерно 75 мг/л, по меньшей мере примерно 76 мг/л, по меньшей мере примерно 77 мг/л, по меньшей мере примерно 78 мг/л, по меньшей мере примерно 79 мг/л, по меньшей мере примерно 80 мг/л, по меньшей мере примерно 81 мг/л, по меньшей мере примерно 82 мг/л, по меньшей мере примерно 83 мг/л, по меньшей мере примерно 84 мг/л или по меньшей мере примерно 85 мг/л при экспрессии в соответствии с примером 3.

[0014] В некоторых аспектах описанное в данном документе антитело к L1CAM или его антигенсвязывающий фрагмент проявляет повышенную аффинность, измеренную с помощью константы равновесной диссоциации (K_D), по сравнению с антителом mAb417, где улучшенная K_D составляет менее $2,6 \times 10^{-10}$ M, менее $2,5 \times 10^{-10}$ M, менее $2,0 \times 10^{-10}$ M, менее $1,5 \times 10^{-10}$ M, менее $1,0 \times 10^{-10}$ M, менее 9×10^{-11} M, менее 8×10^{-11} M, менее 7×10^{-11} M, менее 6×10^{-11} M, менее 5×10^{-11} M, менее 4×10^{-11} M, менее 3×10^{-11} M, менее 2×10^{-11} M, менее 1×10^{-11} M, менее 9×10^{-12} M, менее 8×10^{-12} M, менее 7×10^{-12} M, менее 6×10^{-12} M, менее 5×10^{-12} M, менее 4×10^{-12} M, менее 3×10^{-12} M, менее 2×10^{-12} M, менее 1×10^{-12} M, менее 9×10^{-13} M, или менее 8×10^{-13} M.

[0015] В других аспектах описанное в данном документе антитело к L1CAM или его антигенсвязывающий фрагмент проявляет повышенную аффинность, измеренную с помощью константы ассоциации (K), по сравнению с антителом mAb417, где улучшенная K составляет менее 5×10^{-10} M, менее 4×10^{-10} M, менее 3

$X 10^{-10}$ M, менее $2 X 10^{-10}$ M, менее $1,0 X 10^{-10}$ M, менее $9 X 10^{-11}$ M, менее $8 X 10^{-11}$ M, менее $7 X 10^{-11}$ M, менее $6 X 10^{-11}$ M, менее $5 X 10^{-11}$ M, менее $4 X 10^{-11}$ M, менее $3 X 10^{-11}$ M, менее $2 X 10^{-11}$ M, менее $1 X 10^{-11}$ M, менее $9 X 10^{-12}$ M, менее $8 X 10^{-12}$ M, менее $7 X 10^{-12}$ M, менее $6 X 10^{-12}$ M, менее $5 X 10^{-12}$ M, менее $4 X 10^{-12}$ M, менее $3 X 10^{-12}$ M, менее $2 X 10^{-12}$ M, менее $1 X 10^{-12}$ M, менее $9 X 10^{-13}$ M, или менее $8 X 10^{-13}$ M. В некоторых аспектах описанное в данном документе антитело к L1CAM или его антигенсвязывающий фрагмент проявляет повышенное значение PI по сравнению с антителом mAb417, где повышенное значение PI составляет менее 9,6, менее 9,5, менее 9,4, менее 9,3, менее 9,2, менее 9,1, менее 9,0, менее 8,9, менее 8,8, менее 8,7, менее 8,6, менее 8,5, менее 8,4, менее 8,3, менее 8,2, менее 8,1, менее 8,0, менее 7,9, менее 7,8, менее 7,7 или менее 7,6.

[0016] В некоторых аспектах описанные в данном документе антитело к L1CAM или его антигенсвязывающий фрагмент содержат CDR1, CDR2 и CDR3 VH и CDR1, CDR2 и CDR3 VL; где CDR1, CDR2 и CDR3 VH содержат RFGMH (SEQ ID NO:2), FISNEGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO:10) и GRAYGSGSLFDP (SEQ ID NO:4) соответственно; и где CDR1, CDR2 и CDR3 VL содержат RASRTISSYVN (SEQ ID NO:12), AASNLHS (SEQ ID NO:7) и QQSIGRGPVT (SEQ ID NO:13) соответственно.

[0017] В некоторых аспектах описанные в данном документе антитело к L1CAM или его антигенсвязывающий фрагмент содержат CDR1, CDR2, CDR3 VH и CDR1, CDR2, CDR3 VL; где CDR1, CDR2 и CDR3 VH содержат RFGMH (SEQ ID NO:2), FISNEGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO:10) и GRAYGSGSLFDP (SEQ ID NO:4) соответственно; и где CDR1, CDR2 и CDR3 VL содержат RASRTISSYVN (SEQ ID NO:12), AASNLHS (SEQ ID NO:7) и QQAGFYSPWT (SEQ ID NO:17) соответственно.

[0018] В некоторых аспектах описанные в данном документе антитело к L1CAM или его антигенсвязывающий фрагмент содержат CDR1, CDR2, CDR3 VH и CDR1, CDR2, CDR3 VL; где CDR1, CDR2 и CDR3 VH содержат RFGMH (SEQ ID NO:2), FISNEGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO:10) и GRAYGSGSLFDP (SEQ ID NO:4) соответственно; и где CDR1, CDR2 и CDR3 VL содержат RASRTISSYVN (SEQ ID NO:12), AASNLHS (SEQ ID NO:7) и QQAGFYTPWT (SEQ ID NO:17) соответственно.

[0019] В некоторых аспектах описанные в данном документе антитело к L1CAM или его антигенсвязывающий фрагмент содержат CDR1, CDR2, CDR3 VH и CDR1, CDR2, CDR3 VL; где CDR1, CDR2 и CDR3 VH содержат RFGMH (SEQ ID NO:2), FISNEGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO:10) и GRAYGSGSLFDP (SEQ ID NO:4) соответственно; и где CDR1, CDR2 и CDR3 VL содержат RASRTISSYVN (SEQ ID NO:12), AASNLHS (SEQ ID NO:7) и QQSLHFYPWT (SEQ ID NO:19) соответственно.

[0020] В некоторых аспектах описанные в данном документе антитело к L1CAM или его антигенсвязывающий фрагмент содержат CDR1, CDR2, CDR3 VH и CDR1, CDR2, CDR3 VL; причем CDR1, CDR2 и CDR3 VH содержат RFGMH (SEQ ID NO:2), FISNEGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO:10) и GRAYGSGSLFDP (SEQ ID NO:4) соответственно; и причем CDR1, CDR2 и CDR3 VL содержат RASRTISSYVN (SEQ ID NO:12), AASNLHS (SEQ ID NO:7) и QQSLVWYPWT (SEQ ID NO:19) соответственно.

[0021] В некоторых аспектах VH антитела к L1CAM или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе, содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 85%, по меньшей мере примерно на 90%, по меньшей мере примерно на 95%, по меньшей мере примерно на 96%, по меньшей мере примерно на 97%, по меньшей мере примерно на 98%, по меньшей мере примерно на 99% или примерно на 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной как EVQLVESGGG WQPGGSLRL SCAASGFTFS RFGMHWVRQA

PGKGLEWVAF ISNEGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSAVLY LQMNSLRAED TAVYYCARGR
AYGSGSLFDP WGQGLTVTVS S (SEQ ID NO: 23).

[0022] В других аспектах VL антитела к L1CAM или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе, содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 85%, по меньшей мере примерно на 90%, по меньшей мере примерно на 95%, по меньшей мере примерно на 96%, по меньшей мере примерно на 97%, по меньшей мере примерно на 98%, по меньшей мере примерно на 99% или примерно на 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной как DIQL TQSPSS LSASVGDRVT ITCRASRTIS SYVNWYRQRP GKAPESLIYA ASNLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ SIGRGPVTFG QGTKLEIK (SEQ ID NO: 24).

[0023] В некоторых аспектах VH антитела к L1CAM или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе, содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 85%, по меньшей мере примерно на 90%, по меньшей мере примерно на 95%, по меньшей мере примерно на 96%, по меньшей мере примерно на 97%, по меньшей мере примерно на 98%, по меньшей мере примерно на 99% или примерно на 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной как EVQLVESGGG WQPGGSLRL SCAASGFTFS RFGMHWVQRQA PGKGLEWVAF ISNEGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSANTL Y LQMNSLRAED TAVYYCARGR AYGSGSLFDP WGQGLTVTVS S (SEQ ID NO: 27).

[0024] В других аспектах VL антитела к L1CAM или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе, содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 85%, по меньшей мере примерно на 90%, по меньшей мере примерно на 95%, по меньшей мере примерно на 96%, по меньшей мере примерно на 97%, по меньшей мере примерно на 98%, по меньшей мере примерно на 99% или примерно на 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной как DIQL TQSPSS LSASVGDRVT ITCRASRTIS SYVNWYRQRP GKAPESLIYA ASNLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ AGFYSPWTFG QGTKLEIK (SEQ ID NO: 28).

[0025] В некоторых аспектах VH антитела к L1CAM или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе, содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 85%, по меньшей мере примерно на 90%, по меньшей мере примерно на 95%, по меньшей мере примерно на 96%, по меньшей мере примерно на 97%, по меньшей мере примерно на 98%, по меньшей мере примерно на 99% или примерно на 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной как EVQLVESGGG WQPGGSLRL SCAASGFTFS RFGMHWVQRQA PGKGLEWVAF ISNEGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSAVLY WGQGLTVTVS S (SEQ ID NO: 25).

[0026] В некоторых аспектах VL антитела к L1CAM или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе, содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 85%, по меньшей мере примерно на 90%, по меньшей мере примерно на 95%, по меньшей мере примерно на 96%, по меньшей мере примерно на 97%, по меньшей мере примерно на 98%, по меньшей мере примерно на 99% или примерно на 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной как DIQL TQSPSS LSASVGDRVT ITCRASRTIS SYVNWYRQRP GKAPESLIYA ASNLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ SIGRGPVTFG QGTKLEIK (SEQ ID NO: 26).

[0027] В других аспектах VH антитела к L1CAM или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе, содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 85%, по меньшей мере примерно на 90%, по меньшей мере примерно на 95%, по меньшей мере примерно на 96%, по меньшей мере примерно на 97%, по меньшей мере примерно на 98%, по меньшей мере примерно на 99% или примерно на 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной как EVQLVESGGG WQPGGSLRL SCAASGFTFS RFGMHWVRQA PGKGLEWVAF ISNEGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSANTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGR AYGSGSLFDP WGQGTLVTVS S (SEQ ID NO: 29).

[0028] В некоторых аспектах VL антитела к L1CAM или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе, содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 85%, по меньшей мере примерно на 90%, по меньшей мере примерно на 95%, по меньшей мере примерно на 96%, по меньшей мере примерно на 97%, по меньшей мере примерно на 98%, по меньшей мере примерно на 99% или примерно на 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной как DIQL TQSPSS LSASVGDRVT ITCRASRTIS SYVNWYRQRP GKAPESLIYA ASNLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYC QQSLHFYPWT FG QGTKLEIK (SEQ ID NO: 30).

[0029] В других аспектах VH антитела к L1CAM или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе, содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 85%, по меньшей мере примерно на 90%, по меньшей мере примерно на 95%, по меньшей мере примерно на 96%, по меньшей мере примерно на 97%, по меньшей мере примерно на 98%, по меньшей мере примерно на 99% или примерно на 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной как EVQLVESGGG WQPGGSLRL SCAASGFTFS RFGMHWVRQA PGKGLEWVAF ISNEGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSAVLY WGQGTLVTVS S (SEQ ID NO: 31).

[0030] В некоторых аспектах VL антитела к L1CAM или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе, содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 85%, по меньшей мере примерно на 90%, по меньшей мере примерно на 95%, по меньшей мере примерно на 96%, по меньшей мере примерно на 97%, по меньшей мере примерно на 98%, по меньшей мере примерно на 99% или примерно на 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной как DIQL TQSPSS LSASVGDRVT ITCRASRTIS SYVNWYRQRP GKAPESLIYA ASNLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYC QQSLVWYPWT FG QGTKLEIK (SEQ ID NO: 32).

[0031] В некоторых аспектах VH антитела к L1CAM или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе, содержит SEQ ID NO:23, а VL антитела к L1CAM или его антигенсвязывающего фрагмента содержит SEQ ID NO:24. В других аспектах VH антитела к L1CAM или его антигенсвязывающего фрагмента содержит SEQ ID NO:25, а VL антитела к L1CAM или его антигенсвязывающего фрагмента содержит SEQ ID NO:26. В некоторых аспектах VH антитела к L1CAM или его антигенсвязывающего фрагмента содержит SEQ ID NO:27, а VL антитела к L1CAM или его антигенсвязывающего фрагмента содержит SEQ ID NO:28. В других аспектах VH антитела к L1CAM или его антигенсвязывающего фрагмента содержит SEQ ID NO:29, а VL антитела к L1CAM или его антигенсвязывающего фрагмента содержит SEQ ID NO:30. В некоторых аспектах VH антитела к L1CAM или его антигенсвязывающего фрагмента содержит SEQ ID NO:29, а VL антитела к L1CAM или его антигенсвязывающего фрагмента содержит SEQ ID NO:30. В

других аспектах VH антитела к L1CAM или его антигенсвязывающего фрагмента содержит SEQ ID NO:31, а VL антитела к L1CAM или его антигенсвязывающего фрагмента содержит SEQ ID NO:32.

[0032] Также в данном документе предложено антитело к L1CAM или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, которые содержат тяжелую цепь (HC) и легкую цепь (LC), причем HC антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит SEQ ID NO:38, а LC антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит SEQ ID NO: 39. В некоторых аспектах HC антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит SEQ ID NO:40, а LC антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит SEQ ID NO:41. В некоторых аспектах HC антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит SEQ ID NO:42, а LC антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит SEQ ID NO:43. В некоторых аспектах HC антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит SEQ ID NO:44, а LC антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит SEQ ID NO:45. В некоторых аспектах HC антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит SEQ ID NO:46, а LC антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит SEQ ID NO:20.

[0033] В некоторых аспектах антитело к L1CAM выбирают из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, их варианта и любой их комбинации. В некоторых аспектах антитело к L1CAM представляет собой химерное антитело или человеческое антитело. В некоторых аспектах антитело к L1CAM содержит Fab, Fab', F (ab')₂, Fv или одноцепочечный Fv (scFv).

[0034] Некоторые аспекты данного изобретения относятся к нуклеиновой кислоте, кодирующей антитело к L1CAM, вектору, содержащему нуклеиновую кислоту, клетке-хозяину, содержащей вектор. В некоторых аспектах клетка-хозяин выбрана из группы, состоящей из *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, дрожжей, CHO, YB/20, NS0, PER-C6, HEK-293T, NIH-3T3, HeLa, BHK, Hep G2, SP2/0, R1.1, B-W, L-M, COS 1, COS 7, BSC1, BSC40, клеток BMT10, растительных клеток, клеток насекомых и клеток человека в культуре тканей.

[0035] Некоторые аспекты данного изобретения относятся к иммуноконъюгату, содержащему антитело к L1CAM или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связанные с агентом.

[0036] Также в данном документе предложено биспецифическое или мультиспецифическое антитело, содержащее антитело к L1CAM или его антигенсвязывающий фрагмент и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с антигеном.

[0037] Некоторые аспекты данного изобретения относятся к композиции, содержащей антитело к L1CAM, нуклеиновую кислоту, вектор, клетку-хозяин, иммуноконъюгат или биспецифическое или мультиспецифическое антитело, описанные в данном документе, и носитель.

[0038] Также в данном документе предложено набор, содержащий описанное в данном документе антитело к L1CAM, и инструкцию по применению.

[0039] Некоторые аспекты данного изобретения относятся к способу получения антитела, которое избирательно связывается с белком L1CAM человека, включающему культивирование клетки-хозяина в подходящих условиях и выделение антитела.

[0040] Также в данном документе предложено способ лечения заболевания или патологического состояния у субъекта, который в этом нуждается, включающий введение субъекту антитела к L1CAM, нуклеиновой кислоты, вектора, клетки-хозяина, иммуноконъюгата или биспецифического или мультиспецифического антитела, описанных в данном документе. В некоторых аспектах заболевание или патологическое состояние включает опухоль. В некоторых аспектах опухоль включает рак желчных протоков, меланому, рак поджелудочной железы, глиому, рак груди, лимфому, рак легких, рак почек, рак простаты, фибросаркому,

аденокарциному толстой кишки, рак печени или рак яичников. В другом аспекте антитело к L1CAM, нуклеиновая кислота, вектор, клетка, иммуноконъюгат, биспецифическое или мультиспецифическое антитело подавляет рост опухоли и/или усиливает инфильтрацию иммунных клеток в опухоль.

[0041] Некоторые аспекты данного изобретения относятся к способу, который включает введение дополнительного терапевтического агента. В некоторых аспектах дополнительный терапевтический агент включает химиотерапию, иммунотерапию, лучевую терапию или их комбинации. В некоторых аспектах дополнительный терапевтический агент представляет собой ингибитор контрольных точек иммунного ответа.

[0042] Другие признаки и преимущества данного изобретения станут очевидными из следующего подробного описания и примеров, которые не следует истолковывать как ограничивающие. Содержание всех процитированных ссылок, включая научные статьи, газетные отчеты, записи GenBank, патенты и заявки на патенты, цитируемые в этой заявке, включены в настоящий документ посредством ссылки.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0043] Фиг. 1A-1D показывают анализ антигенсвязывающей специфичности вариантов Ab417 по отношению к L1CAM человека в клетках CHO-DG44 (фиг. 1A), NCI-H522 (фиг. 1B), SKOV3 (фиг. 1C) и B16F1 (фиг. 1D) с помощью проточной цитометрии.

[0044] Фиг. 2A-2F показывают качество очищенных вариантов Ab417 (фиг. 2A) и Ab417: Ab612 (фиг. 2B), Ab4H5 (фиг. 2C), Ab2C2 (фиг. 2D), Ab4H6 (фиг. 2E) и Ab5D12 (фиг. 2F), измеренное методом эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (SEC-HPLC).

[0045] Фиг. 3A-3D показывают анализ эффекта ингибирования роста опухоли вариантов Ab417. Фиг. 3A показывает изменения объема опухоли на ксенотрансплантатной модели Choi-СК после введения Ab417 (10 мг/кг), Ab612 (10 мг/кг), контрольного антитела hFc (человеческий Fc) (3,3) мг/кг и отрицательного контроля (PBS) (* $p < 0,05$, достоверное отличие от контрольной группы изотипа по t-критерию Даннета). Фиг. 3B показывает изменения массы тела ксенотрансплантатной модели Choi-СК после введения Ab417, Ab612, контрольного hFc и отрицательного контроля (PBS). Фиг. 3C показывает массу опухоли ксенотрансплантатной модели Choi-СК после введения Ab417 (10 мг/кг), Ab612 (10 мг/кг), контрольного антитела hFc (3,3) мг/кг и отрицательного контроля (несущая среда). (* $p < 0,01$, достоверное отличие от контрольной группы изотипа по t-критерию Даннета). Фиг. 3D показывает изображения опухолей каждой группы из восьми мышей, умерщвленных после окончания эксперимента, как описано на фиг. 3C.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0046] В данном документе описано выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые избирательно связываются с тем же эпитопом молекулы адгезии клеток L1 (L1CAM), что и эталонное антитело; перекрестно конкурируют за связывание с эпитопом L1CAM с эталонным антителом и проявляет одно или более свойств, описанных в данном документе; и/или предотвращают и/или лечат заболевания или патологические состояния, которые включают опухоль.

[0047] Для облегчения понимания описания в данном документе приведены определения для ряда терминов и выражений. Дополнительные определения приведены в подробном описании.

I. Определения

[0048] По всему тексту этого описания термины в форме единственного числа включают ссылки на одно или более; например, «антитело» означает одно или более антител. Следовательно, термины в форме единственного числа, а также выражения «один или более» и «по меньшей мере один» могут использоваться в данном документе взаимозаменяемо.

[0049] Кроме того, в данном контексте «и/или» следует рассматривать как конкретное описание каждого из двух указанных признаков или компонентов с другим или без него. Таким образом, термин «и/или», используемый в такой фразе, как «А и/или В», предназначен для включения «А и В», «А или В»; «А» (отдельно) и «В» (отдельно). Аналогично, термин «и/или», используемый в такой фразе, как «А, В и/или С», предназначен для охвата каждого из следующих аспектов: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (отдельно); В (отдельно); и С (отдельно).

[0050] Следует понимать, что в тех случаях, когда аспекты описаны в данном документе с формулировкой «содержащий», в противном случае также предложены аналогичные аспекты, описанные в терминах «состоящий из» и/или «состоящий в основном из».

[0051] Если не указано иное, все используемые в данном документе технические и научные термины имеют общепринятые значения, понятные специалисту в области техники, к которой относится данное изобретение. Например, Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; и Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press, обеспечивают специалиста общим словарем многих терминов, используемых в данном описании.

[0052] Единицы, префиксы и символы обозначаются в их общепринятой форме Международной системы единиц измерения (СИ). Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Если не указано иное, аминокислотные последовательности записываются слева направо в ориентации от amino до карбокси конца. Заголовки, представленные в данном документе, не являются ограничениями различных аспектов изобретения, которые могут быть осуществлены со ссылкой на описание в целом. Соответственно, термины, определенные ниже, определены в более полном объеме со ссылкой на описание в целом.

[0053] В контексте данного документа термин «примерно» применяется в значении приблизительно, около, примерно или в области. Если термин «примерно» используется в сочетании с числовым диапазоном, то он изменяет этот диапазон, расширяя границы выше и ниже указанных числовых значений. В целом, термин «примерно» может изменить числовое значение выше и ниже указанного значения с отклонением, например, 10 процентов, вверх или вниз (выше или ниже).

[0054] Термин «молекула адгезии клеток L1» или «L1CAM» относится к одному из интегральных мембранных гликопротеинов, принадлежащему к молекулам адгезии клеток суперсемейства иммуноглобулинов (СAM).

[0055] Термин «L1CAM» включает любые варианты или изоформы L1CAM, которые естественным образом экспрессируются клетками. Соответственно, описанные в данном документе антитела могут перекрестно реагировать с различными изоформами одного и того же вида (например, с разными изоформами L1CAM человека) или перекрестно реагировать с L1CAM отличных от человека видов (например, L1CAM мыши). Альтернативно, антитела могут быть специфичными к L1CAM человека и не могут проявлять перекрестную реактивность с другими видами. Белок L1CAM или любые его варианты и изоформы можно либо выделить из клеток или тканей, которые их экспрессируют естественным образом, либо получить рекомбинантным

путем с использованием хорошо известных в данной области методов и/или тех, которые описаны в данном документе.

[0056] L1CAM человека (UniProt ID № P32004-1; SEQ ID NO:1) представляет собой интегральный мембранный гликопротеин 1-го типа, который состоит из 1257 аминокислот и охватывает клеточную мембрану один раз, а его аминотерминальный фрагмент выступает за пределы клеточной мембраны, и его карбокситерминальный фрагмент находится в цитоплазме. Внеклеточный домен L1CAM включает 11 доменов из шести иммуноглобулиновых доменов 2 типа (Ig1, Ig2, Ig3, Ig4, Ig5 и Ig6), пять доменов фибронектина III типа (Fn1, Fn2, Fn3, Fn4 и Fn5) и двадцать сайтов N-гликозилирования. Патент США № 9777060.

[0057] Идентифицированы по меньшей мере две дополнительные изоформы L1CAM человека. Изоформа 2 (UniProt ID № P32004-2; SEQ ID NO:3) состоит из 1253 аминокислот. В изоформе 2 отсутствуют аминокислотные остатки 1177-1180 по сравнению с аминокислотной последовательностью L1CAM человека. Изоформа 3 (UniProt ID № P32004-3; SEQ ID NO:5) состоит из 1248 аминокислот. В изоформе 3 отсутствуют аминокислотные остатки 1177-1180 и она имеет следующее различие в аминокислотных остатках 26-31 (YEGHHV → L) по сравнению с аминокислотной последовательностью L1CAM человека.

[0058] Ниже приведены аминокислотные последовательности трех известных изоформ L1CAM человека.

(A) L1CAM человека (UniProt ID № P32004-1; SEQ ID NO:1)

MVVALRYVWPLLLCSPCLLIQIPEEYEGHHVMEPPVITEQSPRRLVVFPTDDISLKCEAS
GKPEVQFRWTRDGVHFKPKEELGVTVYQSPHSGSFTITGNNSNFAQRFGIYRCFASNKL
GTAMSHEIRLMAEGAPKWPKETVKPVEVEEGESVVLPCNPPPSAEPLRIYWMNSKILHIK
QDERVTMGQNGNLYFANVLTSDNHSDYICAHFPGTRTIIQKEPIDLRVKATNSMIDRKP
RLLFPTNSSSHLVALQGQPLVLECIAEGFPTPTIKWLRPSGMPMPADRVTYQNHKTLQLL
KVGEEDDGEYRCLAENSLGSARHAYYVTVAAAPYWLHKPQSHLYGPGETARLDCQVQGRP
QPEVTWRINGIPVEELAKDQKYRIQRGALILSNVQPSDTMVTQCEARNRHGLLLANAYIY
VVQLPAKILTADNQTYMAVQGSTAYLLCKAFGAPVPSVQWLDEDGTTVLQDERFFPYANG
TLGIRDLQANDTGRYFCLAANDQNNVTIMANLKVKDATQITQGPRSTIEKKGSRVTFTCC
ASFDPSLQPSITWRGDGRDLQELGSDKYFIEDGRLVIHSLDYSQGNYSVASTELDVV
ESRAQLLVGSPGPVPRLVSDLHLLTQSQVRVSWSPAEDHNAPIEKYDIEFEDKEMAPE
KWYSLGKVPGNQTSTTLKLSPYVHYTFRVTAINKYGPGEPSVSETVVTPEAAPEKNPVD
VKGEGNETTNMVITWKPLRWMDWNAPQVQYRVQWRPQGTRGPWQEQIVSDPFLVVSNTST
FVPYEIKVQAVNSQKGPEPQVTIGYSGEDYPAIPELEGIEILNSSAVLVKWRPVDLAQ
VKGHLRGYNVTYWREGSQRKHSKRHIHKDHVVVPANTTSVILSGLRPYSSYHLEVQAFNG
RSGSPASEFTFSTPEGVPGHPEALHLECQNSNTSLLLRWQPPLSHNGVLTGYVLSYHPLDE
GGKQQLSFTNLDPPELRTHNLTDLSPHLRYRFLQATTKEGPGEAIVREGGTMALSGISDF
GNISATAGENYSVVSWVPKEGQCNRFHILFKALGEEKGGASLSPQYVSYNQSSTYQWDL
QPDTDYEIHFLKERMFRHQMAVKNTGTGRVRLPPAGFATEGWFIGVSAIILLLLVLIL
CFIKRSKGGKYSVKDKEDTQVDSEARPMKDETFGEYRSLESDNEEKAFGSSQPSLNGDIK
PLGSDDSLADYGGSDVQFNEDGSFIGQYSGKKEKEAAGGNDSSGATSPINPAVALE

(B) Изоформа 2 L1CAM человека (UniProt ID № P32004-2; SEQ ID NO:3)

MVVALRYVWPLLLCSPCLLIQIPEEYEGHHVMEPPVITEQSPRRLVVFPTDDISLKCEAS
GKPEVQFRWTRDGVHFKPKEELGVTVYQSPHSGSFTITGNNSNFAQRFGIYRCFASNKL
GTAMSHEIRLMAEGAPKWPKETVKPVEVEEGESVVLPCNPPPSAEPLRIYWMNSKILHIK
QDERVTMGQNGNLYFANVLTSDNHSDYICAHFPGTRTIIQKEPIDLRVKATNSMIDRKP
RLLFPTNSSSHLVALQGQPLVLECIAEGFPTPTIKWLRPSGMPMPADRVTYQNHKTLQLL
KVGEEDDGEYRCLAENSLGSARHAYYVTVAAAPYWLHKPQSHLYGPGETARLDCQVQGRP
QPEVTWRINGIPVEELAKDQKYRIQRGALILSNVQPSDTMVTQCEARNRHGLLLANAYIY
VVQLPAKILTADNQTYMAVQGSTAYLLCKAFGAPVPSVQWLDEDGTTVLQDERFFPYANG
TLGIRDLQANDTGRYFCLAANDQNNVTIMANLKVKDATQITQGPRSTIEKKGSRVTFTCC
ASFDPSLQPSITWRGDGRDLQELGSDKYFIEDGRLVIHSLDYSQGNYSVASTELDVV
ESRAQLLVGSPGPVPRLVSDLHLLTQSQVRVSWSPAEDHNAPIEKYDIEFEDKEMAPE
KWYSLGKVPGNQTSTTLKLSPYVHYTFRVTAINKYGPGEPSVSETVVTPEAAPEKNPVD
VKGEGNETTNMVITWKPLRWMDWNAPQVQYRVQWRPQGTRGPWQEQIVSDPFLVVSNTST

FVPYEIKVQAVNSQGKGPEPQVTIGYSGEDYPQAIPELEGIEILNSSAVLVKWRPVDLAQ
VKGHLRGYNVITYWREGSQRKHSKRHIHKDHVVVPANTTSVILSGLRPYSSYHLEVQAFNG
RSGSPASEFTFSTPEGVPGHPEALHLECQSNTSLLLRWQPPLSHNGVLTGYVLSYHPLDE
GGKQQLSFNLRDPELRTHNLTDLSPHLRYRFQLQATTKEGPGEAIVREGGTMALSGISDF
GNISATAGENYSVVSWSVPKEGQCENFRFHILFKALGEEKGGASLSPQYVSYNQSSYTQWDL
QPDTDYIEIHLFKERMFRHQMAVKTNGTGRVRLPPAGFATEGWFIGFVSAIILLLLVLIL
CFIKRSKGGKYSVKDKEDTQVDSEARPMKDETFGEYSNNEEKAFGSSQPSLNGDIKPLGS
DDSLADYGGSDVQFNEDGSFIGQYSGKKEKEEAAGGNDSSGATSPINPAVALE

(C) Изоформа 3 L1CAM человека (UniProt ID № P32004-3; SEQ ID NO:5)

MVVALRYVWPLLLCSPCLLIQIPEELMEPPVITEQSPRRLVVFPTDDISLKCEASGKPEV
QFRWTRDGVHFKPKEELGVTVYQSPHSGSFTITGNNSNFAQRFQGIYRCFASNKLTAMS
HEIRLMAEGAPKWPKEVVKPVEVEEGESVVLPCNPPSAEPLRIYWMNSKILHIKQDERV
TMGQNGNLYFANVLTSDNHSYDICHAFPGTRTIIQKEPIDLRVKATNSMIDRKPRLLFP
TNSSSHLVALQGQPLVLECIAGFPPTIKWLRPSGMPADRVTYQNHNTLQLLKVGEE
DDGEYRCLAENSLGSARHAYVTVEAAPYWLHKPQSHLYGPGETARLDCQVQGRPQPEVT
WRINGIPVEELAKDQKYRIQRGALILSNVQPSDTMVTQCEARNRHGLLLANAYIYVVQLP
AKILTADNQTYMAVQGSTAYLLCKAFGAPVPSVQWLDEDGTTVLQDERFFPYANGTLGIR
DLQANDTGRYFCLAANDQNNVTIMANLKVKDATQITQGPRSTIEKKGSRVTFTCQASFD
SLQPSITWRGDGRDLQELGSDKYFIEDGRLVIHSLDYSDQGNYSVASTELDVVESRAQ
LLVVGSPGPVRLVLSDLHLLTQSQVRVSWSPAEDHNAPIEKYDIEFEDKEMAPEKWYSL
GKVPGNQTSTTLKLSPYVHYTFRVTAINKYGPGESPVSSETVVTPEAAPEKNPVDVKGEG
NETTNMVITWKPLRWMDWNAPQVQYRVQWRPQGTRGPWQEQIVSDPFLVVSNTSTFVPYE
IKVQAVNSQGKGPEPQVTIGYSGEDYPQAIPELEGIEILNSSAVLVKWRPVDLAQVKGHL
RGYNVITYWREGSQRKHSKRHIHKDHVVVPANTTSVILSGLRPYSSYHLEVQAFNGRSGSP
ASEFTFSTPEGVPGHPEALHLECQSNTSLLLRWQPPLSHNGVLTGYVLSYHPLDEGGKQ
LSFNLRDPELRTHNLTDLSPHLRYRFQLQATTKEGPGEAIVREGGTMALSGISDFGNISA
TAGENYSVVSWSVPKEGQCENFRFHILFKALGEEKGGASLSPQYVSYNQSSYTQWDLQPD
TDYIEIHLFKERMFRHQMAVKTNGTGRVRLPPAGFATEGWFIGFVSAIILLLLVLILCFIKR
SKGGKYSVKDKEDTQVDSEARPMKDETFGEYSNNEEKAFGSSQPSLNGDIKPLGSDDSLA
DYGGSDVQFNEDGSFIGQYSGKKEKEEAAGGNDSSGATSPINPAVALE

[0059] Сигнальная последовательность L1CAM человека соответствует аминокислотам 1-19 (подчеркнуто). Таким образом, зрелые изоформы 1 L1CAM человека, изоформы 2 L1CAM человека и изоформы 3 L1CAM человека состоят из аминокислот с 20 по 1257, 1253 или 1248 соответственно.

[0060] Термины «антитело» и «антитела» являются терминами из области техники и могут использоваться в данном документе взаимозаменяемо и относятся к молекуле с сайтом связывания антигена, которая избирательно связывает антиген. Используемые в данном документе термины распространяются на целые антитела и любые антигенсвязывающие фрагменты (*т.е.* «антигенсвязывающие фрагменты») или их отдельные цепи. Термин «антитело» относится в одном аспекте к гликопротеину, содержащему по меньшей мере две тяжелые (H) и две легкие (L) цепи, соединенные дисульфидными связями, или его антигенсвязывающему фрагменту. В другом аспекте термин «антитело» относится к одноцепочечному антителу, содержащему единственный переменный домен, *например*, домен VHH. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (в данном документе сокращенно называемой VH) и константной области тяжелой цепи. В некоторых встречающихся в природе антителах константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов – CH1, CH2 и CH3. В некоторых встречающихся в природе антителах каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (в данном документе сокращенно называемой VL) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена – CL.

[0061] Области VH и VL могут быть дополнительно поделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR,

расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами организма-хозяина, включая различные клетки иммунной системы (*например*, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

[0062] Термин «нумерация по Kabat» и подобные термины известны в данной области и относятся к системе нумерации аминокислотных остатков в вариабельных областях тяжелой и легкой цепей антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых аспектах CDR антитела могут быть определены в соответствии с системой нумерации по Kabat (*см.*, *например*, Kabat EA & Wu TT (1971) *Ann NY Acad Sci* 190: 382-391 и Kabat EA *et al.*, (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). Используя систему нумерации по Kabat, CDR в молекуле тяжелой цепи антитела обычно присутствуют в положениях аминокислот с 31 по 35, которые необязательно могут включать одну или две дополнительные аминокислоты, следующие за 35 (обозначенные в схеме нумерации по Kabat как 35A и 35B) (CDR1), положениях аминокислот с 50 по 65 (CDR2) и положениях аминокислот с 95 по 102 (CDR3). Используя систему нумерации по Kabat, CDR в молекуле легкой цепи антитела обычно присутствуют в положениях аминокислот с 24 по 34 (CDR1), положениях аминокислот с 50 по 56 (CDR2) и положениях аминокислот с 89 по 97 (CDR3). В конкретном аспекте CDR описанных в данном документе антител были определены в соответствии со схемой нумерации по Kabat.

[0063] Фразы «нумерация аминокислотных положений, как в Kabat», «положение по Kabat» и их грамматические варианты относятся к системе нумерации, используемой для вариабельных доменов тяжелой цепи или вариабельных доменов легкой цепи при составлении антител в Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) При использовании этой системы нумерации фактическая линейная аминокислотная последовательность может содержать меньшее количество или дополнительное количество аминокислот, что соответствует укорочению FR или CDR вариабельного домена или вставке в них. Например, вариабельный домен тяжелой цепи может содержать вставку одной аминокислоты (остаток 52a в соответствии с Kabat) после остатка 52 CDR2 и вставленные остатки (*например*, остатки 82a, 82b, 82c и *т. д.* в соответствии с Kabat) после остатка 82 FW тяжелой цепи. *См.* ТАБЛИЦУ 1.

ТАБЛИЦА 1

Петля	Kabat	AbM	Chothia
I1	124-134	124-134	124-134
I2	150-156	150-156	150-156
I3	189-197	189-197	189-197
II1	К31-К35В	К26-К35В	Н26-Н32,34 (нумерация по Kabat)
II1	К31-К35	К26-К35	Н26-Н32 (нумерация по Chothia)
II2	К50-К65	К50-К68	Н52-Н66
II3	К95-К102	К95-К102	Н95-Н102

[0064] Нумерация остатков по Kabat может быть определена для данного антитела путем выравнивания областей гомологии в последовательности антитела со «стандартной» пронумерованной по Kabat последовательностью. Chothia, напротив, относится к расположению структурных петель (Chothia and Lesk,

J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Конец петли CDR-H1 по Chothia при нумерации согласно системе нумерации по Kabat варьируется между H32 и H34 в зависимости от длины петли (это связано с тем, что в схеме нумерации по Kabat в H35A и H35B размещаются вставки; если ни 35A ни 35B не присутствуют, петля заканчивается в 32; если присутствует только 35A, петля заканчивается в 33; если присутствуют оба 35A и 35B, петля заканчивается в 34). Гипервариабельные области по AbM представляют собой компромиссный вариант между CDR по Kabat, и структурными петлями по Chothia, и используются в программном обеспечении для моделирования антител Oxford Molecular's AbM.

[0065] IMGT (ImMunoGeneTics) также обеспечивает систему нумерации для переменных областей иммуноглобулина, включая CDR. См., например, Lefranc, M.P. *et al.*, *Dev. Comp. Immunol.* 27: 55-77(2003), которая включена в настоящий документ посредством ссылки. Система нумерации IMGT была основана на выравнивании более 5000 последовательностей, структурных данных и характеристик гипервариабельных петель и позволяет легко сравнивать переменные области и области CDR для всех видов. Согласно схеме нумерации IMGT, VH-CDR1 находится в положениях с 26 по 35, VH-CDR2 находится в положениях с 51 по 57, VH-CDR3 находится в положениях с 93 по 102, VL-CDR1 находится в положениях с 27 по 32, VL-CDR2 - в положениях с 50 по 52, а VL-CDR3 находится в положениях с 89 по 97.

[0066] Для всех положений аминокислот константной области тяжелой цепи, обсуждаемых в настоящем описании, нумерация ведется в соответствии с индексом EU, впервые описанным в Edelman *et al.*, 1969, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 63(1):78-85, описывающей аминокислотную последовательность миеломного белка EU, который является первым секвенированным человеческим IgG1. Индекс EU по Edelman *et al.* также указан в Kabat *et al.*, 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda. Таким образом, фразы «индекс EU, как указано в Kabat» или «индекс EU в Kabat» и «положение... в соответствии с индексом EU, как указано в системе Kabat» и их грамматические варианты относятся к системе нумерации остатков на основе человеческого IgG1 EU антитела по Edelman *et al.* как указано в Kabat 1991.

[0067] Система нумерации, используемая для переменных доменов (как тяжелой цепи, так и легкой цепи) и аминокислотной последовательности константной области легкой цепи, изложена в Kabat 1991.

[0068] Антитела могут быть любого типа (*например*, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY), любого класса (*например*, IgD, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 или IgA2) или любого подкласса (*например*, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 у людей; и IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3 у мышей) молекулы иммуноглобулина. Иммуноглобулины, *например*, IgG1, существуют в виде нескольких аллотипов, которые отличаются друг от друга не более чем несколькими аминокислотами. Описанное в данном документе антитело может принадлежать к любому из общеизвестных изотипов, классов, подклассов или аллотипов. В некоторых аспектах описанные в данном документе антитела относятся к подклассу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 или к любому их гибриду. В некоторых аспектах антитела относятся к подклассу IgG1 человека или подклассу IgG2 человека или IgG4 человека.

[0069] Термин «антитело» распространяется на, в качестве примера, как встречающиеся в природе, так и не встречающиеся в природе антитела; моноклональные и поликлональные антитела; химерные и гуманизированные антитела; человеческие и нечеловеческие антитела; полностью синтетические антитела; одноцепочечные антитела; моноспецифические антитела; мультиспецифические антитела (включая биспецифические антитела); тетрамерные антитела, содержащие две молекулы тяжелой цепи и две молекулы легкой цепи; мономер легкой цепи антитела; мономер тяжелой цепи антитела; димер легкой цепи антитела, димер тяжелой цепи антитела; пару легкая цепь антитела-тяжелая цепь антитела; интратела; гетероконъюгированные антитела; моновалентные антитела; верблюдизированные антитела; аффитела;

антиидиотипические (анти-Id) антитела (включая, *например*, анти-анти-Id антитела) и однодоменные антитела (sdAb), которые включают связывающие молекулы, состоящие из одного мономерного переменного домена антитела, который полностью способен к связыванию антигена (*например*, домен VH или домен VL). Harmen M. M. and Haard H. J. *Appl Microbiol Biotechnol.* 77(1): 13–22 (2007)).

[0070] Используемый в данном документе термин «антигенсвязывающий фрагмент» антитела относится к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность избирательно связываться с антигеном (*например*, L1CAM человека). Такие «фрагменты» имеют, например, длину от примерно 8 до примерно 1500 аминокислот, подходящую длину от примерно 8 до примерно 745 аминокислот, подходящую длину от примерно 8 до примерно 300, например, от примерно 8 до примерно 200 аминокислот, или длину от примерно 10 до примерно 50 или 100 аминокислот. Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может выполняться фрагментами полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, включенных в термин «антигенсвязывающий фрагмент», *например*, антитела к L1CAM, описанного в данном документе, включают (i) фрагмент Fab, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) фрагмент F(ab')₂, бивалентный фрагмент, состоящий из двух фрагментов Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CH1; (iv) фрагмент Fv, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела и дисульфид-связанный Fv (sdFv); (v) фрагмент dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546), который состоит из домена VH; и (vi) выделенную определяющую комплементарность область (CDR) или (vii) комбинацию двух или более CDR, которые, необязательно, могут быть соединены синтетическим линкером. Кроме того, хотя два домена фрагмента Fv, VL и VH, кодируются отдельными генами, они могут быть соединены с помощью рекомбинантных способов синтетическим линкером, который обеспечивает возможность создания ими одной белковой цепи, в которой пара областей VL и VH образуют моновалентные молекулы (известные как одноцепочечные Fv (scFv); *смотрите, например*, Bird *et al.*, (1988) *Science* 242:423-426; and Huston *et al.*, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Подразумевается, что такие одноцепочечные антитела также охватываются термином «антигенсвязывающий фрагмент» антитела. Эти фрагменты антител получают с помощью традиционных методик, известных специалистам в данной области техники, и проводят скрининг фрагментов в отношении функциональности таким же образом, что и для интактных антител. Антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены с помощью технологий рекомбинантных ДНК или ферментативного или химического расщепления интактных иммуноглобулинов.

[0071] Используемые в данном документе термины «переменная область» или «переменный домен» используются взаимозаменяемо и являются общими в данной области техники. Переменная область обычно относится к фрагменту антитела, как правило, к фрагменту легкой или тяжелой цепи, обычно к аминокислотам в положении с 110 по 120 в зрелой тяжелой цепи и примерно с 90 по 115 аминокислоту в зрелой легкой цепи, которые сильно различаются по последовательности среди антител и используются для связывания и специфичности конкретного антитела в отношении его конкретного антигена. Переменная область сосредоточена в тех областях, которые называются определяющими комплементарность областями (CDR), в то время как более высококонсервативные области в переменном домене называются каркасными областями (FR).

[0072] Без ограничения каким-либо конкретным механизмом действия или теорией, считается, что CDR легкой и тяжелой цепей в первую очередь ответственны за взаимодействие и специфичность антитела с антигеном. В определенных аспектах переменная область представляет собой переменную область человека. В некоторых аспектах переменная область включает CDR грызунов или мышей и человеческие

каркасные области (FR). В конкретных аспектах переменная область представляет собой переменную область приматов (*например*, приматов, не относящихся к человеку). В некоторых аспектах переменная область включает CDR грызунов или мышей и каркасные области (FR) приматов (*например*, приматов, не относящихся к человеку).

[0073] Используемый в данном документе термин «тяжелая цепь» при использовании в отношении антитела, может относиться к любому отдельному типу, *например*, альфа (α), дельта (δ), эpsilon (ϵ), гамма (γ) и мю (μ) на основе аминокислотной последовательности константного домена, которые дают начало классам антител IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, соответственно, включая подклассы IgG, *например*, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

[0074] Используемый в данном документе термин «легкая цепь» при использовании в отношении антитела, может относиться к любому отдельному типу, *например*, каппа (κ) или лямбда (λ) на основе аминокислотной последовательности константных доменов. Аминокислотные последовательности легкой цепи хорошо известны в данной области техники. В конкретных аспектах легкая цепь представляет собой легкую цепь человека.

[0075] Термины «VL» и «VL домен» используются взаимозаменяемо для обозначения переменной области легкой цепи антитела.

[0076] Термины «VH» и «VH домен» используются взаимозаменяемо для обозначения переменной области тяжелой цепи антитела.

[0077] Используемые в данном документе термины «константная область» или «константный домен» являются взаимозаменяемыми и имеют общепринятое значение в данной области техники. Константная область представляет собой фрагмент антитела, *например*, карбоксильный концевой фрагмент легкой и/или тяжелой цепи, который не участвует напрямую в связывании антитела с антигеном, но который может проявлять различные эффекторные функции, такие как взаимодействие с рецептором Fc. Константная область молекулы иммуноглобулина обычно имеет более консервативную аминокислотную последовательность по сравнению с переменной областью иммуноглобулина.

[0078] Термины «Fc-область» (кристаллизующийся фрагмент иммуноглобулина) или «Fc-домен» или «Fc» относятся к C-концевой области тяжелой цепи антитела, которая опосредует связывание иммуноглобулина с тканями или факторами организма-хозяина, включая связывание с Fc рецепторами, расположенными на различных клетках иммунной системы (*например*, эффекторных клетках) или с первым компонентом (C1q) классической системы комплемента. Таким образом, Fc-область содержит константную область антитела, за исключением первого константного домена иммуноглобулина (*например*, CH1 или CL). В изоформах антител IgG, IgA и IgD Fc-область содержит два идентичных фрагмента белка, происходящих из второго (CH2) и третьего (CH3) константных доменов двух тяжелых цепей антитела; Fc-области IgM и IgE содержат три константных домена тяжелой цепи (домены CH 2-4) в каждой полипептидной цепи. Для IgG Fc-область содержит домены иммуноглобулинов C γ 2 и C γ 3 и шарнир между C γ 1 и C γ 2. Хотя границы Fc-области тяжелой цепи иммуноглобулина могут варьироваться, Fc-область тяжелой цепи человеческого IgG обычно определяют как участок от аминокислотного остатка в положении C226 или от P230 (или аминокислоты между этими двумя аминокислотами) до карбоксиконца тяжелой цепи, где нумерация соответствует индексу EU, как в системе Kabat. Домен CH2 Fc-области человеческого IgG простирается примерно от 231 аминокислоты до примерно 340 аминокислоты, тогда как домен CH3 расположен на C-концевой стороне домена CH2 в Fc-области, *т.е.* он простирается примерно от 341 аминокислоты до примерно 447 аминокислоты IgG. Используемая в данном документе фраза «Fc-область» может быть с Fc нативной последовательностью,

включая любой аллотипический вариант, или вариант Fc (*например*, не встречающийся в природе Fc). Fc также может относиться к этой области отдельно или в контексте полипептида, содержащего Fc, такого как «связывающий белок, содержащий Fc-область», также называемый «Fc-слитый белок» (*например*, антитело или иммуноадгезия).

[0079] «Fc-область с нативной последовательностью» или «Fc с нативной последовательностью» содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности Fc-области, встречающейся в природе. Нативная последовательность Fc-областей человека включает нативную последовательность Fc-области IgG1 человека; нативную последовательность Fc-области IgG2 человека; нативную последовательность Fc-области IgG3 человека; и нативную последовательность Fc-области IgG4 человека, а также встречающиеся в природе варианты указанных последовательностей. Нативная последовательность Fc включает различные аллотипы Fc (*см.*, *например*, Jefferis *et al.*, (2009) *mAbs* 1:1; Vidarsson G. *et al. Front Immunol.* 5:520 (опубликовано онлайн 20 октября 2014 г.)).

[0080] «Fc-рецептор» или «FcR» представляет собой рецептор, который связывается с Fc-областью иммуноглобулина. FcR, которые связываются с антителом IgG, содержат рецепторы семейства FcγR, включая аллельные варианты и альтернативно сплайсированные формы этих рецепторов. Семейство FcγR состоит из трех активирующих рецепторов (FcγRI, FcγRIII и FcγRIV у мышей; FcγRIA, FcγRIIA и FcγRIIA у людей) и одного ингибиторного (FcγRIIB) рецептора. Человеческий IgG1 связывается с большинством человеческих Fc-рецепторов и вызывает наиболее сильные эффекторные функции Fc. Считается, что он эквивалентен мышинному IgG2a в отношении типов активирующих Fc-рецепторов, с которыми он связывается. Напротив, человеческий IgG4 вызывает наименьшие эффекторные функции Fc. Vidarsson G. *et al. Front Immunol.* 5:520 (опубликовано онлайн 20 октября 2014 г.).

[0081] Константную область можно изменять, *например*, с помощью рекомбинантной технологии, чтобы устранить одну или более эффекторных функций. Термин «эффекторная функция» относится к взаимодействию Fc-области антитела с Fc-рецептором или лигандом или к биохимическому событию, которое возникает в результате этого. Примеры «эффекторных функций» включают связывание C1q, комплементзависимую цитотоксичность (complement dependent cytotoxicity - CDC), связывание Fc-рецептора, FcγR-опосредованные эффекторные функции, такие как ADCC и антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз (antibody dependent cell-mediated phagocytosis - ADCP), а также подавляющую регуляцию рецептора клеточной поверхности (*например*, рецептор В-клеток; BCR). Такие эффекторные функции обычно необходимы, чтобы Fc-область была объединена со связывающим доменом (*например*, вариабельным доменом антитела). Соответственно, термин «константная область без Fc функции» относится к константным областям с пониженной или отсутствующей одной или более эффекторными функциями, опосредованными Fc-областью.

[0082] Эффекторные функции антитела можно уменьшить или устранить с помощью различных подходов. Эффекторные функции антитела можно уменьшить или устранить путем использования фрагментов антитела, лишенных Fc-области (*например*, таких как Fab, F(ab')₂, одноцепочечный Fv (scFv) или sdAb, состоящий из мономерного VH или VL домена). Альтернативно, так называемые агликозилированные антитела могут быть получены путем удаления сахаров, которые связаны с определенными остатками в Fc-области, для снижения эффекторных функций антитела при сохранении других ценных качеств Fc-области (*например*, более длительного периода полужизни и гетеродимеризации). Агликозилированные антитела могут быть получены, например, путем удаления или изменения остатка, к которому присоединен сахар, ферментативного удаления сахаров, продуцирования антитела в клетках, культивируемых в присутствии

ингибитора гликозилирования, или путем экспрессии антитела в клетках, неспособных к гликозилированию белков (*например*, бактериальных клетках-хозяевах). См., *например*, пат. публ. США № 20120100140. Другой подход заключается в использовании Fc-областей из подкласса IgG, которые обладают пониженной эффекторной функцией. Например, антитела IgG2 и IgG4 характеризуются более низким уровнем эффекторных Fc функций, чем IgG1 и IgG3. Остатки, наиболее проксимальные к шарнирной области в домене CH2 Fc-области, отвечают за эффекторные функции антител, поскольку они в основном содержат перекрывающийся сайт связывания для рецепторов C1q (комплемента) и IgG-Fc (FcγR) на эффекторных клетках врожденной иммунной системы. Vidarsson G. *et al. Front Immunol.* 5:520 (опубликовано онлайн 20 октября 2014 г.). Соответственно, антитела со сниженными эффекторными Fc функциями или без них могут быть получены путем создания, *например*, химерной Fc-области, которая содержит домен CH2 из антитела IgG изотипа IgG4 и домен CH3 из антитела IgG изотипа IgG1 или химерная Fc-область, которая содержит шарнирную область из IgG2 и область CH2 из IgG4 (см., *например*, Lau C. *et al. J. Immunol.* 191:4769-4777 (2013)), или Fc-область с мутациями, которые приводят к изменению Fc эффекторных функций, *например*, к снижению или отсутствию Fc функций. Такие Fc-области с мутациями известны в данной области техники. См., *например*, пат. публ. США № 20120100140 и цитированные в ней заявки США и PCT и An *et al., mAbs* 1:6, 572-579 (2009); описания которых полностью включены путем ссылки.

[0083] Термины «шарнир», «шарнирный домен», «шарнирная область» или «шарнирная область антитела» используются взаимозаменяемо и относятся к домену константной области тяжелой цепи, который соединяет домен CH1 с доменом CH2 и включает верхний, средний и нижний фрагменты шарнира (Roux *et al., J. Immunol.* 1998 161:4083). Шарнир обеспечивает различные уровни гибкости между связывающей и эффекторной областями антитела, а также обеспечивает сайты для межмолекулярных дисульфидных связей между двумя константными областями тяжелой цепи. В контексте данного документа шарнир начинается с Glu216 и заканчивается на Gly237 для всех изотипов IgG (Roux *et al., 1998 J Immunol* 161:4083). Последовательности шарнира дикого типа IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 известны в данной области техники. См., *например*, Kabat EA *et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Vidarsson G. et al. Front Immunol.* 5:520 (опубликовано онлайн 20 октября 2014 г.).

[0084] Термин «домен CH1» относится к константной области тяжелой цепи, связывающей переменный домен с шарниром в константном домене тяжелой цепи. В контексте данного документа домен CH1 начинается с A118 и заканчивается на V215. Термин «домен CH1» относится к доменам CH1 дикого типа, а также их естественным вариантам (*например*, аллотипам). Последовательности домена CH1 IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 (включая дикий тип и аллотипы) известны в данной области техники. См., *например*, Kabat EA *et al., (1991) выше* и Vidarsson G. *et al. Front Immunol.* 5:520 (опубликовано онлайн 20 октября 2014 г.). Примеры доменов CH1 включают домены CH1 с мутациями, которые изменяют биологическую активность антитела, *например*, период полужизни, *например*, описанные в пат. публ. США №20120100140 и цитированные в ней патенты и публикации США и публикации PCT.

[0085] Термин «домен CH2» относится к константной области тяжелой цепи, связывающей шарнир с доменом CH3 в константном домене тяжелой цепи. В контексте данного документа домен CH2 начинается с R238 и заканчивается на K340. Термин «домен CH2» относится к доменам CH2 дикого типа, а также их естественным вариантам (*например*, аллотипам). Последовательности домена CH2 IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 (включая дикий тип и аллотипы) известны в данной области техники. См., *например*, Kabat EA *et al., (1991) выше* и Vidarsson G. *et al. Front Immunol.* 5:520 (опубликовано онлайн 20 октября 2014 г.). Примеры доменов

СН2 включают домены СН2 с мутациями, которые изменяют биологическую активность антитела, *например*, период полужизни и/или снижение эффекторной функции Fc, *например*, описанные в пат. публ. США №20120100140 и цитированные в ней патенты и публикации США и публикации РСТ.

[0086] Термин «домен СН3» относится к константной области тяжелой цепи, которая является С-концом по отношению к домену СН2 в константном домене тяжелой цепи. В контексте данного документа домен СН3 начинается с G341 и заканчивается на K447. Термин «домен СН3» относится к доменам СН3 дикого типа, а также их естественным вариантам (*например*, аллотипам). Последовательности домена СН3 IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 (включая дикий тип и аллотипы) известны в данной области техники. См., *например*, Kabat EA *et al.*, (1991) *выше* и Vidarsson G. *et al. Front Immunol.* 5:520 (опубликовано онлайн 20 октября 2014 г.). Примеры доменов СН3 включают домены СН3 с мутациями, которые изменяют биологическую активность антитела, *например*, период полужизни, *например*, описанные в пат. публ. США №20120100140 и цитированные в ней патенты и публикации США и публикации РСТ.

[0087] Используемый в данном документе термин «изотип» относится к классу антител (*например*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD и антитела IgE), которые кодируются генами константной области тяжелой цепи.

[0088] Термин «аллотип» относится к встречающимся в природе вариантам в пределах определенной группы изотипа, причем варианты отличаются несколькими аминокислотами (см., *например*, Jefferis *et al.*, (2009) *mAbs* 1:1). Описанные в данном документе антитела могут быть любого аллотипа. Аллотипы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 известны в данной области техники. См., *например*, Kabat EA *et al.*, (1991) *supra*; Vidarsson G. *et al. Front Immunol.* 5:520 (опубликовано онлайн 20 октября 2014 г.); и Lefranc MP, *mAbs* 1:4, 1-7(2009).

[0089] Выражения «антитело, распознающее антиген» и «антитело, специфическое в отношении антигена» взаимозаменяемо используются в данном документе с термином «антитело, которое избирательно связывается с антигеном».

[0090] В контексте данного документа термин «выделенное антитело» предназначен для обозначения антитела, которое по существу свободно от других антител, имеющих отличную антигенную специфичность (*например*, выделенное антитело, которое избирательно связывается с L1CAM, по существу свободно от антител, которые избирательно связывают антигены, отличные от L1CAM). При этом выделенное антитело, которое избирательно связывается с эпитопом L1CAM, может характеризоваться перекрестной реактивностью с другими белками L1CAM других видов.

[0091] «Аффинность связывания» в целом относится к силе суммарного количества нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (*например*, антитела) и ее связывающим партнером (*например*, антигеном). Если не указано иное, в контексте данного документа «аффинность связывания» относится к действительной аффинности связывания, которая отражает взаимодействие в соотношении 1:1 между членами связывающей пары (*например*, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X к ее партнеру Y обычно может быть представлена константой диссоциации (K_D). Аффинность может быть измерена и/или выражена рядом способов, известных в данной области техники, включая, помимо прочего, константу равновесной диссоциации (K_D) и константу равновесной ассоциации (K_A). K_D рассчитывается как соотношение k_{off}/k_{on} и выражается в виде молярной концентрации (M), тогда как K_A рассчитывается как соотношение k_{on}/k_{off} . k_{on} относится к константе скорости ассоциации, *например*, антитела с антигеном, а k_{off} — к диссоциации, *например*, антитела к антигену. k_{on} и k_{off} могут быть определены методами, известными специалисту в данной области, такими как иммуноанализами (*например*,

твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА)), BIACORE[®], BLI (биослойная интерферометрия) или анализами кинетического исключения (KINEXA[®]).

[0092] Используемые в данном документе термины «специфически связывает», «избирательно распознает», «специфическое связывание», «избирательное связывание» и «избирательно связывает» являются аналогичными терминами в контексте антител и относятся к молекулам (*например*, антителам), которые связываются с антигеном (*например*, эпитопом или иммунным комплексом), поскольку такое связывание подразумевается специалистом в данной области техники. Например, молекула, которая специфически связывается с антигеном, может связываться с другими пептидами или полипептидами, как правило, с более низкой аффинностью, как определено, *например*, с помощью иммуноанализа, BIACORE[®], прибора KINEXA[®] 3000 (Sapidyne Instruments, Boise, ID) или других анализов, известных в данной области техники. В конкретном аспекте молекулы, которые специфически связываются с антигеном, связываются с антигеном с K_A , которая составляет по меньшей мере $2 \log$, $2,5 \log$, $3 \log$, $4 \log$ или больше, чем K_A , когда молекулы связываются с другим антигеном.

[0093] Антитела обычно специфически связываются со своим родственным антигеном с высокой аффинностью, что отражено константой диссоциации (K_D) от 10^{-5} до 10^{-11} М или меньше. Обычно считается, что любая K_D , превышающая примерно 10^{-4} М, указывает на неспецифическое связывание. В контексте данного документа антитело, которое «специфически связывается» с антигеном, относится к антителу, которое связывается с антигеном и практически идентичными антигенами с высокой аффинностью, что означает, что K_D составляет 10^{-7} М или меньше, предпочтительно 10^{-8} М или меньше, еще более предпочтительно 10^{-9} М или меньше, и наиболее предпочтительно от 10^{-8} М до 10^{-10} М или меньше, при определении, *например*, с помощью иммуноанализа (*например*, ИФА) технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR) в BIACORE[™] 2000 с использованием заранее определенного антигена или BLI (биослойная интерферометрия), но не связывается с высокой аффинностью с неродственными антигенами.

[0094] Используемый в данном документе термин «антиген» относится к любому природному или синтетическому иммуногенному веществу, такому как белок, пептид или гаптен. Антигеном может быть LICAM или его фрагмент.

[0095] Используемый в данном документе термин «эпитоп» относится к локализованному участку антигена, с которым антитело может специфически связываться. Эпитоп может представлять собой, например, смежные аминокислоты полипептида (линейный или непрерывный эпитоп), или эпитоп может, например, представлять собой объединенные две или более несмежные области полипептида или полипептидов (конформационный, нелинейный, прерывистый или несмежный эпитоп). Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, как правило, но не всегда, сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные третичной структурой, как правило, теряются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп обычно включает по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 20 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Способы определения того, какие эпитопы связаны с данным антителом (*например*, картирование эпитопов), хорошо известны в данной области техники и включают, например, анализы иммуноблоттингу и иммунопреципитации, где перекрывающиеся или смежные пептиды из (*например*, из LICAM) проверяются на реактивность с данным антителом (*например*, антителом к LICAM). Способы определения пространственной конформации эпитопов включают методы в данной области техники и методы, описанные в данном документе, например, рентгеновскую кристаллографию, 2-мерный ядерный магнитный резонанс и HDX-MS (*см.*, *например*, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)).

[0096] В некоторых аспектах эпитоп, с которым связывается антитело, может быть определен, *например*, с помощью ЯМР-спектроскопии, исследований дифракционной рентгеновской кристаллографии, ИФА, анализов обмена водорода/дейтерия в сочетании с масс-спектрометрией (*например*, жидкостной хроматографией с масс-спектрометрией с электрораспылением), анализов сканирования массива олигопептидов и/или картирования мутагенеза (*например*, картирование направленного мутагенеза). Для рентгеновской кристаллографии кристаллизация может быть выполнена с использованием любого из известных в данной области методов. (*например*, Giege R *et al.*, (1994) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50(Pt 4): 339-350; McPherson A (1990) *Eur J Biochem* 189:1-23; Chayen NE (1997) *Structure* 5: 1269-1274; McPherson A (1976) *J Biol Chem* 251:6300-6303). Антитело: кристаллы антигена могут быть изучены с использованием хорошо известных рентгенографических методов и могут быть уточнены с помощью компьютерного программного обеспечения, такого как X-PLOR. (Yale University, 1992, распространяется Molecular Simulations, Inc.; *см.*, *например*, *Meth Enzymol* (1985) volumes 114 & 115, eds Wyckoff HW *et al.*; U.S. 2004/0014194), и BUSTER (Bricogne G (1993) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 49(Pt 1): 37-60; Bricogne G (1997) *Meth Enzymol* 276A: 361-423, ed Carter CW; Roversi P *et al.*, (2000) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56(Pt 10): 1316-1323). Исследования картирования мутагенеза могут быть выполнены с использованием любого метода, известного специалистам в данной области техники. *См.*, *например*, Champe M *et al.*, (1995) *J Biol Chem* 270: 1388-1394 и Cunningham BC & Wells JA (1989) *Science* 244: 1081-1085 для описания методов исследования мутагенеза, включая методы исследования аланин-сканирующего мутагенеза.

[0097] Термин «картирование эпитопа» относится к процессу идентификации молекулярных детерминант распознавания антитело-антиген.

[0098] Термин «связывается с одним и тем же эпитопом», что и эталонное антитело, означает, что антитела связываются с одним и тем же сегментом аминокислотных остатков, как определено данным методом. Методы определения того, связываются ли антитела с «одним и тем же эпитопом на LICAM» с описанными в данном документе антителами, включают, *например*, методы картирования эпитопа, такие как рентгеноструктурный анализ кристаллов комплексов антиген:антитело, который обеспечивает атомарное разрешение эпитопа и масс-спектрометрия водородно-дейтериевого обмена (HDX-MS). Другие методы контролируют связывание антитела с фрагментами антигена или мутированные вариации антигена, где потеря связывания из-за модификации аминокислотного остатка в последовательности антигена часто считается признаком компонента эпитопа. Кроме того, также могут использоваться вычислительные комбинаторные методы для картирования эпитопов. Эти методы основаны на способности представляющего интерес антитела к аффинному выделению специфических коротких пептидов из фагового дисплея пептидных комбинаторных библиотек. Ожидается, что антитела, имеющие одинаковые последовательности VH и VL или одинаковые последовательности CDR1, 2 и 3, будут связываться с одним и тем же эпитопом.

[0099] Антитела, которые «конкурируют с другим антителом за связывание с молекулой-мишенью», относятся к антителам, которые ингибируют (частично или полностью) связывание другого антитела с молекулой-мишенью. Конкурируют ли два антитела друг с другом за связывание с молекулой-мишенью, *то есть*, ингибирует ли одно антитело связывание другого антитела с молекулой-мишенью и в какой степени, можно определить с помощью известных экспериментов по конкурентному связыванию, *например*, анализа поверхностного плазмонного резонанса BIACORE® (SPR). В некоторых аспектах антитело конкурирует с другим антителом и ингибирует его связывание с молекулой-мишенью по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100%. Уровень ингибирования или конкуренции может быть различным в зависимости от того, какое антитело является «блокирующим антителом» (*т.е.* холодное антитело, которое сначала инкубируют

с молекулой-мишенью). Конкурентные анализы можно проводить, как описано, например, в Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harb Protoc; 2006; doi: 10.1101 / pdb.prot4277 или в главе 11 "Using Antibodies" by Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA 1999. Два антитела «перекрестно конкурируют», если антитела блокируют друг друга в обоих направлениях по меньшей мере на 50%, *то есть* независимо от того, контактирует ли с антигеном одно или другое антитело первым в конкурентном эксперименте.

[0100] Анализы конкурентного связывания для определения того, конкурируют ли два антитела или перекрестно конкурируют за связывание, включают: конкуренцию за связывание с клетками, экспрессирующими L1CAM, *например*, с помощью проточной цитометрии, как описано в примерах. Другие методы включают: SPR (*например*, BIACORE®), BLI (биослойная интерферометрия), прямой или непрямой твердофазный радиоиммунологический анализ (RIA), прямой или непрямой твердофазный иммуноферментный анализ (EIA), конкурентный «сэндвич»-анализ (*см.* Stahli *et al.*, *Methods in Enzymology* 9:242 (1983)); прямой твердофазный биотин-авидиновый EIA (*см.* Kirkland *et al.*, *J. Immunol.* 137:3614 (1986)); прямой твердофазный анализ с мечением, прямой твердофазный «сэндвич»-анализ с мечением (*см.* Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988)); прямой твердофазный RIA с использованием метки 1-125 (*см.* Morel *et al.*, *Mol. Immunol.* 25(1):7 (1988)); прямой твердофазный биотин-авидиновый EIA (Cheung *et al.*, *Virology* 176:546 (1990)); и прямой RIA с мечением. (Moldenhauer *et al.*, *Scand. J. Immunol.* 32:77 (1990)).

[0101] Используемые в данном документе термины «специфическое связывание», «селективное связывание», «избирательно связывается» и «специфически связывает» относятся к связыванию антитела с эпитопом на заранее определенном антигене. Обычно антитело (i) связывается с константой равновесной диссоциации (K_D), составляющей приблизительно меньше чем 10^{-7} М, *например*, приблизительно меньше чем 10^{-8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М или даже меньше, если определяется, *например*, методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) на инструменте BIACORE® 2000 с применением, *например*, заранее определенного антигена, рекомбинантного человеческого MICA или MICB в качестве аналита и антитела в качестве лиганда, или с помощью анализа Скэтчарда для определения связывания антитела с антигенположительными клетками, и (ii) связывается с predetermined антигеном с аффинностью, которая по меньшей мере в два раза выше ее аффинности, в отношении связывания с неспецифическим антигеном (*например*, БСА, казеином), отличным от predetermined антигена или близкородственного антигена. Соответственно, антитело, которое «специфически связывается с человеческим L1CAM», относится к антителу, которое связывается с растворимым или клеточно-фиксированным человеческим L1CAM с K_D 10^{-7} М или менее, *например*, примерно менее 10^{-8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М, или даже ниже. Антитело, которое «перекрестно реагирует с L1CAM яванского макака», относится к антителу, которое связывается с L1CAM яванского макака с K_D 10^{-7} М или менее, *например*, примерно менее 10^{-8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М, или даже ниже. В некоторых аспектах такие антитела, которые не реагируют перекрестно с L1CAM из биологических видов, отличных от человека, демонстрируют практически неопределяемое связывание с этими белками в стандартных анализах связывания.

[0102] Термин $\langle k_{assoc} \rangle$ или $\langle k_a \rangle$ в контексте данного документа относится к скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген, тогда как термин $\langle k_{dis} \rangle$ или $\langle k_d \rangle$ в контексте данного документа относится к скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Термин $\langle K_D \rangle$ в контексте данного документа предназначен для обозначения константы диссоциации, получаемой из соотношения k_d к k_a (*m.e.*, k_d/k_a) и выражается в молярной концентрации (М). Значения K_D для антител можно

определить с использованием методов, хорошо известных в данной области техники. Доступные методы определения K_D антитела включают поверхностный плазмонный резонанс, биосенсорную систему, такую как BIACORE[®], систему BLI (биослойная интерферометрия) или проточную цитометрию и анализ Скэтчарда.

[0103] Используемый в данном документе термин «высокая аффинность» к антителу IgG относится к антителу, имеющему K_D 10^{-8} М или меньше, 10^{-9} М или меньше, или 10^{-10} М или меньше для целевого антигена. Однако связывание с «высокой аффинностью» может варьироваться для других изотипов антител. Например, связывание с «высокой аффинностью» для изотипа IgM относится к антителу, имеющему K_D 10^{-10} М или меньше, или 10^{-8} М или меньше.

[0104] Термин « EC_{50} » в контексте анализа *in vitro* или *in vivo* с использованием антитела или его антигенсвязывающего фрагмента относится к концентрации антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которая вызывает ответ, который составляет 50% от максимального ответа, *т. е.* посередине между максимальным ответом и исходным уровнем.

[0105] «Биспецифическое» или «бифункциональное антитело» представляет собой искусственное гибридное антитело, имеющее две разные пары тяжелой/легкой цепи и два разных сайта связывания. Биспецифические антитела могут быть получены различными способами, включая слияние гибридом или связывание Fab'-фрагментов. См., например, Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321 (1990); Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148, 1547-1553 (1992).

[0106] В контексте данного документа термин «моноклональное антитело» относится к антителу, которое проявляет единичную специфичность связывания и аффинность в отношении конкретного эпитопа, или к композиции антител, в которой все антитела проявляют единичную специфичность связывания и аффинность в отношении конкретного эпитопа. Соответственно, термин «человеческое моноклональное антитело» относится к антителу или композиции антител, которые демонстрируют единичную специфичность связывания и которые имеют переменные и необязательные константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. В одном аспекте человеческие моноклональные антитела вырабатываются гибридомой, которая содержит В-клетки, полученные от трансгенного отличного от человека животного, например, трансгенной мыши, имеющего геном, содержащий трансген человеческой тяжелой цепи и трансген легкой цепи, слитый с immortalized клетками и/или с комбинаторных библиотек рекомбинантных антител человека.

[0107] В контексте данного документа термин «рекомбинантное человеческое антитело» включает все человеческие антитела, которые готовят, экспрессируют, создают или выделяют рекомбинантными способами, такие как (а) антитела, выделенные из организма животного (например, мыши), которое является трансгенным или трансхромосомным в отношении генов человеческого иммуноглобулина, или из полученных из них гибридом, (b) антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии антитела, например, из трансфектомы, (с) антитела, выделенные из комбинаторных библиотек рекомбинантных человеческих антител, и (d) антитела, приготовленные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими способами, которые включают сплайсинг последовательностей генов человеческого иммуноглобулина с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела содержат переменные и константные области, которые используют определенные последовательности иммуноглобулинов зародышевой линии человека, кодируемые генами зародышевой линии, но включают последующие реаранжировки и мутации, которые происходят, например, во время созревания антител. Как известно в данной области (см., например, Lonberg (2005) *Nature Biotech.* 23 (9): 1117-1125), переменная область содержит антигенсвязывающий домен, который кодируется различными генами,

которые перестраиваются с образованием антитела, специфичного для чужеродного антигена. В дополнение к реаранжировке переменная область может быть дополнительно модифицирована путем множественных замен одной аминокислоты (называемых соматической мутацией или гипермутацией) для увеличения сродства антитела к чужеродному антигену. Константная область изменится при дальнейшем ответе на антиген (*т. е.* при переключении изотипа). Следовательно, перестроенные и соматически мутированные молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют полипептиды иммуноглобулинов легкой и тяжелой цепей в ответ на антиген, не могут иметь идентичные последовательности с исходными молекулами нуклеиновой кислоты, а вместо этого будут практически идентичными или похожими (*т. е.* иметь по меньшей мере 80% идентичности).

[0108] «Антитело человека» (HuMAb) относится к антителу, имеющему переменные области, в которых как каркасная, так и CDR области происходят из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Кроме того, если антитело содержит константную область, константную область также получают из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Описанные в данном документе антитела, могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулинов человека зародышевой линии (*например*, мутации, введенные случайным или направленным мутагенезом *in vitro* или с помощью соматической мутации *in vivo*). Однако термин «антитело человека», как он используется в данном документе, не предназначен для включения антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь, были привиты к каркасным последовательностям человека. Термины «человеческие» антитела и «полностью человеческие» антитела используются как синонимы.

[0109] «Химерное антитело» относится к антителу, в котором переменные области происходят от одного вида, а константные области происходят от другого вида, например, антитело, в котором переменные области происходят от антитела мыши, а константные области происходят от человеческого антитела.

[0110] Термин «перекрестно реагирует», используемый в данном документе, относится к способности антитела, описанного в данном документе, связываться с L1CAM других видов. Например, описанное в данном документе антитело, которое связывает человеческий L1CAM, также может связывать другой вид L1CAM (*например*, мышинный L1CAM). В контексте данного документа перекрестная реактивность может быть измерена путем определения специфической реактивности с очищенным антигеном в анализах связывания (*например*, SPR, ИФА) или связывания или иного функционального взаимодействия с клетками, физиологически экспрессирующими L1CAM. Способы определения перекрестной реактивности включают стандартные анализы связывания, как описано в данном документе, например, анализ поверхностного плазмонного резонанса (SPR) BIACORE® с использованием прибора BIACORE® 2000 SPR (Biacore AB, Упсала, Швеция) или методов проточной цитометрии.

[0111] Термин «встречающийся в природе» применительно к объекту в данном документе относится к тому факту, что объект может быть найден в природе. Например, полипептидная или полинуклеотидная последовательность, присутствующая в организме (включая вирусы), которая может быть выделена из природного источника и которая не была намеренно модифицирована человеком в лаборатории, является встречающейся в природе.

[0112] «Полипептид» относится к цепи, содержащей по меньшей мере два последовательно связанных аминокислотных остатка без верхнего предела длины цепи. Один или более аминокислотных остатков в белке могут содержать модификацию, такую как, помимо прочего, гликозилирование, фосфорилирование или образование дисульфидной связи. «Белок» может включать один или более полипептидов.

[0113] В контексте данного документа термин «молекула нуклеиновой кислоты» предназначен для включения как молекул ДНК так и молекул РНК. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечной или двухцепочечной и может быть кДНК.

[0114] «Консервативные аминокислотные замены» относятся к заменам аминокислотного остатка на аминокислотный остаток, имеющий аналогичную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих аналогичные боковые цепи, были определены в данной области техники. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (*например*, лизин, аргинин, гистидин), кислыми боковыми цепями (*например*, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (*например*, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (*например*, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (*например*, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (*например*, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). В некоторых аспектах, прогнозируемый заменимый аминокислотный остаток в антителе к L1CAM замещают другим аминокислотным остатком из того же семейства боковых цепей. Способы идентификации консервативных замен нуклеотидов и аминокислот, которые не уstraляют способность связывания антигена, хорошо известны в данной области (*см.*, *например*, Brummell *et al.*, *Biochem.* 32: 1180-1187 (1993); Kobayashi *et al.* *Protein Eng.* 12(10):879-884 (1999); и Burks *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-417 (1997)).

[0115] Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией от числа совпадающих позиций в последовательностях (*т. е.* % гомологии = число идентичных позиций/общее число позиций x 100) с учетом числа гэпов и длины каждого гэпа, которые необходимо вносить для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями можно осуществлять с помощью математического алгоритма, как описано в неограничивающих примерах ниже.

[0116] Процент идентичности между двумя нуклеотидными последовательностями может быть определен с помощью программы GAP в пакете программного обеспечения GCG (доступно на веб-сайте worldwideweb.gcg.com), используя матрицу NWSgapdna.CMP и штраф за открытие гэпа 40, 50, 60, 70 или 80 и штраф за продолжение гэпа 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Процент идентичности между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями также можно определять, используя алгоритм E. Meyers и W. Miller (*CABIOS*, 4: 11-17 (1989)), который был включен в программу ALIGN (версия 2.0), используя таблицу весов замен остатков PAM120, штраф за продолжение гэпа 12 и штраф за открытие гэпа 4. Процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями можно определять, используя алгоритм Needleman и Wunsch (*J. Mol. Biol.* (48):444-453 (1970)), который был включен в программу GAP из пакета программного обеспечения GCG (доступно на веб-сайте <http://www.gcg.com>), используя матрицу Blossum 62 или матрицу PAM250 и штраф за открытие гэпа 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4, и штраф за продолжение гэпа 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

[0117] Последовательности нуклеиновых кислот и белков, описанные в данном документе, дополнительно можно использовать в качестве «запрашиваемой последовательности» для проведения поиска по общедоступным базам данных, например, для определения родственных последовательностей. Такой поиск можно проводить, используя программы NBLAST и XBLAST (версия 2.0) по Altschul, *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. Нуклеотидный поиск BLAST можно осуществлять с помощью программы NBLAST, показатель = 100, длина слова = 12, для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных с молекулами нуклеиновых кислот, описанных в данном документе. Белковый поиск BLAST можно осуществлять с помощью программы XBLAST, показатель = 50, длина слова = 3, для получения аминокислотных

последовательностей, гомологичных с белковыми молекулами, описанными в данном документе. Для получения выравнивания с внесенными в целях сравнения гэпами можно использовать BLAST с гэпами, как описано в Altschul *et al.*, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402. При использовании программ BLAST и BLAST с гэпами можно использовать параметры по умолчанию соответствующих программ (*например*, XBLAST и NBLAST). См. worldwideweb.ncbi.nlm.nih.gov.

[0118] Нуклеиновые кислоты могут присутствовать в целых клетках, в клеточном лизате или в частично очищенной или практически чистой форме. Нуклеиновая кислота «выделяется» или «становится практически чистой» при очистке от других клеточных компонентов или других загрязнителей, *например*, других клеточных нуклеиновых кислот (*например*, других частей хромосомы) или белков с помощью стандартных методов, включая обработку щелочью/SDS, разделение в CsCl, хроматографию на колонке, электрофорез в агарозном геле и другие, хорошо известные в данной области техники. См. F. Ausubel, *et al.*, ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987).

[0119] Нуклеиновые кислоты, *например* кДНК, можно мутировать в соответствии со стандартными методами для получения последовательностей генов. Для кодирующих последовательностей эти мутации могут по желанию влиять на аминокислотную последовательность. В частности, рассматриваются последовательности ДНК, по существу гомологичные или полученные от нативных последовательностей V, D, J, констант, переключателей и других подобных последовательностей, описанных в данном документе (где «полученные» означает, что последовательность идентична или модифицирована из другой последовательности).

[0120] Термин «вектор» в контексте данного документа предназначен для обозначения молекулы нуклеиновой кислоты, способной переносить другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Один тип вектора представляет собой «плазмиду», которая относится к петле двухцепочечной кольцевой ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Другой тип вектора представляет собой вирусный вектор, в котором дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Некоторые векторы способны к независимой репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (*например*, бактериальные векторы, имеющие бактериальную природу репликации и эписомные векторы млекопитающего). Другие векторы (*например*, неэписомальные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина после внесения в клетку-хозяина и, таким образом, реплицируются вместе с геномом хозяина. Кроме того, определенные векторы могут управлять экспрессией генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называются в данном документе «рекомбинантными экспрессионными векторами» (или просто «экспрессионными векторами»). В целом, векторы, используемые в технологиях рекомбинантных ДНК, часто имеют форму плазмид. В данном описании «плазида» и «вектор» могут использоваться взаимозаменяемо, поскольку плазида является наиболее часто используемой формой вектора. Однако также включены другие формы экспрессионных векторов, такие как вирусные векторы (*например*, ретровирусы с дефектной репликацией, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые выполняют эквивалентные функции.

[0121] Термин «рекомбинантная клетка-хозяин» (или просто «клетка-хозяин») в контексте данного описания предназначен для обозначения клетки, которая содержит нуклеиновую кислоту, которая в природе не присутствует в клетке, и может представлять собой клетку, в которую был введен рекомбинантный вектор экспрессии. Следует понимать, что такие термины предназначены для обозначения не только конкретной рассматриваемой клетки, но и потомства такой клетки. Поскольку определенные модификации могут происходить в последующих поколениях из-за мутаций или влияний окружающей среды, такое потомство

может фактически не быть идентичным исходной клетке, но все же включено в объем термина «клетка-хозяин», который используется в данном документе.

[0122] Используемый в данном документе термин «связанная» относится к ассоциации двух или более молекул. Связь может быть ковалентной или нековалентной. Связь также может быть генетической (*т.е.* рекомбинантно слитой). Такие связи могут быть достигнуты с использованием широкого спектра методов, известных в данной области техники, таких как химическая конъюгация и получение рекомбинантного белка.

[0123] «Иммунный ответ» понятен в данной области техники и обычно относится к биологическому ответу у позвоночных организмов на чужеродные агенты или аномальные, *например*, раковые клетки, который защищает организм от этих агентов и заболеваний, вызываемых ими. Иммунный ответ опосредован действием одной или нескольких клеток иммунной системы (например, Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, натуральных клеток-киллеров (NK), макрофагов, эозинофилов, тучных клеток, дендритных клеток или нейтрофилов) и растворимых макромолекул, продуцируемых любой из этих клеток или печенью (включая антитела, цитокины и систему комплемента), что приводит к избирательному нацеливанию, связыванию, повреждению, разрушению и/или удалению из тела позвоночного вторгающихся патогенов, клеток или тканей, инфицированных патогенами, раковых или других аномальных клеток или, в случае аутоиммунитета или патологического воспаления, нормальных клеток или тканей человека. Иммунная реакция включает, *например*, активацию или ингибирование Т-клеток, *например*, эффекторных Т-клеток, Th-клеток, CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток или Трег-клеток, или активацию или ингибирование любых других клеток иммунной системы, *например*, NK-клеток.

[0124] «Иммунотерапия» относится к лечению субъекта, страдающего или подверженного риску заражения или страдающего рецидивом заболевания, с помощью способа, включающего индукцию, усиление, подавление или иное изменение иммунной системы или иммунного ответа.

[0125] Используемый в данном документе термин «введение» относится к физическому введению терапевтического агента или композиции, содержащей терапевтический агент, субъекту с использованием любого из различных способов и систем доставки, известных специалистам в данной области техники. Предпочтительные пути введения антител, описанные в данном документе, включают внутривенный, внутрибрюшинный, внутримышечный, подкожный, спинномозговой или другие парентеральные пути введения, например, путем инъекции или инфузии. В контексте данного документа выражение «парентеральное введение» означает режимы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно посредством инъекции, и включают, без ограничения, внутривенную, внутрибрюшинную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрелимфатическую, внутриочаговую, интракапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, интрадермальную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, внутрижелудочковую, интравитреальную, эпидуральную и интрастеральную инъекцию и инфузию, а также с использованием электропорации *in vivo*. Альтернативно, описанное в данном документе антитело можно вводить непарентеральным путем, таким как местный, эпидермальный или мукозальный путь введения, например интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно. Введение также может быть выполнено, например, один раз, много раз и/или в течение одного или нескольких продолжительных периодов.

[0126] В контексте данного документа выражение «подавляет рост опухоли» включает любое измеримое снижение роста опухоли, *например*, ингибирование роста опухоли по меньшей мере примерно на 10%, например, по меньшей мере примерно на 20%, по меньшей мере примерно на 30%, по меньшей мере примерно

на 40%, по меньшей мере примерно на 50%, по меньшей мере примерно на 60%, по меньшей мере примерно на 70%, по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 90%, по меньшей мере примерно на 99% или на 100 %. В некоторых аспектах ингибирование роста опухоли измеряется как процент ингибирования роста опухоли (TGI%). TGI% может быть определен путем вычисления TGI по времени «t», рассчитанному для всех экспериментальных животных по формуле: $[1 - ((T_t/T_0) / (C_t/C_0))] / [(C_t - C_0)/C_t] * 100$ [Формула 1], где T_t = индивидуальный размер опухоли обработанного животного в момент времени «t», T_0 = индивидуальный размер опухоли обработанного животного при первом измерении, C_t = средний размер опухоли контрольных животных во время «t», C_0 = средний размер опухоли контрольных животных при первом измерении.

[0127] Используемый в данном документе термин «рак» относится к широкой группе заболеваний, характеризующихся неконтролируемым ростом аномальных клеток в организме. Нерегулируемое деление клеток может привести к образованию злокачественных опухолей или клеток, которые проникают в соседние ткани и могут метастазировать в отдаленные части тела через лимфатическую систему или кровотоки.

[0128] Термины «лечить», «процесс лечения» и «лечение» в контексте данного документа относятся к любому типу вмешательства или процессу, выполняемому у субъекта, или введению активного агента субъекту с целью обращения, улучшения, облегчения, ингибирования или замедления или предотвращения прогрессирования, развития, тяжести или рецидива симптома, осложнения, состояния или биохимических показателей, ассоциированных с заболеванием, или повышения общей выживаемости. Лечение может относиться к субъекту, страдающему заболеванием, или субъекту, у которого нет заболевания (*например*, в целях профилактики).

[0129] Термин «эффективная доза» или «эффективная дозировка» определяется как количество, достаточное для достижения или по меньшей мере частичного достижения желаемого эффекта. «Терапевтически эффективное количество» или «терапевтически эффективная дозировка» лекарственного средства или терапевтического агента представляет собой любое количество лекарственного средства, которое при использовании отдельно или в комбинации с другим терапевтическим агентом способствует регрессу заболевания, о чем свидетельствует уменьшение тяжести симптомов заболевания, увеличение частоты и продолжительности бессимптомных периодов заболевания, увеличение общей выживаемости (промежуток времени с даты постановки диагноза или начала лечения заболевания, такого как рак, в течение которого пациенты, у которых диагностировано заболевание, все еще остаются живыми), или предотвращение ухудшения состояния или инвалидности из-за болезни. Терапевтически эффективное количество или дозировка лекарственного препарата включает «профилактически эффективное количество» или «профилактически эффективную дозировку», которая представляет собой любое количество лекарственного препарата, которое при введении отдельно или в комбинации с другим терапевтическим агентом субъекту с риском развития заболевания или рецидива заболевания ингибирует развитие или рецидив заболевания. Способность терапевтического агента способствовать регрессии заболевания или ингибировать развитие или рецидив заболевания может быть оценена с использованием множества способов, известных квалифицированному практикующему врачу, например, у людей во время клинических испытаний, в системах животных моделей, предсказывающих эффективность применения у людей или путем анализа активности агента в анализах *in vitro*.

[0130] В качестве примера противораковое средство представляет собой лекарство, которое способствует регрессу рака у субъекта. В некоторых аспектах терапевтически эффективное количество лекарственного средства способствует регрессу рака до точки его устранения. «Способствует регрессу заболевания» означает,

что введение эффективного количества лекарственного средства, отдельно или в комбинации с антинеопластическим агентом, приводит к уменьшению роста или размера опухоли, некрозу опухоли, уменьшению тяжести по меньшей мере одного симптома заболевания, увеличение частоты и продолжительности бессимптомных периодов заболевания, увеличение общей выживаемости, предотвращение ухудшения или инвалидности из-за заболевания или иное улучшение симптомов заболевания у пациента. Кроме того, термины «эффективный» и «эффективность» в отношении лечения включают как фармакологическую эффективность, так и физиологическую безопасность. Фармакологическая эффективность относится к способности лекарственного средства способствовать регрессу рака у пациента. Физиологическая безопасность относится к уровню токсичности или других неблагоприятных физиологических эффектов на клеточном, органном и/или организменном уровне (побочные эффекты), возникающих в результате введения лекарственного средства.

[0131] В качестве примера для лечения опухолей терапевтически эффективное количество или дозировка лекарственного средства подавляет рост клеток или рост опухоли по меньшей мере примерно на 20%, по меньшей мере примерно на 40%, по меньшей мере примерно на 60% или по меньшей мере примерно на 80% относительно субъектов, не получавших лечение. В некоторых аспектах терапевтически эффективное количество или дозировка лекарственного средства полностью подавляет рост клеток или рост опухоли, *т.е.* ингибирует рост клеток или рост опухоли на 100%. Способность соединения ингибировать рост опухоли можно оценить с помощью анализов, описанных ниже. Альтернативно, это свойство композиции можно оценить, исследуя способность соединения ингибировать рост клеток, такое ингибирование можно измерить *in vitro* с помощью анализов, известных специалисту в данной области техники. В некоторых аспектах, описанных в данном документе, регресс опухоли может наблюдаться и продолжаться в течение периода по меньшей мере примерно 20 дней, по меньшей мере примерно 40 дней или по меньшей мере примерно 60 дней.

[0132] В контексте данного документа термин «субъект» включает любого человека или животного, не являющегося человеком. Термин «отличное от человека животное» включает всех позвоночных, *например*, млекопитающих и не млекопитающих, таких как отличные от человека приматы, овцы, собаки, коровы, куры, амфибии, рептилии и т. д.

[0133] В контексте данного документа термины «микрог» и «микроМ» используются взаимозаменяемо с «мкг» и «мкМ», соответственно.

[0134] Различные аспекты, описанные в данном документе, более подробно описаны в следующих подразделах.

II. Антитела к L1CAM

[0135] В данном документе описаны антитела, *например* моноклональные антитела, которые характеризуются конкретными функциональными особенностями или свойствами. Например, антитела специфически связываются с L1CAM млекопитающих (например, человека и мыши) и проявляют одно или более из следующих функциональных свойств:

- (a) демонстрирует повышенную продуцируемость по сравнению с антителом mAb417
- (b) проявляет повышенную аффинность, измеренную с помощью константы равновесной диссоциации (K_D), по сравнению с антителом mAb417;
- (c) демонстрирует повышенное значение PI по сравнению с антителом mAb417;
- (d) проявляет повышенную аффинность, измеренную с помощью константы равновесной ассоциации (K), по сравнению с антителом mAb417;

(е) предотвращает и/или лечит заболевания или патологические состояния, которые включают опухоль; или

(f) любую их комбинацию.

[0136] В некоторых аспектах антитело к L1CAM или его антигенсвязывающий фрагмент проявляет повышенную продуцируемость по сравнению с антителом mAb417, например, улучшенная продуцируемость составляет по меньшей мере 55 мг/л, по меньшей мере 56 мг/л, по меньшей мере 57 мг/л, по меньшей мере, 58 мг/л, по меньшей мере 59 мг/л, по меньшей мере примерно 60 мг/л, по меньшей мере примерно 61 мг/л, по меньшей мере примерно 62 мг/л, по меньшей мере примерно 63 мг/л, по меньшей мере примерно 64 мг/л, по меньшей мере примерно 65 мг/л, по меньшей мере примерно 66 мг/л, по меньшей мере примерно 67 мг/л, по меньшей мере примерно 68 мг/л, по меньшей мере примерно 69 мг/л, по меньшей мере примерно 70 мг/л, по меньшей мере примерно 71 мг/л, по меньшей мере примерно 72 мг/л, по меньшей мере примерно 73 мг/л, по меньшей мере примерно 74 мг/л, по меньшей мере примерно 75 мг/л, по меньшей мере примерно 76 мг/л, по меньшей мере примерно 77 мг/л, по меньшей мере примерно 78 мг/л, по меньшей мере примерно 79 мг/л, по меньшей мере примерно 80 мг/л, по меньшей мере примерно 81 мг/л, по меньшей мере примерно 82 мг/л, по меньшей мере примерно 83 мг/л, по меньшей мере примерно 84 мг/л или по меньшей мере примерно 85 мг/л при экспрессии в соответствии с примером 3.

[0137] В некоторых аспектах описанное в данном документе антитело к L1CAM или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с L1CAM человека с высокой аффинностью, например, с K_D менее $2,6 \times 10^{-10}$ М, менее $2,5 \times 10^{-10}$ М, менее $2,0 \times 10^{-10}$ М, менее $1,5 \times 10^{-10}$ М, менее $1,0 \times 10^{-10}$ М, менее 9×10^{-11} М, менее 8×10^{-11} М, менее 7×10^{-11} М, менее 6×10^{-11} М, менее 5×10^{-11} М, менее 4×10^{-11} М, менее 3×10^{-11} М, менее 2×10^{-11} М, менее 1×10^{-11} М, менее 9×10^{-12} М, менее 8×10^{-12} М, менее 7×10^{-12} М, менее 6×10^{-12} М, менее 5×10^{-12} М, менее 4×10^{-12} М, менее 3×10^{-12} М, менее 2×10^{-12} М, менее 1×10^{-12} М, менее 9×10^{-13} М или менее 8×10^{-13} М, *например* при измерении методом биослойной интерферометрии (BLI) (*например*, как описано в примерах). В некоторых аспектах антитело к L1CAM или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с L1CAM человека с K_D менее 2×10^{-10} М, менее $1,9 \times 10^{-10}$ М, менее $1,8 \times 10^{-10}$ М, менее $1,7 \times 10^{-10}$ М, менее $1,6 \times 10^{-10}$ М, менее $1,5 \times 10^{-10}$ М, менее $1,4 \times 10^{-10}$ М, менее $1,3 \times 10^{-10}$ М, менее $1,2 \times 10^{-10}$ М или менее $1,1 \times 10^{-10}$ М. В некоторых аспектах антитело к L1CAM или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с L1CAM человека с K_D менее $1,1 \times 10^{-10}$ М. В других аспектов, антитело к L1CAM или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с L1CAM человека с K_D менее 9×10^{-12} М. В некоторых аспектах антитело к L1CAM или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с L1CAM человека с K_D менее 1×10^{-12} М. В некоторых аспектах антитело к L1CAM или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с L1CAM человека с K_D менее 8×10^{-11} М. В некоторых аспектах антитело к L1CAM или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с L1CAM человека с K_D менее 1×10^{-12} М. В некоторых аспектах антитело к L1CAM или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с L1CAM человека с K_D менее чем $1,05 \times 10^{-10}$ М. В некоторых аспектах антитело к L1CAM или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с L1CAM человека с K_D примерно $8,22 \times 10^{-12}$ М. В некоторых аспектах антитело к L1CAM или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с L1CAM человека с K_D примерно $7,4 \times 10^{-11}$ М. В некоторых аспектах антитело к L1CAM или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с L1CAM человека с K_D примерно $9,6 \times 10^{-11}$ М.

[0138] В некоторых аспектах описанное в данном документе антитело к L1CAM или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с L1CAM человека с высокой аффинностью,

например, с К менее 5×10^{-10} М, менее 4×10^{-10} М, менее 3×10^{-10} М, менее 2×10^{-10} М, менее $1,0 \times 10^{-10}$ М, менее 9×10^{-11} М, менее 8×10^{-11} М, менее 7×10^{-11} М, менее 6×10^{-11} М, менее 5×10^{-11} М, менее 4×10^{-11} М, менее 3×10^{-11} М, менее 2×10^{-11} М, менее 1×10^{-11} М, менее 9×10^{-12} М, менее 8×10^{-12} М, менее 7×10^{-12} М, менее 6×10^{-12} М, менее 5×10^{-12} М, менее 4×10^{-12} М, менее 3×10^{-12} М, менее 2×10^{-12} М, менее 1×10^{-12} М, менее 9×10^{-13} М или менее 8×10^{-13} М, *например*, при измерении с помощью ИФА (*например*, как описано в примерах).

[0139] Стандартные анализы для оценки связывающей способности антитела к L1CAM различных видов известны в данной области техники, включая, например, ИФА, вестерн-блоттинг и RIA. Подходящие анализы подробно описаны в примерах. Кинетику связывания (*например*, аффинность связывания) антител также можно оценить стандартными анализами, известными в данной области техники, такими как ИФА, анализ BIACORE® или KINEXA®. Анализы для оценки эффектов антител на функциональные свойства L1CAM (*например*, связывание лиганда) более подробно описаны *ниже* и в примерах.

[0140] В некоторых аспектах антитело к L1CAM или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрирует повышенное значение изоэлектрической точки (PI) менее 9,6, менее 9,5, менее 9,4, менее 9,3, менее 9,2, менее 9,1, менее 9,0, менее 8,9, менее 8,8, менее 8,7, менее 8,6, менее 8,5, менее 8,4, менее 8,3, менее 8,2, менее 8,1, менее 8,0, менее 7,9, менее 7,8, менее 7,7 или менее 7,6, при измерении с помощью метода капиллярного изоэлектрического фокусирования (cIEF) (*например*, как описано в примерах).

[0141] В некоторых аспектах антитела к L1CAM или их антигенсвязывающие фрагменты специфически связываются с тем же эпитопом L1CAM, что и эталонное антитело, содержащее варибельную область тяжелой цепи (VH) и варибельную область легкой цепи (VL), где: (a) VH эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 23 и VL эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 24, (b) VH эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 25 и VL эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 26, (c) VH эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 27 и VL эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 28, (d) VH эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 29 и VL эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 30 или (e) VH эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 31 и VL эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 32.

[0142] В некоторых аспектах антитела к L1CAM или их антигенсвязывающие фрагменты специфически связываются с тем же эпитопом L1CAM, что и эталонное антитело, содержащее определяющую комплементарность область 1 (CDR1) VH, CDR2 VH и CDR3 VH, и CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, где по меньшей мере одна аминокислота в CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и/или CDR3 VL антитела или его антигенсвязывающего фрагмента отличается от CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и/или CDR3 VL эталонного антитела (*например*, антитела mAb417), где CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH эталонного антитела содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10 соответственно, и CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL эталонного антитела содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 11 соответственно. В некоторых аспектах по меньшей мере одно различие в аминокислотах включает (i) глутамин в 5 остатке в CDR2 VH; (ii) серин в 8 остатке в CDR1 VL; и/или (iii) пролин в 8 остатке в CDR3 VL антитела к L1CAM или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых аспектах по меньшей мере одно аминокислотное различие включает (i) аланин, глицин, фенилаланин, тирозин, треонин, пролин и триптофан в остатках с 3 по 9 соответственно в CDR3 VL; (ii) аланин, глицин, фенилаланин, тирозин, серин, пролин и триптофан в остатках с 3 по 9 соответственно в CDR3 VL или (iii) лейцин, валин или гистидин, триптофан или фенилаланин, тирозин, пролин и триптофан в остатках с 4 по 9 соответственно в CDR3 VL антитела к L1CAM или его антигенсвязывающего фрагмента.

[0143] В некоторых аспектах антитела к L1CAM или их антигенсвязывающие фрагменты перекрестно конкурируют за связывание с тем же эпитопом L1CAM, что и эталонное антитело, содержащее определяющую комплементарность область 1 (CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, и CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, где по меньшей мере одна аминокислота в CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и/или CDR3 VL антитела или его антигенсвязывающего фрагмента отличается от CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и/или CDR3 VL эталонного антитела (например, антитела mAb417), (i) где CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH эталонного антитела содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10 соответственно, и CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL эталонного антитела содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 11 соответственно. В некоторых аспектах по меньшей мере одно различие в аминокислотах включает (i) глутамин в 5 остатке в CDR2 VH; (ii) серин в 8 остатке в CDR1 VL; и/или (iii) пролин в 8 остатке в CDR3 VL антитела к L1CAM или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых аспектах по меньшей мере одно аминокислотное различие включает (i) аланин, глицин, фенилаланин, тирозин, треонин, пролин и триптофан в остатках с 3 по 9 соответственно в CDR3 VL; (ii) аланин, глицин, фенилаланин, тирозин, серин, пролин и триптофан в остатках с 3 по 9 соответственно в CDR3 VL или (iii) лейцин, валин или гистидин, триптофан или фенилаланин, тирозин, пролин и триптофан в остатках с 4 по 9 соответственно в CDR3 VL антитела к L1CAM или его антигенсвязывающего фрагмента.

[0144] В некоторых аспектах антитела к L1CAM или их антигенсвязывающие фрагменты перекрестно конкурируют за связывание с тем же эпитопом L1CAM, что и эталонное антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL), где: (a) VH эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 23 и VL эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 24, (b) VH эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 25 и VL эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 26, (c) VH эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 27 и VL эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 28, (d) VH эталонное антитело содержит SEQ ID NO: 29 и VL эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 30 или (e) VH эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 31 и VL эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 32.

[0145] Конкурирующие антитела связываются с одним и тем же эпитопом, перекрывающимся эпитопом или с соседними эпитопами (*например*, что подтверждается стерическими затруднениями). Конкурируют ли два антитела друг с другом за связывание с мишенью, можно определить с помощью экспериментов по конкурентному связыванию, известных в данной области техники, таких как RIA и EIA.

[0146] Методы определения того, связываются ли два антитела с одним и тем же эпитопом, включают, *например*, методы картирования эпитопа, такие как рентгеноструктурный анализ кристаллов комплексов антиген:антитело, который обеспечивает атомарное разрешение эпитопа и масс-спектрометрия водородно-дейтериевого обмена (HDX-MS), методы контроля связывания антитела с фрагментами антигена или мутированными вариациями антигена, где потеря связывания из-за модификации аминокислотного остатка в последовательности антигена часто считается признаком компонента эпитопа, вычислительные комбинаторные методы для картирования эпитопа.

[0147] В некоторых аспектах в данном документе предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с L1CAM (*например*, L1CAM человека) с 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или более высокой аффинностью, чем к другому белку семейства L1CAM, при измерении с помощью, *например*, иммуноанализа (*например*, ИФА), поверхностного плазмонного резонанса, BLI (биослойной интерферометрии) или анализа кинетического исключения. В конкретном аспекте в данном документе предложено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент,

которое связывается с L1CAM (*например*, с L1CAM человека) без перекрестной реактивности с другим белком семейства L1CAM, при измерении с помощью, *например*, иммуноанализа.

[0148] В некоторых аспектах антитела к L1CAM не являются нативными антителами или не являются антителами, встречающимися в природе. Например, антитела к L1CAM имеют посттрансляционные модификации, которые отличаются от модификаций антител, встречающихся в природе, например, за счет большего, меньшего количества или другого типа посттрансляционной модификации.

III. Примеры антител к L1CAM

[0149] Предложенные антитела, которые можно использовать в описанных в данном документе способах, представляют собой антитела, *например*, моноклональные антитела, имеющие последовательности CDR и/или варибельной области антитела Ab612, Ab4H5, Ab2C2, Ab4H6 и Ab5D12, сконструированные в примерах 1 и 2, а также антитела, имеющие по меньшей мере 80% идентичности (*например*, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98%, по меньшей мере примерно 99% или примерно 100% идентичности) с их варибельной областью или последовательностями CDR. Аминокислотные последовательности VH Ab612, Ab4H5, Ab2C2, Ab4H6 и Ab5D12 приведены в SEQ ID NO: 23, 25, 27, 29 и 31 соответственно. Аминокислотные последовательности VL Ab612, Ab4H5, Ab2C2, Ab4H6 и Ab5D12 приведены в SEQ ID NO: 24, 26, 28, 30 и 32 соответственно.

Таблица 2. Аминокислотные последовательности CDR варибельной области тяжелой цепи (по системе Kabat)

Антитело	VH-CDR1	VH-CDR2	VH-CDR3
κ L1CAM («Ab612»)	RFGMH (SEQ ID NO: 2)	FISNEGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 10)	GRAYGSGSLFDP (SEQ ID NO: 4)
κ L1CAM («Ab4H5»)	RFGMH (SEQ ID NO: 2)	FISNEGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 10)	GRAYGSGSLFDP (SEQ ID NO: 4)
κ L1CAM («Ab2C2»)	RFGMH (SEQ ID NO: 2)	FISNEGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 10)	GRAYGSGSLFDP (SEQ ID NO: 4)
κ L1CAM («Ab4H6»)	RFGMH (SEQ ID NO: 2)	FISNEGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 10)	GRAYGSGSLFDP (SEQ ID NO: 4)
κ L1CAM («Ab5D12»)	RFGMH (SEQ ID NO: 2)	FISNEGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 10)	GRAYGSGSLFDP (SEQ ID NO: 4)

Таблица 3. Аминокислотные последовательности CDR варибельной области легкой цепи (по системе Kabat)

Антитело	VL-CDR1	VL-CDR2	VL-CDR3
κ L1CAM («Ab612»)	RASRTISSYVN (SEQ ID NO: 12)	AASNLHS (SEQ ID NO: 7)	QQSIGRGPVT (SEQ ID NO: 13)
κ L1CAM («Ab4H5»)	RASRTISSYVN (SEQ ID NO: 12)	AASNLHS (SEQ ID NO: 7)	QQAGFYTPWT (SEQ ID NO: 15)

κ L1CAM («Ab2C2»)	RASRTISSYVN (SEQ ID NO: 12)	AASNLHS (SEQ ID NO: 7)	QQAGFYSPWT (SEQ ID NO: 17)
κ L1CAM («Ab4H6»)	RASRTISSYVN (SEQ ID NO: 12)	AASNLHS (SEQ ID NO: 7)	QQSLHFYPWT (SEQ ID NO: 19)
κ L1CAM («Ab5D12»)	RASRTISSYVN (SEQ ID NO: 12)	AASNLHS (SEQ ID NO: 7)	QQSLVWYPWT (SEQ ID NO: 21)

Таблица 4А. Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи

Антигено	Аминокислотная последовательность VH (SEQ ID NO)
κ L1CAM («Ab612»)	EVQLVESGGG WQPGGSLRL SCAASGFTFS RFGMHWVRQA PGKGLEWVAF ISNEGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSANTL Y LQMNSLRAED TAVYYCARGR AYGSGSLFDP WGQGTLLTVS S (SEQ ID NO: 23)
κ L1CAM («Ab4H5»)	EVQLVESGGG WQPGGSLRL SCAASGFTFS RFGMHWVRQA PGKGLEWVAF ISNEGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSANTL Y LQMNSLRAED TAVYYCARGR AYGSGSLFDP WGQGTLLTVS S (SEQ ID NO: 25)
κ L1CAM («Ab2C2»)	EVQLVESGGG WQPGGSLRL SCAASGFTFS RFGMHWVRQA PGKGLEWVAF ISNEGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSANTL Y LQMNSLRAED TAVYYCARGR AYGSGSLFDP WGQGTLLTVS S (SEQ ID NO: 27)
κ L1CAM («Ab4H6»)	EVQLVESGGG WQPGGSLRL SCAASGFTFS RFGMHWVRQA PGKGLEWVAF ISNEGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSANTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGR AYGSGSLFDP WGQGTLLTVS S (SEQ ID NO: 29)
κ L1CAM («Ab5D12»)	EVQLVESGGG WQPGGSLRL SCAASGFTFS RFGMHWVRQA PGKGLEWVAF ISNEGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSANTL Y LQMNSLRAED TAVYYCARGR AYGSGSLFDP WGQGTLLTVS S (SEQ ID NO: 31)

Таблица 4В. Аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи

Антигено	Аминокислотная последовательность VL (SEQ ID NO)
κ L1CAM («Ab612»)	DIQL TQSPSS LSASVGDRVT ITCRASRTIS SYVNWYRQRP GKAPESLIYA ASNLHSGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ SIGRGPVTFG QGKLEIK (SEQ ID NO: 24)
κ L1CAM («Ab4H5»)	DIQL TQSPSS LSASVGDRVT ITCRASRTIS SYVNWYRQRP GKAPESLIYA ASNLHSGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ AGFYTPWTFG QGKLEIK (SEQ ID NO: 26)
κ L1CAM («Ab2C2»)	DIQL TQSPSS LSASVGDRVT ITCRASRTIS SYVNWYRQRP GKAPESLIYA ASNLHSGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ AGFYSPWTFG QGKLEIK (SEQ ID NO: 28)
κ L1CAM («Ab4H6»)	DIQL TQSPSS LSASVGDRVT ITCRASRTIS SYVNWYRQRP GKAPESLIYA ASNLHSGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYC QQSLHFYPWT FG QGKLEIK (SEQ ID NO: 30)
κ L1CAM («Ab5D12»)	DIQL TQSPSS LSASVGDRVT ITCRASRTIS SYVNWYRQRP GKAPESLIYA ASNLHSGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYC QQSLVWYPWT FG QGKLEIK (SEQ ID NO: 32)

[0150] Соответственно, в данном документе предложено выделенное антитело к L1CAM или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее варибельные области тяжелой и легкой цепи, причем варибельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, 25, 27, 29 или 31. В других аспектах выделенное антитело к L1CAM или его антигенсвязывающий фрагмент

содержит CDR вариабельной области тяжелой цепи, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 10 или 4.

[0151] Также предложено выделенное антитело к LICAM или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее вариабельные области тяжелой и легкой цепи, причем вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, 26, 28, 30 или 32. В других аспектах выделенное антитело к LICAM или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR вариабельной области легкой цепи, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 7, 13, 15, 17, 19, или 21.

[0152] В некоторых аспектах выделенное антитело к LICAM или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR вариабельной области тяжелой цепи, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 10 или 4 и CDR вариабельной области легкой цепи, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 7, 13, 15, 17, 19 или 21.

[0153] Также предложено выделенное антитело к LICAM или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее вариабельные области тяжелой и легкой цепей, (i) где вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23 и где вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24; (ii) где вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25 и где вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; (iii) где вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27 и где вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28; (iv) где вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, и где вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30; или (v) где вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, а вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32.

[0154] В данном документе предложено выделенное антитело к LICAM или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, причем вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере примерно 80%, на по меньшей мере примерно 85%, на по меньшей мере примерно 90%, на по меньшей мере примерно 95%, на по меньшей мере примерно 96%, на по меньшей мере примерно 97%, на по меньшей мере примерно 98%, на по меньшей мере примерно 99% или примерно на 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной как SEQ ID NO: 23, 25, 27, 29 или 31.

[0155] Также в данном документе предложено выделенное антитело к LICAM или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, причем вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере примерно 80%, на по меньшей мере примерно 85%, на по меньшей мере примерно 90%, на по меньшей мере примерно 95%, на по меньшей мере примерно 96%, на по меньшей мере примерно 97%, на по меньшей мере примерно 98%, на по меньшей мере примерно 99% или примерно на 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной как SEQ ID NO: 24, 26, 28, 30 или 32.

[0156] Также предложено выделенное антитело к LICAM или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее вариабельные области тяжелой и легкой цепи, причем вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере примерно 80%, на по меньшей мере примерно 85%, на по меньшей мере примерно 90%, на по меньшей мере примерно 95%, на по меньшей мере примерно 96%, на по меньшей мере примерно 97%, на по меньшей мере примерно 98%, на по меньшей мере

мере примерно 99% или примерно на 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной как SEQ ID NO: 23, 25, 27, 29 и 31, и где переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере примерно 80%, на по меньшей мере примерно 85%, на по меньшей мере примерно 90%, на по меньшей мере примерно 95%, на по меньшей мере примерно 96%, на по меньшей мере примерно 97%, на по меньшей мере примерно 98%, на по меньшей мере примерно 99% или примерно на 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной как SEQ ID NO: 24, 26, 28, 30 или 32.

[0157] В некоторых аспектах описание обеспечивает выделенное антитело к LICAM или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее:

(a) последовательности переменной области тяжелой и легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 23 и 24, соответственно;

(b) последовательности переменной области тяжелой и легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 25 и 26, соответственно;

(c) последовательности переменной области тяжелой и легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 27 и 28, соответственно;

(d) последовательности переменной области тяжелой и легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 29 и 30, соответственно; или

(e) последовательности переменной области тяжелой и легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 31 и 32, соответственно.

[0158] Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 VH для антител Ab612, Ab4H5, Ab2C2, Ab4H6 и Ab5D12 приведены в SEQ ID NO: 2, 10 и 4 соответственно. Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 VL для Ab612 приведены в SEQ ID NO: 12, 7 и 13 соответственно. Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 VL для Ab4H5 приведены в SEQ ID NO: 12, 7 и 15 соответственно. Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 VL для Ab2C2 приведены в SEQ ID NO: 12, 7 и 17 соответственно. Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 VL для Ab4H6 приведены в SEQ ID NO: 12, 7 и 19 соответственно. Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 VL для Ab5D12 приведены в SEQ ID NO: 12, 7 и 21 соответственно.

[0159] В некоторых аспектах антитело к LICAM или его антигенсвязывающий фрагмент согласно данному описанию, которое специфически связывается с LICAM человека, содержит:

(a) CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2; и/или

(b) CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; и/или

(c) CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

[0160] В некоторых аспектах антитело к LICAM или его антигенсвязывающий фрагмент согласно данному описанию, которое специфически связывается с LICAM человека, содержит:

(a) CDR1 VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12; и/или

(b) CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; и/или

(c) CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

[0161] В некоторых аспектах антитело к LICAM или его антигенсвязывающий фрагмент согласно данному описанию, которое специфически связывается с LICAM человека, содержит:

(a) CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2;

(b) CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10;

(c) CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4;

[0168] В некоторых аспектах антитело к LICAM или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с LICAM человека, содержит тяжелую цепь (HC) и легкую цепь (LC), причем HC антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит SEQ ID NO:38, а LC антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит SEQ ID NO: 39

[0169] В некоторых аспектах антитело к LICAM или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с LICAM человека, содержит тяжелую цепь (HC) и легкую цепь (LC), причем HC антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит SEQ ID NO:40, а LC антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит SEQ ID NO: 41

[0170] В некоторых аспектах антитело к LICAM или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с LICAM человека, содержит тяжелую цепь (HC) и легкую цепь (LC), причем HC антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит SEQ ID NO:42, а LC антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит SEQ ID NO: 43

[0171] В некоторых аспектах антитело к LICAM или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с LICAM человека, содержит тяжелую цепь (HC) и легкую цепь (LC), причем HC антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит SEQ ID NO:44, а LC антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит SEQ ID NO: 45

[0172] В некоторых аспектах антитело к LICAM или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с LICAM человека, содержит тяжелую цепь (HC) и легкую цепь (LC), причем HC антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит SEQ ID NO:46, а LC антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит SEQ ID NO: 47

Таблица 5А. Аминокислотная последовательность тяжелой цепи

Антитело	Аминокислотная последовательность тяжелой цепи (SEQ ID NO)
κ LICAM («Ab612»)	EVQLVESGGGWQPGGSLRLSCAASGFTFSRFGMHWVRQAPGKGLEWVAFISN EGSNKYYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRAYGSG SLFDPWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:38)
κ LICAM («Ab4H5»)	EVQLVESGGGWQPGGSLRLSCAASGFTFSRFGMHWVRQAPGKGLEWVAFISN EGSNKYYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRAYGSG SLFDPWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:40)
κ LICAM («Ab2C2»)	EVQLVESGGGWQPGGSLRLSCAASGFTFSRFGMHWVRQAPGKGLEWVAFISN EGSNKYYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRAYGSG SLFDPWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:42)

κ L1CAM («Ab4H6»)	EVQLVESGGGWQPGGSLRLSCAASGFTFSRFGMHWVRQAPGKGLEWVAFISN EGSNKYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRAYGSG SLFDPWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:44)
κ L1CAM («Ab5D12»)	EVQLVESGGGWQPGGSLRLSCAASGFTFSRFGMHWVRQAPGKGLEWVAFISN EGSNKYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRAYGSG SLFDPWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:46)

Таблица 5В. Аминокислотная последовательность легкой цепи

Антитело	Аминокислотная последовательность легкой цепи (SEQ ID NO)
κ L1CAM («Ab612»)	DIQL TQSPSS LSASVGDRVT ITCRASRTIS SYVNWYRQRP GKAPESLIYA ASNLHSGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ SIGRGPVTFGQ GTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL Q SGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF N RGECC (SEQ ID NO: 39)
κ L1CAM («Ab4H5»)	DIQL TQSPSS LSASVGDRVT ITCRASRTIS SYVNWYRQRP GKAPESLIYA ASNLHSGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ AGFYTPWTFG QGTKLEIK TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FN RGECC (SEQ ID NO: 41)
κ L1CAM («Ab2C2»)	DIQL TQSPSS LSASVGDRVT ITCRASRTIS SYVNWYRQRP GKAPESLIYA ASNLHSGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ AGFYSPWTFG QGTKLEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK S FNRGEC (SEQ ID NO: 43)
κ L1CAM («Ab4H6»)	DIQL TQSPSS LSASVGDRVT ITCRASRTIS SYVNWYRQRP GKAPESLIYA ASNLHSGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYC QQLHFYPWT FG QGTKLEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK S FNRGEC (SEQ ID NO: 45)
κ L1CAM («Ab5D12»)	DIQL TQSPSS LSASVGDRVT ITCRASRTIS SYVNWYRQRP GKAPESLIYA ASNLHSGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYC QQLVWYPWT FG QGTKLEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK S FNRGEC (SEQ ID NO: 20)

[0173] Домен VH или одна или более его CDR, описанные в данном документе, могут быть связаны с константным доменом для образования тяжелой цепи, *например*, полноразмерной тяжелой цепи. Аналогичным образом, домен VL или одна или более его CDR, описанные в данном документе, могут быть связаны с константным доменом для образования легкой цепи, *например*, полноразмерной легкой цепи. Полноразмерная тяжелая цепь и полноразмерная легкая цепь объединяются с образованием полноразмерного антитела.

[0174] Соответственно, в конкретных аспектах в данном документе предложено антитело, содержащее легкую и тяжелую цепь антитела, *например*, отдельно легкую цепь и тяжелую цепь. Что касается легкой цепи, в конкретном аспекте легкая цепь антитела, описанного в данном документе, представляет собой легкую цепь каппа-типа. В другом конкретном аспекте легкая цепь антитела, описанного в данном документе, представляет собой легкую цепь ламбда-типа. В еще одном конкретном аспекте легкая цепь антитела, описанного в данном документе, представляет собой легкую цепь человека каппа- или ламбда-типа. В конкретном аспекте описанное в данном документе антитело, которое специфически связывается с полипептидом L1CAM (*например*, L1CAM человека), содержит легкую цепь, которая содержит любые аминокислотные последовательности VL или VL CDR, описанные в данном документе, и где константная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность константной области легкой цепи каппа-типа человека. В конкретном аспекте описанное в данном документе антитело, которое специфически связывается с полипептидом L1CAM (*например*, L1CAM человека), содержит легкую цепь, которая содержит аминокислотные последовательности VL или VL CDR, описанные в данном документе, и где константная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность константной области легкой цепи ламбда-типа человека. Неограничивающие примеры последовательностей константных областей человека описаны в данной области техники, *например*, см. патент США № 5693780 и Kabat EA et al, (1991) *выше*.

[0175] Что касается тяжелой цепи, в некоторых аспектах тяжелая цепь антитела, описанного в данном документе, может быть тяжелой цепью альфа- (α), дельта- (δ), эpsilon- (ε), гамма- (γ) или мю-типа (μ). В другом конкретном аспекте тяжелая цепь описанного антитела может содержать тяжелую цепь человека альфа- (α), дельта- (δ), эpsilon- (ε), гамма- (γ) или мю-типа (μ). В одном аспекте описанное в данном документе антитело, которое специфически связывается с L1CAM (*например*, L1CAM человека), содержит тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность VH или VH CDR, описанную в данном документе, и где константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность константной области тяжелой цепи человека гамма-типа (γ). В другом аспекте описанное в данном документе антитело, которое специфически связывается с L1CAM (*например*, с L1CAM человека), содержит тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность VH или VH CDR, описанную в данном документе, и где константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи человека, описанной в данном документе или известная в данной области техники. Неограничивающие примеры последовательностей константных областей человека описаны в данной области техники, *например*, см. патент США № 5693780 и Kabat EA et al., (1991) *выше*.

[0176] В некоторых аспектах описанное в данном документе антитело, которое специфически связывается с L1CAM (*например*, L1CAM человека), содержит домен VL и домен VH, содержащие CDR VH или VH и CDR VL и VL, описанные в данном документе, и где константные области содержат аминокислотные последовательности константных областей молекулы иммуноглобулина IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY или молекулы иммуноглобулина IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY человека. В другом конкретном аспекте описанное в данном документе антитело, которое специфически связывается с L1CAM (*например*, L1CAM

человека), содержит домен VL и домен VH, содержащие любую аминокислотную последовательность, описанную в данном документе, и где константные области содержат аминокислотные последовательности константных областей молекулы иммуноглобулина IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY, любых подклассов (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) молекулы иммуноглобулина. В некоторых аспектах константные области содержат аминокислотные последовательности константных областей IgG человека, которые встречаются в природе, включая подклассы (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4) и аллотипы (например, G1m, G2m, G3m и nG4m) и их варианты. См., например, Vidarsson G. et al. *Front Immunol.* 5:520 (published online Oct. 20, 2014) и Jefferis R. и Lefranc MP, *mAbs* 1:4, 1-7(2009). В некоторых аспектах константные области содержат аминокислотные последовательности константных областей IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека или их вариантов.

[0177] В некоторых аспектах описанное в данном документе антитело к L1CAM или его антигенсвязывающий фрагмент не имеет эффекторных Fc функций, например комплементзависимой цитотоксичности (CDC) и/или антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP). Эффекторные функции опосредуются Fc-областью, и остатки, наиболее проксимальные к шарнирной области в домене CH2 Fc-области, отвечают за эффекторные функции антител, поскольку они в основном содержат перекрывающийся сайт связывания для рецепторов C1q (комплемента) и IgG-Fc (FcγR) на эффекторных клетках врожденной иммунной системы. Кроме того, антитела IgG2 и IgG4 имеют более низкие уровни эффекторных Fc функций, чем антитела IgG1 и IgG3. Эффекторные функции антитела можно уменьшить или устранить с помощью различных подходов, известных в данной области техники, включая (1) использование фрагментов антитела, лишенных Fc-области (например, таких как Fab, F(ab')₂, одноцепочечный Fv (scFv) или sdAb, состоящий из мономерного VH или VL домена); (2) получение агликозилированных антител, которые могут быть получены, например, путем удаления или изменения остатка, к которому присоединен сахар, ферментативного удаления сахаров, продуцирования антитела в клетках, культивируемых в присутствии ингибитора гликозилирования, или путем экспрессии антитела в клетках, неспособных к гликозилированию белков (например, неспособных к гликозилированию белков, см., например, пат. публикацию США № 20120100140); (3) использование Fc-областей из подкласса IgG, которые обладают пониженной эффекторной функцией (например, Fc-области из антител IgG2 или IgG4 или химерной Fc-области, содержащей домен CH2 из антител IgG2 или IgG4, см., например, пат. публикацию США № 20120100140 и Lau C. et al., *J. Immunol.*, 191:4769-4777 (2013)); и (4) создание Fc-области с мутациями, которые приводят к снижению Fc функций или их отсутствию. См., например, пат. публикацию США № 20120100140 и цитированные в ней заявки США и PCT и An et al., *mAbs* 1:6, 572-579 (2009).

[0178] Таким образом, в некоторых аспектах описанное в данном документе антитело к L1CAM или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, одноцепочечный Fv (scFv) или sdAb, состоящий из мономерного домена VH или VL. Такие фрагменты антител хорошо известны в данной области техники и описаны *supra*.

[0179] В некоторых аспектах описанное в данном документе антитело к L1CAM или его антигенсвязывающий фрагмент содержит Fc-область с пониженной или отсутствующей эффекторной Fc функцией. В некоторых аспектах константные области содержат аминокислотные последовательности Fc-области IgG2 или IgG4 человека, в некоторых аспектах антитело к L1CAM имеет изотип IgG2/IgG4. В некоторых аспектах антитело к L1CAM содержит химерную Fc-область, которая содержит домен CH2 из антитела IgG изотипа IgG4 и домен CH3 из антитела IgG изотипа IgG1, или химерную Fc-область, которая содержит шарнирную область из IgG2 и области CH2 из IgG4 или Fc-области с мутациями, которые приводят

к снижению функций Fc или их отсутствию. Fc-области с пониженной или отсутствующей эффекторной Fc функцией содержат области, известные в данной области техники. См., например, Lau C. *et al. J. Immunol.* 191:4769-4777 (2013); An *et al., mAbs* 1:6, 572-579 (2009); и пат. Публ. №20120100140 и цитированные в ней патенты и публикации США и публикации РСТ. Также Fc-области с пониженной или отсутствующей эффекторной Fc функцией могут быть легко созданы специалистом в данной области техники.

IV. Молекулы нуклеиновых кислот

[0180] Другой аспект, описанный в данном документе, относится к одной или более молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют любое из антител или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе. Нуклеиновые кислоты могут присутствовать в целых клетках, в клеточном лизате или в частично очищенной или практически чистой форме. Нуклеиновая кислота «выделяется» или «становится практически чистой» при очистке от других клеточных компонентов или других загрязнителей, например, других клеточных нуклеиновых кислот (например, другой хромосомной ДНК, например, хромосомной ДНК, которая связана с выделенной ДНК из природного источника) или белков с помощью стандартных методов, включая обработку щелочью/SDS, разделение в CsCl, хроматографию на колонке, рестрикционные ферменты, электрофорез в агарозном геле и другие, хорошо известные в данной области техники. См. F. Ausubel, *et al.*, ed. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York. Описанная в данном документе нуклеиновая кислота может быть, например, ДНК или РНК и может содержать или не может содержать интронные последовательности. В определенных аспектах нуклеиновая кислота представляет собой молекулу кДНК.

[0181] Описанные в данном документе нуклеиновые кислоты могут быть получены с использованием стандартных методов молекулярной биологии. Для антител, экспрессируемых гибридомами (например, гибридом, полученных из трансгенных мышей, несущих гены иммуноглобулина человека, как описано ниже), кДНК, кодирующие легкую и тяжелую цепи антитела, полученные с помощью гибридомы, могут быть получены стандартными методами ПЦР-амплификации или клонирования кДНК. Для антител, полученных из библиотеки генов иммуноглобулинов (например, с использованием методов фагового дисплея), нуклеиновая кислота, кодирующая антитело, может быть извлечена из библиотеки.

[0182] Определенные молекулы нуклеиновых кислот, описанные в данном документе, кодируют последовательности VH и VL моноклональных антител Ab612, Ab4H5, Ab2C2, Ab4H6, Ab5D12. Типичные последовательности ДНК, кодирующие последовательность VH Ab612, Ab4H5, Ab2C2, Ab4H6, Ab5D12, приведены в SEQ ID NO: 8, 14, 16, 18 или 22. Типичные последовательности ДНК, кодирующие последовательности VL Ab612, Ab4H5, Ab2C2, Ab4H6, Ab5D12, приведены в SEQ ID NO: 33, 34, 35, 36 и 37 соответственно.

Таблица 6: Полинуклеотидная последовательность варибельной области тяжелой цепи

Антитело	Полинуклеотидная последовательность варибельной области тяжелой цепи (SEQ ID NO)
к L1CAM («Ab612»)	<pre>gaggtgcagctggtggagagcggcggcggcgtggtgcagccggcggcagcctgagactgagctgcgccccagcggctc accttcagcagattcggcatgactgggtgagacagccccggcaaggcctggagtggtggccttcacagcaacgaggg cagcaacaagtactacgccgacagcgtgaagggcagattcaccatcagcagagacaacagcggcaaacacctgtacctgcaga tgaacagcctgagagccgaggacaccgccgtgtactactcgccagaggcagagcctacggcagcggcagcctgttcgacc ctggggccagggcaccctggtgaccgtgagcagc</pre> (SEQ ID NO: 8)

κ L1CAM («Ab4H5»)	gaggtgcagctggtggagagcggcggcggcgtggtgcagcccggcggcagcctgagactgagctgcgccgccagcggcttc accttcagcagattcggcatgactgggtgagacaggccccggcaaggcctggagtggtggccttcacagcaacgaggg cagcaacaagtactacgccgacagcgtgaaggcagattaccatcagcagagacaacagcgccaacaccctgtacctgcaga tgaacagcctgagagccgaggacaccgctgtactactgcgccagaggcagagcctacggcagcggcagcctgttcgaccc ctggggccagggcaccctggtgaccgtgagcagc (SEQ ID NO: 14)
κ L1CAM («Ab2C2»)	gaggtgcagctggtggagagcggcggcggcgtggtgcagcccggcggcagcctgagactgagctgcgccgccagcggcttc accttcagcagattcggcatgactgggtgagacaggccccggcaaggcctggagtggtggccttcacagcaacgaggg cagcaacaagtactacgccgacagcgtgaaggcagattaccatcagcagagacaacagcgccaacaccctgtacctgcaga tgaacagcctgagagccgaggacaccgctgtactactgcgccagaggcagagcctacggcagcggcagcctgttcgaccc ctggggccagggcaccctggtgaccgtgagcagc (SEQ ID NO: 16)
κ L1CAM («Ab4H6»)	gaggtgcagctggtggagagcggcggcggcgtggtgcagcccggcggcagcctgagactgagctgcgccgccagcggcttc accttcagcagattcggcatgactgggtgagacaggccccggcaaggcctggagtggtggccttcacagcaacgaggg cagcaacaagtactacgccgacagcgtgaaggcagattaccatcagcagagacaacagcgccaacaccctgtacctgcaga tgaacagcctgagagccgaggacaccgctgtactactgcgccagaggcagagcctacggcagcggcagcctgttcgaccc ctggggccagggcaccctggtgaccgtgagcagc (SEQ ID NO: 18)
κ L1CAM («Ab5D12»)	gaggtgcagctggtggagagcggcggcggcgtggtgcagcccggcggcagcctgagactgagctgcgccgccagcggcttc accttcagcagattcggcatgactgggtgagacaggccccggcaaggcctggagtggtggccttcacagcaacgaggg cagcaacaagtactacgccgacagcgtgaaggcagattaccatcagcagagacaacagcgccaacaccctgtacctgcaga tgaacagcctgagagccgaggacaccgctgtactactgcgccagaggcagagcctacggcagcggcagcctgttcgaccc ctggggccagggcaccctggtgaccgtgagcagc (SEQ ID NO: 22)

Таблица 7: Полинуклеотидная последовательность вариабельной области легкой цепи

Антигело	Полинуклеотидная последовательность вариабельной области легкой цепи (SEQ ID NO)
κ L1CAM («Ab612»)	GACATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGAC AGAGTGACCATCACCTGCAGAGCCAGCAGAACCATCAGCAGCTACGTGAAC TGGTACAGACAGAGACCCGGCAAGGCCCCCGAGAGCCTGATCTACGCCGCC AGCAACCTGCACAGCGGCGTGCCAGCAGATTTAGCGGCAGCGGCAGCGGC ACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCT ACTACTGCCAGCAGAGCATCGGCAGAGGCCCCCGTGACCTTCGGCCAGGGCA CCAAGCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO: 33)
κ L1CAM («Ab4H5»)	GACATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGAC AGAGTGACCATCACCTGCAGAGCCAGCAGAACCATCAGCAGCTACGTGAAC TGGTACAGACAGAGACCCGGCAAGGCCCCCGAGAGCCTGATCTACGCCGCC AGCAACCTGCACAGCGGCGTGCCAGCAGATTTAGCGGCAGCGGCAGCGGC ACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCT ACTACTGCCAGCAGGCCGGCTTCTACACCCCTGGACCTTCGGCCAGGGCAC CAAGCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO: 34)
κ L1CAM («Ab2C2»)	GACATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGAC AGAGTGACCATCACCTGCAGAGCCAGCAGAACCATCAGCAGCTACGTGAAC TGGTACAGACAGAGACCCGGCAAGGCCCCCGAGAGCCTGATCTACGCCGCC AGCAACCTGCACAGCGGCGTGCCAGCAGATTTAGCGGCAGCGGCAGCGGC ACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCT ACTACTGCCAGCAGGCCGGCTTCTACTCCCTGGACCTTCGGCCAGGGCAC CAAGCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO: 35)
κ L1CAM («Ab4H6»)	GACATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGAC AGAGTGACCATCACCTGCAGAGCCAGCAGAACCATCAGCAGCTACGTGAAC TGGTACAGACAGAGACCCGGCAAGGCCCCCGAGAGCCTGATCTACGCCGCC AGCAACCTGCACAGCGGCGTGCCAGCAGATTTAGCGGCAGCGGCAGCGGC ACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCT ACTACTGCCAGCAGTCCCTGCACTTCTACCCCTGGACCTTCGGCCAGGGCAC CAAGCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO: 36)
κ L1CAM («Ab5D12»)	GACATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGAC AGAGTGACCATCACCTGCAGAGCCAGCAGAACCATCAGCAGCTACGTGAAC TGGTACAGACAGAGACCCGGCAAGGCCCCCGAGAGCCTGATCTACGCCGCC

	AGCAACCTGCACAGCGGGCGTGCCCAGCAGATTTAGCGGCAGCGGCAGCGGC ACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCT ACTACTGCCAGCAGTCCCTGGTGTGGTACCCCTGGACCTTCGGCCAGGGCAC CAAGCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO: 37)
--	--

[0183] Способ получения антитела к L1CAM, описанный в данном документе, может включать экспрессию тяжелой и легкой цепей в линии клеток, содержащей нуклеотидные последовательности, кодирующие тяжелую и легкую цепи, с помощью сигнального пептида. Клетки-хозяева, содержащие эти нуклеотидные последовательности, включены в данный документ.

[0184] Сразу после получения фрагментов ДНК, кодирующих сегменты VH и VL, можно проводить последующие манипуляции с этими фрагментами ДНК с помощью стандартных методов рекомбинантной ДНК например, для преобразования генов варибельной области в гены полноразмерной цепи антитела, в гены фрагментов Fab или в ген scFv. В ходе данных манипуляций фрагмент ДНК, кодирующий VL или VH, функционально связан с другим фрагментом ДНК, кодирующим другой белок, такой как константная область антитела или гибкий линкер. В контексте данного документа термин «функционально связанный» означает, что два фрагмента ДНК объединены таким образом, что аминокислотные последовательности, кодируемые этими двумя фрагментами ДНК, остаются в рамке.

[0185] Выделенная ДНК, кодирующая область VH, может быть преобразована в ген полноразмерной тяжелой цепи путем функционального связывания ДНК, кодирующей VH, с другой молекулой ДНК, кодирующей константные области тяжелой цепи (шарнир, CH1, CH2 и/или CH3). Последовательности генов константной области тяжелой цепи человека известны в данной области техники (см., например, Kabat, EA, et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, US Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242), и фрагменты ДНК, охватывающие эти области, могут быть получены методами ПЦР-амплификации. Константная область тяжелой цепи может быть константной областью IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM или IgD, например, константной областью IgG2 и/или IgG4. Для гена тяжелой цепи Fab-фрагмента ДНК, кодирующая VH, может быть функционально связана с другой молекулой ДНК, кодирующей только константную область CH1 тяжелой цепи.

[0186] Выделенная ДНК, кодирующая область VL, может быть преобразована в ген полноразмерной легкой цепи (а также ген Fab-фрагмента легкой цепи) путем оперативного связывания ДНК, кодирующей VL, с другой молекулой ДНК, кодирующей константную область CL легкой цепи. Последовательности генов константной области легкой цепи человека известны в данной области техники (см., например, Kabat, EA, et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, US Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242), и фрагменты ДНК, охватывающие эти области, могут быть получены методами ПЦР-амплификации. Константная область легкой цепи может быть константной областью каппа или лямбда-типа.

[0187] Для создания гена scFv фрагменты ДНК, кодирующие VH и VL, функционально связаны с другим фрагментом, кодирующим гибкий линкер, например, кодирующим аминокислотную последовательность (Gly4 -Ser)₃, так что последовательности VH и VL могут быть экспрессированы, как непрерывный одноцепочечный белок с областями VL и VH, соединенными гибким линкером (см., например, Bird et al., (1988) Science 242:423-426; Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty et al., (1990) Nature 348:552-554).

[0188] В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к вектору, содержащему изолированную молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В других аспектах векторы могут быть использованы для генной терапии.

[0189] Подходящие векторы для данного изобретения включают векторы экспрессии, вирусные векторы и плазмидные векторы. В одном аспекте вектор представляет собой вирусный вектор.

[0190] Используемый в данном документе вектор экспрессии относится к любой конструкции нуклеиновой кислоты, которая содержит необходимые элементы для транскрипции и трансляции вставленной кодирующей последовательности, или, в случае вирусного вектора РНК, необходимые элементы для репликации и трансляции, при введении в подходящую клетку-хозяина. Векторы экспрессии могут включать плазмиды, фагмиды, вирусы и их производные.

[0191] Векторы экспрессии по данному описанию могут включать полинуклеотиды, кодирующие антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанное в данном документе. В одном из аспектов кодирующие последовательности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента функционально связаны с последовательностью контроля экспрессии. В контексте данного документа две последовательности нуклеиновой кислоты функционально связаны, когда они ковалентно связаны таким образом, что каждая составляющая последовательность нуклеиновой кислоты сохраняет свою функциональность. Считается, что кодирующая последовательность и последовательность контроля экспрессии гена функционально связаны, если они ковалентно связаны таким образом, чтобы экспрессия или транскрипция и/или трансляция кодирующей последовательности попадает под влияние или контроль последовательности контроля экспрессии гена. Считается, что две последовательности ДНК функционально связаны, если индукция промотора в 5'-последовательности экспрессии гена приводит к транскрипции кодирующей последовательности и если природа связи между двумя последовательностями ДНК не (1) приводит к введению мутации со сдвигом рамки считывания, (2) препятствует способности промоторной области управлять транскрипцией кодирующей последовательности, или (3) мешает способности соответствующего транскрипта РНК транслироваться в белок. Таким образом, последовательность экспрессии гена была бы функционально связана с кодирующей последовательностью нуклеиновой кислоты, если бы последовательность экспрессии гена была способна влиять на транскрипцию этой кодирующей последовательности нуклеиновой кислоты, так что полученный транскрипт транслировался в желаемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

[0192] Вирусные векторы включают, помимо прочего, последовательности нуклеиновых кислот из следующих вирусов: ретровируса, такого как вирус мышинного лейкоза Молони, вирус саркомы мышей Харви, вирус опухоли молочной железы мышей и вирус саркомы Рауса; лентивирус; аденовирус; аденоассоциированный вирус; вирусы типа SV40; полиомавирусы; вирусы Эпштейна-Барра; вирусы папилломы; вирус герпеса; вирус коровьей оспы; вирус полиомиелита; и РНК-вирус, такой как ретровирус. Можно легко использовать другие векторы, хорошо известные в данной области техники. Некоторые вирусные векторы основаны на нецитопатических эукариотических вирусах, в которых несущественные гены были заменены на представляющий интерес геном. Нечитопатические вирусы включают ретровирусы, жизненный цикл которых включает обратную транскрипцию геномной вирусной РНК в ДНК с последующей интеграцией провирусов в клеточную ДНК хозяина. Ретровирусы были одобрены для испытаний генной терапии на людях. Наиболее подходящими являются те ретровирусы, которые являются дефектными по репликации (*m. e.*, способны управлять синтезом желаемых белков, но неспособны продуцировать инфекционные частицы). Такие генетически измененные ретровирусные экспрессионные векторы имеют

общее применение для высокоэффективной трансдукции генов *in vivo*. Стандартные протоколы получения ретровирусов с дефектом репликации (включая этапы включения экзогенного генетического материала в плазмиду, трансфекцию линии клеток с дефектом упаковки плазмидой, получение рекомбинантных ретровирусов линией клеток с дефектом упаковки, сбор вирусных частиц из среды культивирования тканей, и инфицирование клеток-мишеней вирусными частицами) представлены в Kriegler, M., Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, W.H. Freeman Co., New York (1990) and Murry, E. J., Methods in Molecular Biology, Vol. 7, Humana Press, Inc., Clifton, N.J. (1991).

[0193] В одном аспекте вирус представляет собой аденоассоциированный вирус, вирус с двухцепочечной ДНК. Аденоассоциированный вирус может быть сконструирован таким образом, чтобы он был дефектным по репликации и способен инфицировать широкий спектр типов и видов клеток. Кроме того, он имеет такие преимущества, как устойчивость к нагреванию и липидному растворителю; высокие частоты трансдукции в клетках различных линий, включая гемопоэтические клетки; и отсутствие подавления суперинфекции, что позволяет проводить множественные серии трансдукций. Как сообщается, аденоассоциированный вирус может интегрироваться в клеточную ДНК человека сайт-специфическим образом, тем самым сводя к минимуму возможность инсерционного мутагенеза и вариабельность экспрессии встроенного гена, характерной для ретровирусной инфекции. Кроме того, аденоассоциированные вирусные инфекции дикого типа наблюдались в культуре тканей на протяжении более 100 пассажей в отсутствие давления отбора, что означает, что геномная интеграция аденоассоциированного вируса является относительно стабильным событием. Аденоассоциированный вирус также может функционировать внехромосомным образом.

[0194] В других аспектах вектор получен из лентивируса. В некоторых аспектах вектор представляет собой вектор рекомбинантного лентивируса, способного инфицировать неделящиеся клетки.

[0195] Геном лентивируса и провирусная ДНК обычно содержат три гена, обнаруженные в ретровирусах: gag, pol и env, которые фланкированы двумя последовательностями с длинными концевыми повторами (LTR). Ген gag кодирует внутренние структурные (матрикс, капсид и нуклеокапсид) белки; ген pol кодирует РНК-направленную ДНК-полимеразу (обратную транскриптазу), протеазу и интегразу; а ген env кодирует гликопротеины вирусной оболочки. 5' и 3' LTR служат для стимуляции транскрипции и полиаденилирования РНК вириона. LTR содержит все другие цис-действующие последовательности, необходимые для репликации вируса. Лентивирусы имеют дополнительные гены, включая vif, vpr, tat, rev, vpu, nef и vpx (в HIV-1, HIV-2 и/или SIV).

[0196] Рядом с 5' LTR находятся последовательности, необходимые для обратной транскрипции генома (сайт связывания праймера тРНК) и для эффективного инкапсулирования вирусной РНК в частицы (сайт Psi). Если последовательности, необходимые для инкапсулирования (или упаковки ретровирусной РНК в инфекционные вирионы), отсутствуют в вирусном геноме, цис-дефект предотвращает инкапсулирование геномной РНК.

[0197] Однако полученный мутант остается способным управлять синтезом всех белков вириона. В описании предложен способ получения рекомбинантного лентивируса, способного инфицировать неделящуюся клетку, включающий трансфекцию подходящей клетки-хозяина двумя или более векторами, несущими гены, которые кодируют функции упаковки, а именно gag, pol и env, а также rev и tat. Как будет описано в данном документе ниже, векторы, лишенные функционального гена tat, желательны для определенных применений. Таким образом, например, первый вектор может обеспечивать нуклеиновую кислоту, кодирующую вирусные гены gag и pol, а другой вектор может обеспечивать нуклеиновую кислоту, кодирующую вирусный ген env, для получения клетки с дефектом упаковки. Введение вектора,

обеспечивающего гетерологичный ген, обозначенный в данном документе как вектор для переноса, в эту клетку с дефектом упаковки дает клетку-продуцент, которая высвобождает инфекционные вирусные частицы, несущие интересующий чужеродный ген.

[0198] В соответствии с указанной выше конфигурацией векторов и чужеродных генов второй вектор может обеспечивать нуклеиновую кислоту, кодирующую ген вирусной оболочки (env). Ген env может быть получен практически из любого подходящего вируса, включая ретровирусы. В некоторых аспектах белок env представляет собой амфотропный белок оболочки, который обеспечивает трансдукцию клеток человека и других видов.

[0199] Примеры генов env, полученных из ретровирусов, включают, помимо прочего: вирус мышинного лейкоза Молони (MoMuLV или MMLV), вирус саркомы мышей Харви (HaMuSV или HSV), вирус опухоли молочной железы мышей (MuMTV или MMTV), вирус лейкоза гиббонов (GaLV или GALV), вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) и вирус саркомы Рауса (RSV). Также можно использовать другие гены env, такие как белок G вируса везикулярного стоматита (VSV) (VSV G), вирусов гепатита и гриппа.

[0200] Вектор, обеспечивающий последовательность вирусной нуклеиновой кислоты env, функционально связан с регуляторными последовательностями, описанными в другом месте в данном документе.

[0201] Примеры лентивирусных векторов описаны в WO9931251, W09712622, W09817815, W09817816 и WO9818934, которые полностью включены в данный документ посредством ссылки.

[0202] Другие векторы включают плазмидные векторы. Плазмидные векторы подробно описаны в данной области техники и хорошо известны специалистам в данной области техники. См., например, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. В последние несколько лет было обнаружено, что плазмидные векторы особенно выгодны для доставки генов в клетки *in vivo* из-за их неспособности реплицироваться и интегрироваться в геном хозяина. Эти плазмиды, однако, имеющие промотор, совместимый с клеткой-хозяином, могут экспрессировать пептид из гена, функционально кодируемого в плазмиде. Некоторые широко используемые плазмиды, доступные от коммерческих поставщиков, включают pBR322, pUC18, pUC19, различные плазмиды pcDNA, pRC / CMV, различные плазмиды pCMV, pSV40 и pBlueScript. Дополнительные примеры конкретных плазмид включают pcDNA3.1, номер по каталогу V79020; pcDNA3.1/hygro, номер по каталогу V87020; pcDNA4/myc-His, номер по каталогу V86320; и pBudCE4.1, номер по каталогу V53220, все от Invitrogen (Карлсбад, Калифорния). Другие плазмиды хорошо известны специалистам в данной области техники. Кроме того, плазмиды могут быть специально созданы с использованием стандартных методов молекулярной биологии для удаления и/или добавления определенных фрагментов ДНК.

V. Получение антител

[0203] Антитела или их фрагменты, которые иммуноспецифически связываются с LICAM (например, с LICAM человека), могут быть получены любым способом, известным в данной области техники для синтеза антител, например, химическим синтезом или методами рекомбинантной экспрессии. В описанных в данном документе способах используются, если не указано иное, обычные методы молекулярной биологии, микробиологии, генетического анализа, рекомбинантной ДНК, органической химии, биохимии, ПЦР, синтеза и модификации олигонуклеотидов, гибридизации нуклеиновых кислот и смежных областей, которые известны специалистам в данной области техники. Эти методы описаны, например, в ссылках, цитируемых в данном документе, и полностью объяснены в литературе. См., например, Maniatis T *et al.*, (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J *et al.*, (1989), *Molecular Cloning:*

A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J *et al.*, (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel FM *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987 and annual updates); Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (1987 and annual updates) Gait (ed.) (1984) Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press; Eckstein (ed.) (1991) Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, IRL Press; Birren B *et al.*, (eds.) (1999) Genome Analysis: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

[0204] В конкретном аспекте описанное в данном документе антитело представляет собой антитело (*например*, моноклональное антитело), полученное, экспрессируемое, созданное или выделенное любым способом, который включает создание, *например*, с помощью синтеза, генной инженерии последовательностей ДНК. В некоторых аспектах такое антитело содержит последовательности (*например*, последовательности ДНК или аминокислотные последовательности), которые в природе не существуют в репертуаре антител зародышевой линии животного или млекопитающего (*например*, человека) *in vivo*.

[0205] В некотором аспекте в данном документе предложен способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое иммуноспецифически связывается с L1CAM (*например*, L1CAM человека), включающий культивирование клетки или клетки-хозяина, описанных в данном документе. В некотором аспекте в данном документе предложен способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое иммуноспецифически связывается с L1CAM (*например*, L1CAM человека), включающий экспрессию (*например*, рекомбинантную экспрессию) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с использованием клетки или клетки-хозяина, описанной в данном документе (*например*, клетки или клетки-хозяина, содержащей полинуклеотиды, кодирующие описанное в данном документе антитело). В конкретном аспекте клетка представляет собой изолированную клетку. В конкретном аспекте экзогенные полинуклеотиды были введены в клетку. В конкретном аспекте способ дополнительно включает стадию очистки антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, полученного из клетки или клетки-хозяина.

[0206] Способы получения поликлональных антител известны в данной области техники (*см.*, например, главу 11 в: Short Protocols in Molecular Biology, (2002) 5th Ed., Ausubel FM *et al.*, eds., John Wiley and Sons, New York).

[0207] Моноклональные антитела могут быть получены с использованием широкого спектра методов, известных в данной области техники, включая использование гибридомной, рекомбинантной технологий и технологии фагового дисплея или их комбинации. Например, моноклональные антитела можно получить с использованием гибридомных методов, включая методы, известные в данной области техники и описанные, например, в Harlow E & Lane D, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2-е изд. 1988); Hammerling GJ *et al.*, in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563 681 (Elsevier, N.Y., 1981). Используемый в данном документе термин «моноклональное антитело» не ограничивается антителами, полученными с помощью гибридомной технологии. Например, моноклональные антитела могут быть получены рекомбинантно из клеток-хозяев, экзогенно экспрессирующих описанное в данном документе антитело или его фрагмент, например легкую и/или тяжелую цепь такого антитела.

[0208] В конкретных аспектах в контексте данного документа «моноклональное антитело» представляет собой антитело, вырабатываемое одной клеткой (*например*, гибридомой или клеткой-хозяином, продуцирующей рекомбинантное антитело), причем антитело иммуноспецифически связывается с L1CAM (*например*, с L1CAM человека), согласно определению, *например*, методом ИФА или другого анализа связывания антигенов или конкурентного связывания, известного в данной области техники или в приведенных в данном документе примерах. В конкретных аспектах моноклональное антитело может

представлять собой химерное антитело или гуманизированное антитело. В некоторых аспектах моноклональное антитело представляет собой моновалентное антитело или поливалентное (*например*, бивалентное) антитело. В конкретных аспектах моноклональное антитело представляет собой моноспецифическое или мультиспецифическое антитело (*например*, биспецифическое антитело). Описанные в данном документе моноклональные антитела могут быть, *например*, получены гибридным методом, как описано в Kohler G & Milstein C (1975) *Nature* 256: 495, или могут быть выделены, *например*, из фаговых библиотек, *например*, с использованием описанных в данном документе методик. Другие способы получения клональных клеточных линий и экспрессируемых ими моноклональных антител хорошо известны в данной области техники (*см.*, *например*, главу 11 в: Short Protocols in Molecular Biology, (2002) 5th Ed., Ausubel FM *et al.*, *supra*).

[0209] Способы получения и скрининга специфических антител с использованием гибридной технологии являются стандартными и хорошо известны в данной области техники. *Например*, в гибридном методе мышь или другое подходящее животное-хозяин, такое как овца, коза, кролик, крыса, хомяк или макака, иммунизируют, чтобы вызвать образование лимфоцитов, продуцирующих или способных продуцировать антитела, которые специфически связываются с белком (*например*, L1CAM человека), используемым для иммунизации. В альтернативном варианте лимфоциты можно иммунизировать *in vitro*. Лимфоциты затем сливают с клетками миеломы, используя подходящий агент для слияния, такой как полиэтиленгликоль, и получают гибридные клетки (Goding JW (Ed), *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)). Кроме того, для иммунизации животного может быть использован метод RIMMS (многократная повторная иммунизация) (Kilpatrick KE *et al.*, (1997) *Hybridoma* 16:381-9, полностью включено посредством ссылки).

[0210] В некоторых аспектах мышей (или других животных, таких как куры, крысы, обезьяны, ослы, свиньи, овцы, хомяки или собаки) можно иммунизировать антигеном (*например*, L1CAM, таким как L1CAM человека), и как только возникает иммунный ответ, *например*, антитела, специфичные к антигену, обнаруживаются в сыворотке мыши, селезенка мыши собирается и выделяются спленоциты. Затем спленоциты сливают с помощью хорошо известных методов с любыми подходящими клетками миеломы, *например* клетками из линии клеток SP20, доступной из Американской коллекции типовых культур (ATCC) (Манассас, Вирджиния), с образованием гибридом. Гибридомы отбираются и клонируются путем ограниченного разведения. В некоторых аспектах лимфатические узлы иммунизированных мышей собирают и сливают с клетками миеломы NSO.

[0211] Полученные таким образом гибридные клетки высевают и выращивают в подходящей культуральной среде, которая, предпочтительно содержит одно или более веществ, которые ингибируют рост или выживание неслитых, родительских клеток миеломы. *Например*, если родительские клетки миеломы не содержат фермент гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазу (HGPRT или HPRT), культуральная среда для гибридом, как правило, содержит гипоксантин, аминоптерин и тимидин (среда HAT), которые предотвращают рост HGPRT-дефицитных клеток.

[0212] В конкретных аспектах используются клетки миеломы, которые способны к эффективному слиянию, сохраняют стабильный высокий уровень продукции антител выбранными антитело-продуцирующими клетками и являются чувствительными к такой среде, как HAT. Среди этих линий миеломных клеток есть линии клеток мышинной миеломы, такие как линия клеток NSO или линии, полученные из опухолей мышей MOPC-21 и MPC-11, доступные в Центре распределения клеток Института Солка, Сан-Диего, штат Калифорния, США и клетки SP-2 или X63-Ag8.653, доступны из Американской коллекции типовых культур,

Роквилл, штат Мэриленд, США. Линии клеток миеломы человека и гетеромиеломы мышей и человека также были описаны как пригодные для получения человеческих моноклональных антител (Kozbor D (1984) *J Immunol* 133: 3001-5; Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

[0213] Культуральную среду, в которой выращивают клетки гибридомы, анализируют в отношении выработки моноклональных антител, направленных против антигена L1CAM (*например*, L1CAM человека). Специфичность связывания моноклональных антител, продуцируемых гибридомными клетками, определяют с помощью способов известных в данной области техники, например, с помощью иммунопреципитации или анализа связывания *in vitro*, таким как радиоиммунологический анализ (RIA) или твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА).

[0214] После идентификации клеток гибридомы, гибридомных клеток, продуцирующих антитела с желательными специфичностью, аффинностью и/или активностью, клоны можно субклонировать методом серийных разведений и выращивать стандартными методами (Goding JW (Ed), *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, *supra*). Подходящие для этих целей культуральные среды включают, например среду D-MEM или RPMI 1640. Кроме того, гибридомные клетки можно выращивать *in vivo* в организме животного в виде асцитных опухолей.

[0215] Моноклональные антитела, секретируемые субклонами, удобно отделять от культуральной среды, асцитной жидкости или сыворотки с помощью традиционных процедур очистки иммуноглобулинов, таких как, например, хроматография с применением белка А-сефарозы, хроматография с гидроксипатитом, гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография.

[0216] Описанные в данном документе антитела включают фрагменты антител, которые специфически распознают L1CAM (*например*, L1CAM человека), и могут быть получены любым методом, известным специалистам в данной области техники. Например, описанные в данном документе фрагменты Fab и F(ab')₂ могут быть получены путем протеолитического расщепления молекул иммуноглобулина с использованием таких ферментов, как папаин (для получения фрагментов Fab) или пепсин (для получения фрагментов F(ab')₂). Фрагмент Fab соответствует одному из двух идентичных плеч молекулы антитела и содержит полную легкую цепь, спаренную с доменами VH и CH1 тяжелой цепи. Фрагмент F(ab')₂ содержит два антигенсвязывающих плеча молекулы антитела, связанных дисульфидными связями в шарнирной области.

[0217] В одном аспекте для создания полных антител праймеры ПЦР, включая нуклеотидные последовательности VH или VL, сайт рестрикции и фланкирующую последовательность для защиты сайта рестрикции, могут использоваться для амплификации последовательностей VH или VL из матрицы, *например*, клонов scFv. Используя методы клонирования, известные специалистам в данной области техники, амплифицированные с помощью ПЦР домены VH можно клонировать в векторы, экспрессирующие константную область VH, а амплифицированные с помощью ПЦР домены VL можно клонировать в векторы, экспрессирующие константную область VL, *например*, константную область человека каппа- или лямбда-типа. Домены VH и VL также можно клонировать в один вектор, экспрессирующий необходимые константные области. Затем векторы конверсии тяжелой и легкой цепей котрансфицируют в линии клеток для получения стабильных или временных линий клеток, которые экспрессируют полноразмерные антитела, *например*, IgG, с использованием методов, известных специалистам в данной области техники.

[0218] Химерное антитело представляет собой молекулу, в которой разные фрагменты антитела происходят из разных молекул иммуноглобулинов. Например, химерное антитело может содержать переменную область моноклонального антитела животного, не являющегося человеком (*например*, мыши, крысы или

курицы), слитую с константной областью человеческого антитела. Способы получения химерных антител известны в данной области техники. См., например, Morrison SL (1985) *Science* 229: 1202-7; Oi VT & Morrison SL (1986) *BioTechniques* 4: 214- 221; Gillies SD *et al.*, (1989) *J Immunol Methods* 125: 191-202; и патенты США № 5807715, 4816567, 4816397 и 6331415.

[0219] Гуманизированное антитело способно связываться с заранее определенным антигеном и включает каркасную область, имеющую по существу аминокислотную последовательность человеческого иммуноглобулина и CDR, имеющие по существу аминокислотную последовательность нечеловеческого иммуноглобулина (например, иммуноглобулина мыши или курицы). В конкретных аспектах гуманизированное антитело также содержит по меньшей мере фрагмент константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, иммуноглобулина человека. Антитело также может содержать область CH1, шарнирную область, области CH2, CH3 и CH4 тяжелой цепи. Гуманизированное антитело может быть выбрано из любого класса иммуноглобулинов, включая IgM, IgG, IgD, IgA и IgE, и любого изотипа, включая IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Гуманизированное антитело может быть получено с помощью различных методик, известных в данной области техники, включая, помимо прочего, CDR-прививки (Европейский патент № EP 239400; международная публикация № WO 91/09967; и патенты США № 5225539, 5530101, and 5585089), маскировку поверхностных остатков или изменение поверхности (Европейские патенты № EP 592106 и EP 519596; Padlan EA (1991) *Mol Immunol* 28(4/5): 489-498; Studnicka GM *et al.*, (1994) *Prot Engineering* 7(6): 805-814; and Roguska MA *et al.*, (1994) *PNAS* 91: 969-973), перестановку цепей (патент США № 5565332), а также методики, описанные в, например, патенте США № 6407213, патенте США № 5766886, международной публикации № WO 93/17105; Tan P *et al.*, (2002) *J Immunol* 169: 1119-25; Caldas C *et al.*, (2000) *Protein Eng.* 13(5): 353-60; Morea V *et al.*, (2000) *Methods* 20(3): 267- 79; Baca M *et al.*, (1997) *J Biol Chem* 272(16): 10678-84; Roguska MA *et al.*, (1996) *Protein Eng* 9(10): 895 904; Couto JR *et al.*, (1995) *Cancer Res.* 55 (23 Supp): 5973s-5977s; Couto JR *et al.*, (1995) *Cancer Res* 55(8): 1717-22; Sandhu JS (1994) *Gene* 150(2): 409-10 и Pedersen JT *et al.*, (1994) *J Mol Biol* 235(3): 959-73. См. также публикацию заявки США № US 2005/0042664 A1 (24 февраля 2005 г.), которая полностью включена в описание данного изобретения сведений путем ссылки.

[0220] Были описаны способы получения мультиспецифических (например, биспецифических антител). См., например, патенты США № 7951917; 7183076; 8227577; 5837242; 5989830; 5869620; 6132992 и 8586713.

[0221] Однодоменные антитела, например, антитела, в которых отсутствует легкая цепь, можно получить способами, хорошо известными в данной области техники. См. Riechmann L & Muyldermans S (1999) *J Immunol* 231:25-38; Nuttall SD *et al.*, (2000) *Curr Pharm Biotechnol* 1(3):253-263; Muyldermans S, (2001) *J Biotechnol* 74(4):277-302; патент США № 6005079; и международные публикации № WO 94/04678, WO 94/25591 и WO 01/44301.

[0222] Кроме того, антитела, которые иммуноспецифически связываются с антигеном L1CAM, могут, в свою очередь, использоваться для создания антиидиотипических антител, которые «имитируют» антиген, с использованием методов, хорошо известных специалистам в данной области техники. (См., например, Greenspan NS & Bona CA (1989) *FASEB J* 7(5): 437-444; и Nissinoff A (1991) *J Immunol* 147(8): 2429-2438).

[0223] В конкретных аспектах описанное в данном документе антитело, которое связывается с тем же эпитопом L1CAM (например, L1CAM человека), что и описанное в данном документе антитело к L1CAM, представляет собой человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В конкретных аспектах описанное в данном документе антитело, которое конкурентно блокирует (например, дозозависимым образом) описанные в данном документе антитела (например, Ab612, Ab4H5, Ab2C2, Ab4H6 и Ab5D12) от

связывания с LICAM (*например*, LICAM человека), представляет собой человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

[0224] Человеческие антитела могут быть получены с использованием способов, известных в данной области техники. Например, можно использовать трансгенных мышей, которые не способны экспрессировать функциональные эндогенные иммуноглобулины, но которые могут экспрессировать гены иммуноглобулинов человека. В частности, генные комплексы тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов человека можно вводить случайным образом или путем гомологичной рекомбинации в эмбриональные стволовые клетки мыши. Альтернативно переменная область, константная область и область разнообразия человека могут быть введены в эмбриональные стволовые клетки мыши в дополнение к генам тяжелой и легкой цепи человека. Гены тяжелой и легкой цепей иммуноглобулинов мыши можно сделать нефункциональными по отдельности или одновременно введением локусов иммуноглобулина человека путем гомологичной рекомбинации. В частности, гомозиготная делеция области JH предотвращает продукцию эндогенных антител. Для получения химерных мышей модифицированные эмбриональные стволовые клетки размножают и микроинъектируют в бластоцисты. Затем химерных мышей разводят для получения гомозиготного потомства, которое экспрессирует человеческие антитела. Трансгенных мышей иммунизируют обычным способом выбранным антигеном, *например*, всем антигеном или его фрагментом (*например*, LICAM). Моноклональные антитела, направленные против антигена, могут быть получены от иммунизированных трансгенных мышей с использованием общепринятой гибридомной технологии. Трансгены человеческого иммуноглобулина, содержащиеся в трансгенных мышках, перестраиваются во время дифференцировки В-клеток, а затем подвергаются переключению классов и соматическим мутациям. Таким образом, используя такой метод, можно получить терапевтически полезные антитела IgG, IgA, IgM и IgE. Для обзора этой технологии продукции человеческих антител, *см.* Lonberg N & Huszar D (1995) *Int Rev Immunol* 13:65-93. Для подробного обсуждения этой технологии продукции антител и моноклональных антител человека и протоколов получения таких антител, *см.*, *например*, международные публикации № WO 98/24893, WO 96/34096 и WO 96/33735; и патенты США № 5413923, 5625126, 5633425, 5569825, 5661016, 5545806, 5814318 и 5939598. Примеры мышей, способных продуцировать человеческие антитела, включают XENOMOUSE™ (Abgenix, Inc.; патент США № 6075181 и 6150184), HUAB-MOUSE™ (Medarex, Inc./Gen Pharm; патент США № 5545806 и 5569825), TRANS CHROMO MOUSE™ (Kirin) и KM MOUSE™ (Medarex/Kirin).

[0225] Человеческие антитела, которые специфически связываются с LICAM (*например*, LICAM человека), могут быть получены различными способами, известными в данной области техники, включая способы фагового дисплея, описанные выше, с использованием библиотек антител, полученных из последовательностей иммуноглобулина человека. *См. также* патенты США № 4444887, 4716111, и 5885793; и международные публикации № WO 98/46645; WO 98/50433; WO 98/24893; WO 98/16654; WO 96/34096; WO 96/33735; и WO 91/10741.

[0226] В некоторых аспектах антитела человека могут быть получены с использованием гибридом мыши и человека. Например, лимфоциты периферической крови человека, трансформированные вирусом Эпштейна-Барра (EBV), могут быть слиты с клетками миеломы мыши для получения гибридом мыши и человека, секретирующих человеческие моноклональные антитела, и эти гибридомы мыши и человека могут быть подвергнуты скринингу для определения тех, которые секретируют моноклональные антитела человека, которые иммуноспецифически связываются с антигеном-мишенью (*например*, LICAM, такой как LICAM человека)). Такие способы известны и описаны в данной области техники, *см.*, *например*, Shinmoto H *et al.*, (2004) *Cytotechnology* 46: 19-23; Naganawa Y *et al.*, (2005) *Human Antibodies* 14: 27-31.

VI. Клетки и векторы

[0227] В некоторых аспектах в данном документе предложены клетки (*например*, клетки-хозяева), экспрессирующие (*например*, рекомбинантно) антитела, описанные в данном документе (или их антигенсвязывающие фрагменты), которые специфически связываются с L1CAM (*например*, L1CAM человека) и родственными полинуклеотидами и векторами экспрессии. В данном документе предложено векторы (*например*, векторы экспрессии), содержащие полинуклеотиды, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие антитела к L1CAM или фрагмент для рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах, *например*, в клетках млекопитающих. В данном документе также предложено клетки-хозяева, содержащие такие векторы для рекомбинантной экспрессии антител к L1CAM, описанных в данном документе (*например*, человеческое или гуманизованное антитело). В конкретном аспекте в данном документе предложены способы получения описанного в данном документе антитела, включающие экспрессию такого антитела из клетки-хозяина.

[0228] Рекомбинантная экспрессия антитела, описанного в данном документе (*например*, полноразмерного антитела, тяжелой и/или легкой цепи антитела, или одноцепочечного антитела, описанного в данном документе), которое специфически связывается с L1CAM (*например*, L1CAM человека), включает конструирование вектора экспрессии, содержащего полинуклеотид, кодирующий антитело. После получения полинуклеотида, кодирующего молекулу антитела, тяжелую и/или легкую цепь антитела или его фрагмент (*например*, переменные домены тяжелой и/или легкой цепи), описанные в данном документе, вектор для продукции молекулы антитела может быть получен с помощью технологии рекомбинантной ДНК с использованием методов, хорошо известных в данной области техники. Таким образом, здесь описаны способы получения белка путем экспрессии полинуклеотида, содержащего нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело или фрагмент антитела (*например*, легкую или тяжелую цепь). Способы, которые хорошо известны специалистам в данной области техники, могут быть использованы для конструирования векторов экспрессии, содержащих кодирующие последовательности антитела или фрагмент антитела (*например*, легкой или тяжелой цепи) и соответствующие транскрипционные и трансляционные контрольные сигналы. Эти методы включают, например, методы рекомбинантной ДНК *in vitro*, методы синтеза и методы генетической рекомбинации *in vivo*. Также предложены реплицируемые векторы, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу антитела, описанную в данном документе, тяжелую или легкую цепь антитела, переменный домен тяжелой или легкой цепи антитела или его фрагмента, или CDR тяжелой или легкой цепи, функционально связанные с промотором. Такие векторы могут, например, включать нуклеотидную последовательность, кодирующую константную область молекулы антитела (*см.*, *например*, международные публикации № WO 86/05807 и WO 89/01036; и патент США № 5122464), и переменные домены антитела может быть клонирована в такой вектор для экспрессии всей тяжелой цепи, всей легкой цепи или всей тяжелой и легкой цепей.

[0229] Вектор экспрессии может быть перенесен в клетку (*например*, клетку-хозяина) обычными методами, и полученные клетки могут быть затем культивированы обычными методами для получения антитела, описанного в данном документе (*например*, антитела, содержащего VH и/или VL, или одно или более VH и/или VL CDR Ab612, Ab4H5, Ab2C2, Ab4H6 и Ab5D12) или их фрагментов. Таким образом, в настоящем документе предложены клетки-хозяева, содержащие полинуклеотид, кодирующий антитело, описанное в данном документе, или его фрагменты, или его тяжелую или легкую цепь, или его фрагмент, или одноцепочечное антитело, описанное в данном документе, функционально связанный с промотором для экспрессии таких последовательностей в клетке-хозяине. В некоторых аспектах для экспрессии

двухцепочечных антител векторы, кодирующие как тяжелую, так и легкую цепи по отдельности, могут совместно экспрессироваться в клетке-хозяине для экспрессии всей молекулы иммуноглобулина, как подробно описано ниже. В некоторых аспектах клетка-хозяин содержит вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий как тяжелую, так и легкую цепи антитела, описанного в данном документе, или его фрагмент. В конкретных аспектах клетка-хозяин содержит два разных вектора, первый вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь или переменную область тяжелой цепи антитела, описанного в данном документе, или его фрагмент, и второй вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь или переменную область легкой цепи антитела, описанного в данном документе, или его фрагмент. В других аспектах первая клетка-хозяин содержит первый вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь или переменную область тяжелой цепи антитела, описанного в данном документе, или его фрагмент, а вторая клетка-хозяин содержит второй вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь или переменную область легкой цепи антитела, описанного в данном документе, или его фрагмент. В конкретных аспектах, тяжелая цепь/переменная область тяжелой цепи, экспрессируемая первой клеткой, ассоциирована с легкой цепью/переменной областью легкой цепи второй клетки с образованием антитела к L1CAM, описанного в данном документе, или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых аспектах в данном документе предложена популяция клеток-хозяев, включающая такую первую и такую вторую клетку-хозяин.

[0230] В конкретном аспекте в данном документе предложена популяция векторов, включающая первый вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь/переменную область легкой цепи антитела к L1CAM, описанного в данном документе, и второй вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь/ переменную область тяжелой цепи антитела к L1CAM, описанного в данном документе.

[0231] Для экспрессии описанных в данном документе молекул антитела, можно использовать множество векторных систем экспрессии хозяина. Такие системы экспрессии хозяина представляют собой носители, с помощью которых могут быть получены и впоследствии очищены представляющие интерес кодирующие последовательности, а также представляют собой клетки, которые при трансформации или трансфекции соответствующими нуклеотидными кодирующими последовательностями могут экспрессировать описанную в данном документе молекулу антитела *in situ*. Они включают, но не ограничиваются ими, микроорганизмы, такие как бактерии (*например, E. coli* и *B. subtilis*), трансформированные экспрессирующими векторами на основе рекомбинантной ДНК бактериофага, плазмидной ДНК или космидной ДНК, содержащими кодирующие последовательности антитела; дрожжи (*например, Saccharomyces Pichia*), трансформированные рекомбинантными векторами экспрессии дрожжей, содержащими кодирующие последовательности антитела; системы клеток насекомых, инфицированные векторами экспрессии рекомбинантного вируса (*например, бакуловируса*), содержащими кодирующие последовательности антител; системы растительных клеток (*например, зеленые водоросли, такие как Chlamydomonas reinhardtii*), инфицированные векторами экспрессии рекомбинантного вируса (*например, вирусом мозаики цветной капусты, CaMV; вирусом табачной мозаики, TMV*) или трансформированные векторами экспрессии рекомбинантных плазмид (*например, Ti-плазмидой*), содержащими кодирующие последовательности антитела; или клеточные системы млекопитающих (*например, COS (например, COS1 или COS), CHO, BHK, MDCK, HEK 293, NSO, PER.C6, VERO, CRL7030, HsS78Bst, HeLa, NIH 3T3, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSC1, BSC40, YB/20, SP2/0, Sf9, лимфобластная клеточная линия человека, NS0, клетки меланомы, клетки HT-1080, PERC.6 и BMT10*), несущие рекомбинантные экспрессионные конструкции, содержащие промоторы, полученные из генома клеток млекопитающих (*например, промотор металлотинонеина*) или из вирусов млекопитающих

(например, поздний промотор аденовируса; 7,5K промотор вируса коровьей оспы). В конкретном аспекте клетки для экспрессии антител или их антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе, представляют собой клетки CHO, например клетки CHO GS SYSTEM™ (Lonza). В конкретном аспекте клетки для экспрессии описанных в данном документе антител представляют собой клетки человека, например, линии клеток человека. В конкретном аспекте вектор экспрессии млекопитающих представляет собой POPTIVEC™ или pcDNA3.3. В конкретном аспекте бактериальные клетки, такие как *Escherichia coli*, или эукариотические клетки (например, клетки млекопитающих), особенно для экспрессии всей молекулы рекомбинантного антитела, используются для экспрессии молекулы рекомбинантного антитела. Например, клетки млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомячка (CHO), в сочетании с вектором, таким как основной промежуточный элемент раннего промотора гена из цитомегаловируса человека, представляют собой эффективную систему экспрессии антител (Foecking MK & Hofstetter H (1986) *Gene* 45: 101-5 и Cockett M et al., (1990) *Biotechnology* 8(7): 662-7). В некоторых аспектах описанные в данном документе антитела продуцируются клетками CHO или клетками NSO. В конкретном аспекте экспрессия нуклеотидных последовательностей, кодирующих описанные в данном документе антитела, которые иммуноспецифически связывают L1CAM (например, L1CAM человека), регулируется конститутивным, индуцибельным или тканеспецифическим промотором.

[0232] В бактериальных системах число экспрессирующих векторов может быть преимущественно выбрано в зависимости от предполагаемого использования экспрессируемой молекулы антитела. Например, когда должно быть произведено большое количество такого антитела для получения фармацевтических композиций молекул антитела, может быть желательно использовать векторы, которые управляют экспрессией высоких уровней слитых белковых продуктов, которые легко очищаются. Такие векторы включают, но не ограничиваются ими, вектор экспрессии *E. coli* pUR278 (Ruether U & Mueller-Hill B (1983) *EMBO J* 2: 1791-1794), в котором кодирующая последовательность антитела может быть лигирована отдельно в вектор в рамке с кодирующей областью *lac Z*, так что продуцируется слитый белок; векторы pIN (Inouye S & Inouye M (1985) *Nuc Acids Res* 13: 3101-3109; Van Heeke G & Schuster SM (1989) *J Biol Chem* 24: 5503-5509); и тому подобное. Например, векторы pGEX также можно использовать для экспрессии чужеродных полипептидов в виде слитых белков с глутатион-5-трансферазой (GST). В целом, такие слитые белки являются растворимыми и могут быть легко очищены из лизируемых клеток посредством абсорбции и связывания с матричными глутатион-агарозными гранулами и затем элюированы в присутствии свободного глутатиона. Векторы pGEX разработаны для включения сайтов расщепления тромбином и протеазой фактора Ха, так чтобы клонируемый продукт целевого гена мог быть высвобожден из GST-группировки.

[0233] В системе насекомых можно использовать вирус ядерного полиэдроза *Autographa californica* (AcNPV), например, в качестве вектора, экспрессирующего чужеродные гены. Вирус выращивают в клетках *Spodoptera frugiperda*. Кодирующие последовательности антитела можно клонировать отдельно в несущественные области (например, ген полиэдрина) вируса и помещать под контроль промотора AcNPV (например, промотора полиэдрина).

[0234] В клетках-хозяевах млекопитающих можно использовать ряд систем, основанных на вирусной экспрессии. В случае использования аденовируса в качестве экспрессирующего вектора, интересующую кодирующую последовательность антитела можно лигировать с аденовирусным транскрипционным/трансляционным контролирующим комплексом, например, поздним промотором и тройной лидерной последовательностью. Затем этот химерный ген можно встроить в геном аденовируса путем рекомбинации *in vitro* или *in vivo*. Вставка в несущественную область вирусного генома (например,

область E1 или E3) приводит к получению рекомбинантного вируса, который является жизнеспособным и способен экспрессировать молекулу антитела в инфицированных хозяевах (*например, см. Logan J. & Shenk T. (1984) PNAS 81 (12): 3655-9*). Для эффективной трансляции встроенных кодирующих последовательностей антител также могут потребоваться специфические сигналы инициации. Эти сигналы включают иницирующий кодон ATG и соседние последовательности. Кроме того, иницирующий кодон должен находиться в фазе с рамкой считывания нужной кодирующей последовательности, чтобы обеспечить трансляцию всей вставки. Эти экзогенные трансляционные контролирующие сигналы и иницирующие кодоны могут быть различного происхождения, как природными, так и синтетическими. Эффективность экспрессии можно увеличить путем включения подходящих энхансерных элементов транскрипции, терминаторов транскрипции и т.д. (*см., например, Bitter G et al., (1987) Methods Enzymol. 153: 516-544*).

[0235] Кроме того, можно выбрать штамм клетки-хозяина, который модулирует экспрессию вставленных последовательностей или модифицирует и обрабатывает продукт гена желаемым специфическим образом. Такие модификации (*например, гликозилирование*) и процессинг (*например, расщепление*) белковых продуктов могут быть важными для функционирования белка. Различные клетки-хозяева обладают характерными и специфическими механизмами посттрансляционного процессинга и модификации белков и продуктов генов. Для обеспечения правильной модификации и процессинга экспрессируемого чужеродного белка можно выбрать подходящие клеточные линии или системы хозяев. С этой целью можно использовать эукариотические клетки-хозяева, которые обладают клеточным механизмом для правильного процессинга первичного транскрипта, гликозилирования и фосфорилирования продукта гена. Такие клетки-хозяева млекопитающих включают, но не ограничиваются ими, CHO, SKOV-3, B16-F1, NCI-H522, VERO, BHK, Hela, MDCK, HEK 293, NIH 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 и T47D, NSO (линия клеток миеломы мыши, которая не продуцирует эндогенно какие-либо цепи иммуноглобулинов), CRL7030, COS (*например, COS 1 или COS*), PER.C6, VERO, HsS78Bst, HEK-293T, HepG2, SP210, RI. 1, B-W, L-M, BSC1, BSC40, YB / 20, BMT10 и HsS78Bst клетки. В некоторых аспектах описанные в данном документе антитела к L1CAM продуцируются в клетках млекопитающих, таких как клетки CHO.

[0236] В конкретном аспекте описанные в данном документе антитела или их антигенсвязывающие фрагменты имеют пониженное содержание фукозы или не содержат фукозы. Такие антитела можно получить с использованием методик, известных специалистам в данной области техники. Например, антитела могут экспрессироваться в клетках, дефицитных или лишенных способности к фукозилрованию. В конкретном примере клеточные линии с нокаутом обоих аллелей 1,6-фукозилтрансферазы можно использовать для получения антител или их антигенсвязывающих фрагментов с пониженным содержанием фукозы. Система POTELLIGENT® (Lonza) является примером такой системы, которую можно использовать для получения антител или их антигенсвязывающих фрагментов с пониженным содержанием фукозы.

[0237] Для длительного производства с высоким выходом рекомбинантных белков могут быть созданы стабильные экспрессирующие клетки. Например, могут быть сконструированы клеточные линии, которые стабильно экспрессируют описанное в данном документе антитело к L1CAM и его антигенсвязывающий фрагмент. В конкретных аспектах клетка, предложена в данном документе, стабильно экспрессирует легкую цепь/вариабельный домен легкой цепи и тяжелую цепь/вариабельный домен тяжелой цепи, которые связываются с образованием антитела, описанного в данном документе, или его антигенсвязывающего фрагмента.

[0238] В некоторых аспектах вместо того чтобы использовать векторы экспрессии, которые содержат вирусные сайты инициации репликации, клетки-хозяева могут быть трансформированы ДНК под контролем

соответствующих контрольных элементов экспрессии (*например*, промотор, энхансер, последовательности, терминаторы транскрипции, сайты полиаденилирования и т.д.), и селективного маркера. После введения чужеродной ДНК/полинуклеотида, сконструированные клетки могут расти в течение 1-2 суток в обогащенной среде с последующим переносом на селективную среду. Селектируемый маркер в рекомбинантной плазмиде придает устойчивость к селекции и позволяет клеткам стабильно интегрировать плазмиду в свои хромосомы и расти с образованием очагов, которые в свою очередь можно клонировать и увеличивать до клеточных линий. Этот метод можно успешно использовать для конструирования клеточных линий, которые экспрессируют антитело к L1CAM, описанное в данном документе, или его связывающий фрагмент. Такие сконструированные клеточные линии могут быть особенно полезны для скрининга и оценки композиций, которые прямо или опосредованно взаимодействуют с молекулой антитела.

[0239] Можно использовать селективных систем, включая, помимо прочего, использование генов тимидинкиназы вируса простого герпеса (Wigler M. *et al.*, (1977) *Cell* 11 (1): 223-32), гипоксантинегуанинфосфорибозилтрансферазы (Szybalska EH & Szybalski W. (1962) *PNAS* 48 (12): 2026-2034) и аденинфосфорибозилтрансферазы (Lowy I *et al.*, (1980) *Cell* 22 (3): 817-23) в клетках tk-, hprt- или aprt-соответственно. Кроме того, устойчивость к антиметаболитам можно использовать как основу для селекции следующих генов: dhfr, который придает устойчивость к метотрексату (Wigler M *et al.*, (1980) *PNAS* 77(6): 3567-70; O'Hare K *et al.*, (1981) *PNAS* 78: 1527-31); gpt, который придает устойчивость к микофеноловой кислоте (Mulligan RC & Berg P (1981) *PNAS* 78(4): 2072-6); neo, который придает устойчивость к аминогликозиду G-418 (Wu GY & Wu CH (1991) *Biotherapy* 3: 87-95; Tolstoshev P (1993) *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 32: 573-596; Mulligan RC (1993) *Science* 260: 926-932; and Morgan RA & Anderson WF (1993) *Ann Rev Biochem* 62: 191-217; Nabel GJ & Feigner PL (1993) *Trends Biotechnol* 11(5): 211-5); и hygro, который придает устойчивость к гигромицину (Santerre RF *et al.*, (1984) *Gene* 30(1-3): 147-56). Способы, широко известные в области методов рекомбинантной ДНК, могут применяться рутинно для селекции желаемого рекомбинантного клона, и такие способы описаны, например, в Ausubel FM *et al.*, (Eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler M, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990); и в главах 12 и 13 Dracopoli NC *et al.* (ред.), *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY (1994); Colbere-Garapin F *et al.*, (1981) *J Mol Biol* 150: 1-14, которые полностью включены в данный документ посредством ссылки.

[0240] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно данному изобретению может экспрессироваться на иммунной клетке, например, Т-клетке и/или NK-клетке. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может быть экспрессирован как химерный антигенный рецептор (CAR). CAR-Т-клетка - это Т-клетка, которая экспрессирует химерный антигенный рецептор. В контексте данного документа термин «химерный антигенный рецептор (CAR)» относится к рекомбинантному слитому белку, который имеет антиген-специфический внеклеточный (или эктодоменный) домен, связанный с внутриклеточным доменом, который заставляет клетку выполнять специализированную функцию при связывании антигена с внеклеточным доменом. Химерные антигенные рецепторы отличаются от других антигенсвязывающих агентов своей способностью как связывать МНС-независимый антиген, так и передавать сигналы активации через свой внутриклеточный домен.

[0241] В некоторых аспектах антиген-специфический внеклеточный домен химерного антигенного рецептора распознает и специфически связывает антиген, то есть L1CAM. L1CAM-специфический внеклеточный домен, используемый для CAR по данному изобретению, может представлять собой любой антигенсвязывающий полипептид, широкий спектр которых известен в данной области техники. В некоторых

случаях антигенсвязывающий домен представляет собой одноцепочечный Fv (scFv) или Fab. В других аспектах антигенсвязывающий фрагмент, используемый для CAR по данному изобретению, включает антигенсвязывающий фрагмент, описанный где-либо в данном документе.

[0242] В некоторых аспектах трансмембранный домен, используемый для CAR, связан с внеклеточным доменом и может содержать встречающийся в природе трансмембранный домен. В других аспектах трансмембранный домен, используемый для CAR, может происходить из альфа-цепи, бета-цепи или дзета-цепи рецептора Т-клеток, CD28, CD3 ε, CD45, CD4, CD5, CDS, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD154, CD8 или любых других, известных в данной области техники.

[0243] Термин «внутриклеточный домен» относится к части CAR, которая преобразует сигнал эффекторной функции при связывании антигена с внеклеточным доменом и направляет Т-клетку на выполнение специальной функции. В одном аспекте внутриклеточный домен CAR содержит мотив активации иммунных рецепторов на основе тирозина (ITAM). В некоторых аспектах ITAM получен из CD3 дзета (ζ, дзета), FcR гамма, FcR бета, CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CDS, CD22, CD79a, CD79b, CD66d, 4-1 BB, DAP-10, OX40 или Fc [эпсилон] RI [гамма].

[0244] В некоторых аспектах CAR по данному изобретению дополнительно содержит костимулирующий домен, который может быть связан с внутриклеточным доменом. Костимулирующий домен в конструкции CAR может передавать сигналы и активировать клетки как часть внутриклеточной части CAR. В некоторых аспектах костимулирующий домен получен из CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, функционально-ассоциированного антигена лимфоцитов 1 (LFA-1), CD7, LIGHT, NKG2C или B7-H3.

[0245] В других аспектах CAR по данному изобретению дополнительно содержит линкер. Между трансмембранным и внутриклеточным доменом может находиться короткий олигопептидный или полипептидный линкер. В некоторых аспектах линкер не ограничен определенной длиной, при условии, что внутриклеточный домен CAR, когда внеклеточный домен связан с антигеном, то есть L1CAM, способен индуцировать активацию Т-клеток. В некоторых аспектах линкер содержит линкер (Gly4Ser)3.

[0246] В других аспектах настоящее изобретение включает полинуклеотид, кодирующий CAR по данному изобретению, или вектор, содержащий полинуклеотид.

[0247] Используемый в данном документе термин «Т-клетка» означает лимфоцит, происходящий из тимуса и подавляющий иммунный ответ клетки. Т-клетки включают CD4 + Т-клетки (хелперные Т-клетки, TH-клетки), CD8 + Т-клетки (цитотоксические Т-клетки, CTL), Т-клетки памяти, регуляторные Т-клетки (Treg) или Т-клетки естественных киллеров. В некоторых аспектах Т-клетка, в которую вводится CAR, является CD8 + Т-клеткой.

VII. Иммуноконъюгаты, производные антител и средства диагностики

[0248] Описанные в данном документе антитела к L1CAM могут быть использованы для диагностических целей, включая тестирование образцов и визуализацию *in vivo*, и для этой цели антитело (или его связывающий фрагмент) можно конъюгировать с подходящим детектируемым агентом с образованием иммуноконъюгата. Для диагностических целей подходящими агентами являются обнаруживаемые метки, которые включают радиоизотопы, для визуализации всего тела и радиоизотопы, ферменты, флуоресцентные метки и другие подходящие метки антител для тестирования образцов.

[0249] Обнаруживаемые метки, которые могут быть связаны с любым описанным в данном документе антителом к L1CAM, могут быть любого из различных типов, используемых в настоящее время в области диагностики *in vitro*, включая метки в виде частиц, включая золи металлов, такие как коллоидное золото,

изотопы, такие как I^{125} или Tc^{99} представленные, например, пептидным хелатирующим агентом типа N_2S_2 , N_3S или N_4 , хромофорами, включая флуоресцентные маркеры, люминесцентные маркеры, фосфоресцентные маркеры и т.п., а также ферментными метками, которые превращают данный субстрат в детектируемый маркер, и полинуклеотидными метками, которые выявляются после амплификации, например, с помощью полимеразной цепной реакции. Подходящие ферментные метки включают пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу и т.п. Например, метка может быть ферментом щелочной фосфатазой, обнаруживаемой путем измерения наличия или образования хемилюминесценции после превращения 1,2-диоксетановых субстратов, таких как адамантилметоксифосфорилоксибензидиоксетан (AMPPD), динатрий 3-(4-(метоксиспиро {1, 2-диоксетан-3,2'-(5'-хлор) трицикло {3.3.1.1 3,7} декан} -4-ил) фенилфосфат (CSPD), а также CDP и CDP-STAR® или другие люминесцентные субстраты, хорошо известные специалистам в данной области техники, например хелаты подходящих лантаноидов, таких как тербий (III) и европий (III). Средство обнаружения определяется выбранной меткой. Обнаружение метки или продуктов ее реакции может быть достигнуто невооруженным глазом в случае, если метка представляет собой твердые частицы и накапливается на соответствующих уровнях, или с помощью таких инструментов, как спектрофотометр, люминометр, флуориметр и т.п. в соответствии со стандартной практикой.

[0250] В некоторых аспектах способы конъюгации приводят к связям, которые являются по существу (или почти) неиммуногенными, *например*, пептидные (*т.е.* амидные), сульфидные (пространственно затрудненные), дисульфидные, гидразоновые и эфирные связи. Эти связи почти неиммуногенны и демонстрируют разумную стабильность в сыворотке крови (*см.*, *например*, Senter, P. D., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13 (2009) 235-244; WO 2009/059278; WO 95/17886).

[0251] В зависимости от биохимической природы полипептида и антитела, используются различные стратегии конъюгации. В случае если полипептид является природным или получен рекомбинантным способом и содержит от 50 до 500 аминокислотных остатков, специалист в данной области техники может легко следовать стандартным процедурам, описывающим химию синтеза белковых конъюгатов, описанным в руководствах (*см.*, *например*, Hackenberger, C. P. R., and Schwarzer, D., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 47 (2008) 10030-10074). В некоторых аспектах используется малеинимидо-группировки с остатком цистеина внутри антитела или полипептида. Эта реакция связывания является особенно подходящей в случае, *например*, использования Fab или Fab'-фрагмента антитела. Альтернативно, в некоторых аспектах выполняется реакция связывания с С-концом антитела или полипептида. С-концевая модификация белка, *например*, Fab-фрагмента, может быть выполнена как описано в (Sunbul, M. and Yin, J., *Org. Biomol. Chem.* 7 (2009) 3361-3371).

[0252] В целом, сайт-специфическая реакция и ковалентное связывание основаны на преобразовании природной аминокислоты в аминокислоту с реакционной способностью, которая ортогональна реакционной способности других присутствующих функциональных групп. Например, конкретный цистеин в контексте редкой последовательности может быть ферментативно преобразован в альдегид (*см.* Frese, M. A., and Dierks, T., *ChemBioChem.* 10 (2009) 425-427). Также можно получить нужную аминокислотную модификацию, используя способность некоторых ферментов специфически реагировать с природной аминокислотой в данном контексте последовательности (*см.*, *например*, Taki, M. *et al.*, *Prot. Eng. Des. Sel.* 17 (2004) 119-126; Gautier, A. *et al. Chem. Biol.* 15 (2008) 128-136; и Protease-catalyzed formation of C—N bonds is used by Bordusa, F., *Highlights in Bioorganic Chemistry* (2004) 389-403). Сайт-специфическое взаимодействие и ковалентное связывание также может быть достигнуто путем селективной реакции концевых аминокислот с соответствующими модифицирующими реагентами.

[0253] Реакционная способность N-концевого цистеина с бензонитрилами (см. Ren, H. *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48 (2009) 9658-9662) может быть использована для достижения сайт-специфического ковалентного связывания.

[0254] Нативное химическое лигирование также может быть основано на C-концевых остатках цистеина (Taylor, E. Vogel; Imperiali, B. *Nucleic Acids and Molecular Biology* (2009), 22 (Protein Engineering), 65-96).

[0255] US6437095 B1 описывает способ конъюгации, который основан на более быстрой реакции цистеина, расположенного в участке отрицательно заряженных аминокислот с цистеином, расположенным в участке положительно заряженных аминокислот.

[0256] Фрагмент также может быть синтетическим пептидом или пептидомиметиком. В случае если полипептид химически синтезирован, то аминокислоты с ортогональной химической реактивностью могут быть включены в ходе такого синтеза (см. *например*, de Graaf, A. J. *et al.*, *Bioconjug. Chem.* 20 (2009) 1281-1295). Поскольку большое разнообразие ортогональных функциональных групп имеется и может быть введено в синтетический пептид, конъюгация такого пептида с линкером является стандартной химической реакцией.

[0257] Чтобы получить меченый полипептид, конъюгат со стехиометрией 1:1 может быть отделен с помощью хроматографии от других побочных продуктов конъюгации. Эта процедура может быть облегчена с помощью меченого красителем элемента связывающей пары и заряженного линкера. При использовании этого типа меченого и сильно отрицательно заряженного элемента связывающей пары моноконъюгированные полипептиды легко отделяются от немеченых полипептидов и полипептидов, которые несут более одного линкера, поскольку разница в заряде и молекулярном весе может быть использована для разделения. Флуоресцентный краситель может быть полезен для очистки комплекса от несвязанных компонентов, например, меченого одновалентного связывающего элемента.

[0258] В некоторых аспектах фрагмент, присоединенный к антителу к L1CAM, выбран из группы, состоящей из связывающего фрагмента, фрагмента для мечения и биологически активного фрагмента.

[0259] Описанные в данном документе антитела к L1CAM также могут быть конъюгированы с терапевтическим агентом с образованием иммуноконъюгата, такого как конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC). Подходящие терапевтические агенты включают антиметаболиты, алкилирующие агенты, связывающие малые бороздки ДНК, интеркаляторы ДНК, сшивающие агенты ДНК, ингибиторы гистондеацетилазы, ингибиторы ядерного экспорта, ингибиторы протеасом, ингибиторы топоизомеразы I или II, ингибиторы белков теплового шока, ингибиторы тирозинкиназы, антибиотики и антимицотические агенты. В ADC антитело и терапевтический агент предпочтительно конъюгированы через расщепляемый линкер, такой как пептидилловый, дисульфидный или гидразоновый линкер. ADC могут быть изготовлены, как описано в патентах США № 7087600; 6989452 и 7129261; публикациях PCT WO 02/096910; WO 07/038658; WO 07/051081; WO 07/059404; WO 08/083312 и WO 08/103693; патентных публикациях США 20060024317; 20060004081 и 20060247295.

[0260] В некоторых аспектах терапевтический агент выбран из группы, состоящей из цитотоксического, нецитотоксического лекарственного средства, радиоактивного агента, второго антитела, фермента, противоопухолевого агента и любой их комбинации.

[0261] В некоторых аспектах иммуноконъюгат содержит антитело к L1CAM и цитотоксическое лекарственное средство. Цитотоксическое лекарственное средство можно выбрать из любого цитотоксина, известного в данной области техники. В некоторых аспектах цитотоксическое лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из доластатина, монометилауристината E (ММАЕ), майтанзина,

дуокармицина, калихеамицина, пирролобензодиазепина, дуокармицина, центанамицина, SN38, доксорубицина, его производного и любой их комбинации. В некоторых аспектах иммуноконъюгат содержит антитело к L1CAM и цитотоксин А. В других аспектах иммуноконъюгат содержит антитело к L1CAM и нецитотоксическое лекарственное средство.

[0262] В некоторых аспектах иммуноконъюгат содержит антитело к L1CAM и радиоактивный агент. В некоторых аспектах радиоактивный агент представляет собой радионуклид. В некоторых аспектах радиоактивный агент включает радиоактивный йод. В конкретных аспектах радиоактивный агент включает ¹³¹йод. В других аспектах радиоактивный агент включает радиоактивный изотоп иттрия-90.

[0263] В некоторых аспектах иммуноконъюгат содержит антитело к L1CAM и второе антитело. В некоторых аспектах иммуноконъюгат содержит антитело к L1CAM и фермент. В некоторых аспектах фермент включает глюкозооксидазу. В некоторых аспектах фермент включает пероксидазу. В некоторых аспектах фермент включает миелопероксидазу. В некоторых аспектах фермент включает глюкозооксидазу. В некоторых аспектах фермент включает пероксидазу хрена.

[0264] В некоторых аспектах иммуноконъюгат содержит антитело к L1CAM и противоопухолевый агент. Противоопухолевый агент может быть любым агентом, известным в данной области техники. В некоторых аспектах противоопухолевым агентом является эпирубин. В некоторых аспектах противоопухолевый агент представляет собой суперантиген. В некоторых аспектах суперантиген представляет собой *стафилококковый энтеротоксин А* (SEA / E-120; эстафенатокс).

[0265] Антитела к L1CAM, *например*, описанные в данном документе, также могут быть использованы для обнаружения L1CAM, такого как L1CAM человека, *например*, L1CAM человека на поверхности клетки или растворимого L1CAM в сыворотке. Антитела можно использовать, *например*, в анализе ИФА или в проточной цитометрии. В некоторых аспектах антитело к L1CAM контактирует с клетками или сывороткой в течение времени, подходящего для того, чтобы произошло специфическое связывание, а затем добавляется реагент, *например*, антитело, которое обнаруживает антитело к L1CAM. Иллюстративные анализы представлены в примерах. Примеры способов обнаружения L1CAM, *например*, поверхностно экспрессируемого L1CAM или растворимого L1CAM (sL1CAM) в образце (сыворотке), включают (i) контактирование образца с антителом к L1CAM в течение времени, достаточного для обеспечения специфического связывания антитела к L1CAM с L1CAM в образце, и (2) контактирование образца с реагентом обнаружения, *например*, антителом, которое специфически связывается с антителом к L1CAM, например с Fc-областью антитела к L1CAM, чтобы таким образом обнаружить L1CAM, связанный с антителом к L1CAM. Этапы промывки могут быть включены после инкубации с антителом и/или реагентом обнаружения. Антитела к L1CAM для использования в этих методах не обязательно должны быть связаны с меткой или агентами обнаружения, поскольку можно отдельно использовать агент обнаружения.

[0266] Другие применения антител к L1CAM, *например*, в качестве монотерапии или комбинированной терапии, представлены в другом месте данного документа, *например*, в разделе, касающемся комбинированного лечения.

VIII. Биспецифические молекулы

[0267] Описанные в данном документе антитела к L1CAM можно использовать для образования биспецифических молекул. Антитело к L1CAM или его антигенсвязывающие части могут быть дериватизированы или присоединены к другой функциональной молекуле, *например*, к другому пептиду или белку (*например*, к другому антителу или лиганду для рецептора) с получением биспецифической молекулы,

которая связывается по меньшей мере с двумя различными сайтами связывания или с молекулами-мишенями. Например, антитело к L1CAM может быть связано с антителом или scFv, которое специфически связывается с любым белком, который может использоваться в качестве потенциальных мишеней для комбинированного лечения. Описанное в данном документе антитело может быть получено или связано с более чем одной другой функциональной молекулой для образования мультиспецифических молекул, которые связываются более чем с двумя различными сайтами связывания и/или молекулами-мишенями; такие мультиспецифические молекулы также охватываются термином «биспецифическая молекула», который используется в данном документе. Для создания биспецифической молекулы, описанной в данном документе, описанное в данном документе антитело может быть функционально присоединено (*например*, посредством химического связывания, сщепления генов, нековалентного связывания или каким-либо иным методом связывания) к одной или нескольким другим связывающим молекулам, таким как другое антитело, фрагмент антитела, пептид или связывающий миметик, с получением биспецифической молекулы.

[0268] В соответствии с этим, в данном документе предложены биспецифические молекулы, содержащие по меньшей мере одну первую специфичность связывания с L1CAM и вторую специфичность связывания для со вторым эпитопом-мишенью. В некоторых описанных в данном документе аспектах, в которых биспецифическая молекула является мультиспецифической, молекула может дополнительно обладать третьей специфичностью связывания.

[0269] В некоторых аспектах биспецифические молекулы, описанные в данном документе, содержат в качестве специфичности связывания по меньшей мере одно антитело или его фрагмент, включая, *например*, Fab, Fab', F (ab')₂, Fv или одноцепочечный Fv (scFv). Антитело также может представлять собой димер легкой цепи или тяжелой цепи или любой его минимальный фрагмент, такой как Fv или одноцепочечную конструкцию, описанную в Ladner *et al.* Патент США № 4946778.

[0270] Описанные в данном документе биспецифические молекулы могут быть получены конъюгирования молекул, обладающих специфичностью связывания, с использованием способов, известных в данной области техники. Например, каждая биспецифическая молекула, обладающая специфичностью связывания, может быть получена отдельно и затем все эти молекулы могут быть конъюгированы друг с другом. Если молекулами, обладающими специфичностью связывания, являются белки или пептиды, то для ковалентной конъюгации может быть использован ряд связывающих или перекрестно сшивающих агентов. *См.*, *например*, Karpovsky *et al.* (1984) *J. Exp. Med.* 160: 1686; Liu, MA *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8648. Другие методы включают методы, описанные в Paulus (1985) *Behring Ins. Mitt.* No. 78, 118-132; Brennan *et al.* (1985) *Science* 229:81-83) и Glennie *et al.* (1987) *J. Immunol.* 139: 2367-2375). Некоторые конъюгирующие агенты представляют собой SATA и сульфо-SMCC, оба доступны от Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

IX. Композиции

[0271] В данном документе также предложены композиции, *например*, фармацевтические композиции, содержащие одно антитело или комбинацию антител к L1CAM или комбинацию с антителами к другим мишеням, или их антигенсвязывающую часть (части), описанные в данном документе, приготовленные вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Такие композиции могут включать одно антитело или комбинацию (*например*, двух или более разных) антител, или иммуноконъюгатов, или биспецифических молекул, описанных в данном документе. Например, описанная в данном документе фармацевтическая композиция может содержать комбинацию антител (или иммуноконъюгатов, или биспецифических веществ),

которые связываются с различными эпитопами на антигене-мишени или обладают комплементарной активностью.

[0272] Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, также можно вводить в рамках комбинированной терапии, *т. е.* в комбинации с другими агентами. Например, комбинированная терапия может включать описанное в данном документе антитело к LICAM в сочетании с по меньшей мере еще одним противораковым и или иммуномодулирующим, *например*, стимулирующим агентом (*например*, активирующим) Т-клеток. Примеры терапевтических агентов, которые можно использовать в комбинированной терапии, описаны более подробно ниже в разделе, посвященном применению описанных в данном документе антител к LICAM.

[0273] В некоторых аспектах композиция по данному изобретению дополнительно содержит объемобразующий агент. Объемобразующий агент может быть выбран из группы, состоящей из NaCl, маннита, глицина, аланина и любой их комбинации. В других аспектах композиция по данному изобретению содержит стабилизирующий агент. Стабилизирующий агент может быть выбран из группы, состоящей из сахарозы, трегалозы, раффинозы, аргинина или любой их комбинации. В других аспектах композиция по данному изобретению содержит поверхностно-активное вещество. Поверхностно-активное вещество может быть выбрано из группы, состоящей из полисорбата 80 (PS80), полисорбата 20 (PS20) и любой их комбинации. В некоторых аспектах композиция дополнительно содержит хелатирующий агент. Хелатирующий агент может быть выбран из группы, состоящей из диэтиленetriаминпентауксусной кислоты (ДТРА), этилендиаминтетрауксусной кислоты, нитрилтриуксусной кислоты и любой их комбинации.

[0274] В других аспектах композиция содержит третье антитело. В некоторых аспектах третье антитело представляет собой любое антитело, описанное в данном документе.

[0275] В одном аспекте композиция дополнительно содержит NaCl, маннит, пентетиновую кислоту (ДТРА), сахарозу, PS80 и любую их комбинацию.

[0276] Используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемый носитель» включает любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и замедляющие абсорбцию агенты и тому подобное, которые являются физиологически совместимыми. В некоторых аспектах носитель подходит для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (*например*, путем инъекции или инфузии). Вариант подкожной инъекции основан на технологии доставки лекарств ENHANZE® компании Halozyme Therapeutics, включающей совместный состав антител с рекомбинантным ферментом гиалуронидазы человека (гHuPH20), что устраняет традиционные ограничения на объем биопрепаратов и лекарств, которые могут быть доставлены подкожно из-за внеклеточного матрикса (Патент США № 7767429). В зависимости от пути введения активное соединение, *т. е.* антитело, иммуноконъюгат или биспецифическая молекула, может быть покрыто материалом для защиты соединения от действия кислот и других природных условий, которые могут инактивировать соединение.

[0277] Фармацевтические соединения, описанные в данном документе, могут включать одну или более фармацевтически приемлемых солей. «Фармацевтически приемлемая соль» относится к соли, которая сохраняет необходимую биологическую активность родительского соединения и не приводит к каким-либо нежелательным токсическим эффектам (см., *например*, Berge, S.M., *et al.* (1977) *J. Pharm. Sci.* 66: 1-19A. Описанная в данном документе фармацевтическая композиция также может включать фармацевтически приемлемый антиоксидант.

[0278] Эти композиции также могут содержать адьюванты, такие как консерванты, смачивающие агенты, эмульгирующие агенты и диспергирующие агенты. Предотвращение присутствия микроорганизмов можно гарантировать с помощью как процедур стерилизации, см. выше, так и посредством включения различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, парабена, хлорбутанола, фенолсорбиновой кислоты и т. д. Также может быть желательно включать в композиции изотонические агенты, такие как сахара, хлорид натрия и тому подобное. Кроме того, продленную абсорбцию инъекционной фармацевтической формы можно обеспечивать путем включения агентов, которые замедляют абсорбцию, таких как моностеарат алюминия и желатин.

[0279] Фармацевтически приемлемые носители включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для предусмотренного для немедленного приема приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Использование таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ известно в данной области техники. За исключением случаев, когда какой-либо обычный носитель или агент несовместим с активным соединением, предполагается его применение в фармацевтических композициях, описанных в данном документе. Фармацевтическая композиция может содержать или не содержать консервант. В композиции могут быть включены дополнительные активные соединения.

[0280] Терапевтические композиции обычно должны быть стерильными и стабильными в условиях производства и хранения. Композицию можно готовить в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарства. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т. д.) и их подходящие смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем применения материалов для покрытия, таких как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсий и путем применения поверхностно-активных веществ. Во многих случаях композиции могут включать изотонические агенты, например сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит или хлорид натрия. Продленное всасывание инъекционных композиций можно обеспечить путем включения в композицию агента, который замедляет всасывание, например, моностеаратных солей и желатина.

[0281] Стерильные инъекционные растворы можно готовить путем включения активного соединения в необходимом количестве в подходящий растворитель с одним ингредиентом или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, при необходимости, с последующей стерилизацией микрофильтрацией. В общем случае дисперсии готовят путем включения активного соединения в стерильный базовый раствор, который содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из перечисленных в данном документе. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций, некоторые способы приготовления представляют собой вакуумную сушку и сублимационную сушку (лиофилизацию), которые приводят к получению порошка активного ингредиента вместе с любым дополнительным активным ингредиентом из его ранее стерильно-профильтрованного раствора.

[0282] Для введения антитела к LICAM, например, описанного в данном документе, дозировка находится в диапазоне примерно от 0,0001 до 100 мг/кг.

[0283] В некоторых способах два или более моноклональных антитела с разной специфичностью связывания вводятся одновременно, в этом случае доза каждого вводимого антитела находится в пределах указанных диапазонов. Антитело обычно вводят несколько раз.

[0284] Антитело можно вводить в виде композиции с замедленным высвобождением, и в этом случае требуется менее частое введение. Дозировка и частота варьируются в зависимости от периода полужизни

антитела у пациента. В общем, человеческие антитела показывают самый длительный период полужизни, за ними следуют гуманизированные антитела, химерные антитела и нечеловеческие антитела. Дозировка и частота приема могут варьироваться в зависимости от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. В профилактических целях относительно небольшая доза вводится через относительно нечастые интервалы в течение длительного периода времени. Некоторые пациенты продолжают получать лечение в течение всей своей жизни. В терапевтических целях иногда требуется относительно высокая доза с относительно короткими интервалами до тех пор, пока прогрессирование заболевания не уменьшится или не прекратится, и пока у пациента не появится частичное или полное улучшение симптомов заболевания. После этого пациенту может быть назначена профилактическая схема лечения.

[0285] «Терапевтически эффективная доза» антитела к L1CAM, описанного в данном документе, может привести к уменьшению тяжести симптомов заболевания, увеличению частоты и продолжительности периодов без симптомов заболевания или к предотвращению ухудшения или инвалидности из-за заболевания. В контексте рака терапевтически эффективная доза может привести к увеличению выживаемости, *например*, общей выживаемости, и/или предотвращению дальнейшего ухудшения физических симптомов, связанных с раком. Симптомы рака хорошо известны в данной области техники и включают, например, необычные особенности родинки, изменение внешнего вида родинки, включая асимметрию, изменение границы, цвета и/или диаметра, новый пигментированный участок кожи, аномальную родинку, затемнение под ногтем, уплотнения в груди, изменения сосков, кисты груди, боль в груди, смерть, потеря веса, слабость, чрезмерная утомляемость, трудности с приемом пищи, потеря аппетита, хронический кашель, обострение одышки, кашель с кровью, кровь в моче, кровь в стуле, тошноту, рвоту, метастазы в печень, метастазы в легкие, метастазы в кости, ощущение переполнения желудка, метеоризм, жидкость в брюшной полости, вагинальное кровотечение, запор, вздутие живота, перфорацию толстой кишки, острый перитонит (инфекция, жар, боль), боль, рвоту кровью, сильное потоотделение, лихорадку, высокое кровяное давление, анемию, диарею, желтуху, головокружение, озноб, мышечные спазмы, метастазы в толстую кишку, метастазы в легкие, метастазы в мочевой пузырь, метастазы в печень, метастазы в кости, метастазы в почки и метастазы в поджелудочной железе, затрудненное глотание и тому подобное.

[0286] Терапевтически эффективная доза может предотвратить или отсрочить начало рака, что может быть желательным при наличии ранних или предварительных признаков заболевания. Лабораторные тесты, используемые для диагностики рака, включают биохимические (включая измерение уровней L1CAM), гематологические, серологические и радиологические. Соответственно, любой клинический или биохимический анализ, который контролирует любой из вышеперечисленных признаков, можно использовать для определения того, является ли конкретное лечение терапевтически эффективной дозой для лечения рака. Специалист в данной области сможет определить такие количества на основе таких факторов, как размер субъекта, серьезность симптомов субъекта и определенных условий или выбранного способа введения.

[0287] Композицию, описанную в данном документе, можно вводить одним или несколькими путями введения с использованием одного или нескольких способов, известных в данной области техники. Для специалиста в данной области техники очевидно, что путь и/или режим введения будет варьироваться в зависимости от необходимых результатов. Пути введения описанных в данном документе антител к L1CAM могут включать внутривенный, внутримышечный, внутрикожный, внутрибрюшинный, подкожный, спинальный или другие парентеральные пути введения, например, путем инъекции или инфузии. В контексте данного документа выражение «парентеральное введение» означает режим введения, отличный от

энтерального и местного введения, обычно посредством инъекции, и включают, без ограничения, внутривенную, внутримышечную, внутриаартериальную, интратекальную, интракапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, интрадермальную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интрастернальную инъекцию и инфузию.

[0288] Альтернативно, описанное в данном документе антитело можно потенциально вводить непарентеральным путем, таким как местный, эпидермальный или мукозальный путь введения, например интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно.

X. Наборы

[0289] В данном документе предложены наборы, содержащие одно или более антител, описанных в данном документе, или их антигенсвязывающие фрагменты, их биспецифические молекулы или иммуноконъюгаты. В конкретном аспекте в данном документе предложена фармацевтическая упаковка или набор, включающая один или более контейнеров, заполненных одним или более ингредиентами фармацевтических композиций, описанных в данном документе, такими как одно или более антител, предложенных в данном документе, или их антигенсвязывающий фрагмент, необязательно инструкция по использованию. В некоторых аспектах наборы содержат фармацевтическую композицию, описанную в данном документе, и любое профилактическое или терапевтическое средство, например, описанное в данном документе.

XI. Использование и способы

[0290] Некоторые аспекты данного изобретения относятся к способу лечения субъекта, включающему введение субъекту антитела к LICAM, описанного в данном документе, полинуклеотида, кодирующего антитело к LICAM, вектора, содержащего полинуклеотид, клетки-хозяина, содержащей полинуклеотид, иммуноконъюгата, содержащего антитело к LICAM или любая их комбинация.

[0291] Некоторые аспекты данного изобретения относятся к способу лечения рака у субъекта, который в этом нуждается, включающему введение субъекту эффективной дозы композиции, описанной в данном документе (*например*, антитела, полинуклеотида, вектора, клетки-хозяина, иммуноконъюгата или фармацевтического состава). В других аспектах настоящее изобретение направлено на способ ингибирования выделения LICAM опухолевой клеткой у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективной дозы композиции, описанной в данном документе. В других аспектах настоящее изобретение направлено на способ уменьшения выделения LICAM в сыворотке и/или удержания LICAM на поверхности клетки у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективной дозы композиции, описанной в данном документе. В других аспектах настоящее изобретение направлено на способ уничтожения опухолевой клетки у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективной дозы композиции, описанной в данном документе. В других аспектах настоящее изобретение направлено на способ уменьшения размера опухоли у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективной дозы композиции, описанной в данном документе. В других аспектах настоящее изобретение направлено на ингибирование метастазирования опухоли у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективной дозы композиции, описанной в данном документе. В некоторых аспектах субъектом является человек.

[0292] Композиции по данному изобретению можно вводить любым фармацевтически приемлемым путем. В некоторых аспектах композицию (*например*, антитело, полинуклеотид, вектор, клетку-хозяин,

иммуноконъюгат или фармацевтическую композицию) вводят внутривенно, внутривнутрибрюшинно, внутримышечно, внутриартериально, интратекально, внутривнутрилимфатически, внутривнутрилезивно, внутривнутрикапсулярно, внутривнутриорбитально, внутривнутрисердечно, внутривнутрикожно, транстрахеально, подкожно, подкожно, внутриввнутрисуставно, субкапсулярно, субарахноидально, интраспинально, эпидурально, внутриввнутривенно, местно, эпидермально, через слизистую оболочку или любую их комбинацию. В некоторых аспектах композицию вводят внутриввнутривенно. В некоторых аспектах композицию вводят подкожно.

[0293] В некоторых аспектах способ уменьшает размер раковых образований, *например* размер опухоли у субъекта. В некоторых аспектах размер раковых образований уменьшается по меньшей мере примерно на 5%, по меньшей мере примерно на 10%, по меньшей мере примерно на 15%, по меньшей мере примерно на 20%, по меньшей мере примерно на 25%, по меньшей мере примерно на 30%, по меньшей мере примерно на 35%, по меньшей мере примерно на 40%, по меньшей мере примерно на 45%, по меньшей мере примерно на 50%, по меньшей мере примерно на 60%, по меньшей мере примерно на 70%, по меньшей мере примерно на 80% или по меньшей мере примерно на 90%.

[0294] В некоторых аспектах способ увеличивает общую выживаемость субъекта. В некоторых аспектах общая выживаемость увеличивается по сравнению со средней общей выживаемостью субъекта, страдающего тем же видом рака, но получающего другую терапию. В конкретных аспектах общая выживаемость увеличивается по меньшей мере примерно на 10%, по меньшей мере примерно на 20%, по меньшей мере примерно на 25%, по меньшей мере примерно на 50%, по меньшей мере примерно в 2 раза, по меньшей мере примерно в 3 раза, по меньшей мере примерно в 5 раз. В некоторых аспектах общая выживаемость увеличивается по меньшей мере примерно на один месяц, по меньшей мере примерно на 2 месяца, по меньшей мере примерно на 3 месяца, по меньшей мере примерно на 4 месяца, по меньшей мере примерно на 5 месяцев, по меньшей мере примерно на 6 месяцев, по меньшей мере примерно на 7 месяцев, по меньшей мере примерно на 8 месяцев, по меньшей мере примерно на 9 месяцев, по меньшей мере примерно на 10 месяцев, по меньшей мере примерно на 1 месяц, по меньшей мере примерно на 12 месяцев, по меньшей мере примерно на 15 месяцев, по меньшей мере примерно на 18 месяцев, по меньшей мере примерно на 21 месяц, по меньшей мере примерно на 2 года, по меньшей мере примерно на 3 года, по меньшей мере примерно на 4 года, по меньшей мере примерно на 5 лет или по меньшей мере примерно на 10 лет.

[0295] В некоторых аспектах способ увеличивает выживаемость субъекта без прогрессирования заболевания. В некоторых аспектах общая выживаемость увеличивается по сравнению со средней выживаемостью без прогрессирования заболевания у субъекта, страдающего тем же видом рака, но получающего другую терапию. В конкретных аспектах общая выживаемость без прогрессирования заболевания увеличивается по меньшей мере примерно на 10%, по меньшей мере примерно на 20%, по меньшей мере примерно на 25%, по меньшей мере примерно на 50%, по меньшей мере примерно в 2 раза, по меньшей мере примерно в 3 раза, по меньшей мере примерно в 5 раз. В некоторых аспектах общая выживаемость увеличивается по меньшей мере примерно на один месяц, по меньшей мере примерно на 2 месяца, по меньшей мере примерно на 3 месяца, по меньшей мере примерно на 4 месяца, по меньшей мере примерно на 5 месяцев, по меньшей мере примерно на 6 месяцев, по меньшей мере примерно на 7 месяцев, по меньшей мере примерно на 8 месяцев, по меньшей мере примерно на 9 месяцев, по меньшей мере примерно на 10 месяцев, по меньшей мере примерно на 1 месяц, по меньшей мере примерно на 12 месяцев, по меньшей мере примерно на 15 месяцев, по меньшей мере примерно на 18 месяцев, по меньшей мере примерно на 21 месяц, по меньшей мере примерно на 2 года, по меньшей мере примерно на 3 года, по меньшей мере примерно на 4 года, по меньшей мере примерно на 5 лет или по меньшей мере примерно на 10 лет.

[0296] В некоторых аспектах способ увеличивает скорость наступления полной ремиссии у субъекта. В конкретных аспектах способ вызывает у полную ремиссию у субъекта. В некоторых аспектах способ увеличивает неполную ремиссию у субъекта.

[0297] В некоторых аспектах способ включает введение антитела к LICAM (или полинуклеотида, вектора, клетки-хозяина или иммуноконъюгата), описанного в данном документе, и второй вид терапии. В некоторых аспектах второй вид терапии проводят до введения антитела к LICAM. В некоторых аспектах второй вид терапии проводят после введения антитела к LICAM. В некоторых аспектах второй вид терапии одновременно с введением антитела к LICAM. В некоторых аспектах введение антитела к LICAM и второй вид терапии проводят отдельно. В других аспектах антитело к LICAM и второй вид терапии вводят в одном составе.

[0298] Второй вид терапии может быть любой другой терапией, известной в данной области техники. В некоторых аспектах второй вид терапии включает иммунотерапию. В некоторых аспектах второй вид терапии включает химиотерапию. В некоторых аспектах второй вид терапии включает лучевую терапию. В некоторых аспектах второй вид терапии включает хирургическое вмешательство. В некоторых аспектах второй вид терапии включает введение второго терапевтического агента.

[0299] Антитела к LICAM могут усиливать иммунный ответ на раковые клетки у пациента, страдающего раком. В данном документе предложены способы лечения субъекта, страдающего раком, включающие введение субъекту антитела к LICAM, описанного в данном документе, таким образом, чтобы субъект проходил лечение, *например*, таким образом, чтобы рост раковых опухолей подавлялся или уменьшался и/или чтобы опухоли регрессировали и/или достигалась длительная выживаемость. Антитело к LICAM можно использовать отдельно для подавления роста раковых опухолей. Альтернативно, антитело к LICAM можно использовать в сочетании с другим агентом, *например*, другим иммуногенным агентом, стандартным лечением рака или другим антителом, как описано ниже.

[0300] Соответственно, в данном документе предложены способы лечения злокачественного новообразования, *например*, путем ингибирования роста опухолевых клеток у субъекта, включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела к LICAM, описанного в данном документе. Злокачественные новообразования, рост которых можно ингибировать с помощью антител по данному изобретению, включают злокачественные новообразования, обычно реагирующие на иммунотерапию, и те, которые обычно невосприимчивы к иммунотерапии. Злокачественные новообразования, которые можно лечить, также включают LICAM-положительные злокачественные новообразования. Виды раков могут представлять собой рак с солидными опухолями или злокачественные новообразования крови (опухоли жидких тканей). Неограничивающие примеры рака, которые поддаются лечению, включают рак желчных протоков, плоскоклеточный рак, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, плоскоклеточный немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), неплюскоклеточный немелкоклеточный рак легкого, глиому, рак желудочно-кишечного тракта, рак почек (*например*, светлоклеточная карцинома), рак яичников, рак печени, колоректальный рак, рак эндометрия, рак почек (*например*, почечно-клеточная карцинома (ПКР)), рак простаты (*например*, гормонорезистентная аденокарцинома простаты), рак щитовидной железы, нейроblastoma, рак глотки, рак гортани, рак ротовой полости, рак соединительной ткани, лимфома Ходжкина, лимфома, множественная миелома, рак поджелудочной железы, глиобластома (мультиформная глиобластома), рак шейки матки, рак желудка, рак мочевого пузыря, гепатома, рак груди, аденокарцинома толстой кишки и рак головы и шеи (или карцинома), рак желудка, герминогенная опухоль, детская саркома, синоназальная опухоль, меланома (*например*,

метастатическая злокачественная меланома, такая как кожная или внутриглазная злокачественная меланома), рак костей, рак кожи, рак матки, рак анальной области, рак яичек, рак фаллопиевых труб, рак эндометрия, рак шейки матки, рак влагалища, рак вульвы, рак пищевода, рак тонкой кишки, рак эндокринной системы, рак парашитовидной железы, рак надпочечников, саркома мягких тканей, рак уретры, рак полового члена, рак прямой кишки, солидные опухоли детского возраста, рак мочеточника, карцинома почечной лоханки, новообразование центральной нервной системы (ЦНС), первичная лимфома ЦНС, ангиогенез опухоли, опухоль оси позвоночника, рак головного мозга, глиома ствола головного мозга, аденома гипофиза, саркома Капоши, эпидермоидный рак, плоскоклеточный рак, злокачественные новообразования, вызванные воздействием окружающей среды, включая злокачественные новообразования, вызванные асбестом, связанные с вирусами или злокачественные новообразования вирусного происхождения (*например*, вирус папилломы человека (опухоль, связанные с ВПЧ)); и любые комбинации указанных видов рака.

[0301] В некоторых аспектах антитело к L1CAM вводят пациентам, страдающим раком, который проявлял неадекватный ответ на предшествующее лечение или прогрессировал, *например*, предшествующее лечение иммуноонкологическим или иммунотерапевтическим препаратом, или пациентам, страдающим раком, который является рефрактерным или резистентным, либо по своей природе рефрактерным, либо резистентным, или при котором приобретает резистентное или рефрактерное состояние. Например, субъектов, которые не реагируют или недостаточно реагируют на первую терапию, или у которых наблюдается прогрессирование заболевания после лечения, можно лечить путем введения одного антитела к L1CAM или в комбинации с другим видом терапии.

[0302] В некоторых аспектах антитело к L1CAM вводят пациентам, которые ранее не получали (*то есть* лечились) иммуноонкологическое средство.

[0303] В некоторых аспектах способ лечения рака у субъекта включает сначала определение того, является ли субъект L1CAM-положительным, *например*, имеет ли субъект опухолевые клетки, экспрессирующие L1CAM, и если субъект имеет L1CAM-положительный рак, затем введение субъекту антитела к L1CAM, *например*, описанные в данном документе. Способ лечения субъекта, страдающего раком, антителом к L1CAM может включать введение субъекту, у которого есть раковые клетки, экспрессирующие L1CAM, терапевтически эффективного количества антитела к L1CAM. В данном документе также предложены способы прогнозирования ответа субъекта на лечение антителом к L1CAM, причем способы включают определение уровня L1CAM в раковых клетках пациента, и если раковые клетки субъекта являются L1CAM-положительными, то субъект, вероятно, восприимчивым к лечению антителом к L1CAM.

[0304] Антитело к L1CAM можно вводить со стандартным лечением. Антитело к L1CAM можно вводить в качестве поддерживающей терапии, *например*, терапии, которая предназначена для предотвращения возникновения или рецидива опухолей.

[0305] Антитело к L1CAM можно вводить с другим лечением, *например*, лучевой терапией, хирургическим вмешательством или химиотерапией. Например, дополнительная терапия антителом к L1CAM может быть назначена, когда существует риск наличия микрометастазов и/или для снижения риска рецидива.

[0306] Антитело к L1CAM, *например*, антитело кL1CAM, описанное в данном документе, можно применять в комбинации с протоколом вакцинации. Было разработано множество экспериментальных стратегий вакцинации против опухолей (*см.* Rosenberg, S., 2000, Development of Cancer Vaccines, ASCO Educational Book Spring: 60-62; Logothetis, C, 2000, ASCO Educational Book Spring: 300-302; Khayat, D. 2000,

ASCO Educational Book Spring: 414-428; Foon, K. 2000, ASCO Educational Book Spring: 730-738; см. также Restifo, N. and Sznol, M., Cancer Vaccines, Ch. 61, pp. 3023-3043 in DeVita *et al.* (eds.), 1997, Cancer: Principles and Practice of Oncology, Fifth Edition).

[0307] Введение антитела к L1CAM также можно сочетать со стандартными методами лечения рака (*например*, хирургическим вмешательством, лучевой терапией и химиотерапией). Введение антитела к L1CAM можно эффективно комбинировать со схемами лучевой терапии. В этих случаях можно уменьшить дозу вводимого химиотерапевтического препарата (Mokyr *et al.* (1998) *Cancer Research* 58: 5301-5304).

[0308] Практика данного изобретения будет использовать, если не указано иное, обычные методы клеточной биологии, культивирования клеток, молекулярной биологии, трансгенной биологии, микробиологии, рекомбинантной ДНК и иммунологии, которые известны специалистам в данной области техники. Такие методы полностью объяснены в литературе. См., например, Sambrook *et al.*, ed. (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook *et al.*, ed. (1992) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY); D. N. Glover ed., (1985) *DNA Cloning, Volumes I and II*; Gait, ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; Mullis *et al.* Пат. США №4683195; Hames and Higgins, eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Hames and Higgins, eds. (1984) *Transcription And Translation*; Freshney (1987) *Culture Of Animal Cells* (Alan R. Liss, Inc.); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press) (1986); Perbal (1984) *A Practical Guide To Molecular Cloning; the treatise, Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); Miller and Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells*, (Cold Spring Harbor Laboratory); Wu *et al.*, eds., *Methods In Enzymology*, Vols. 154 and 155; Mayer and Walker, eds. (1987) *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Academic Press, London); Weir and Blackwell, eds., (1986) *Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV*; *Manipulating the Mouse Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986);); Crooks, *Antisense drug Technology: Principles, strategies and applications*, 2nd Ed. CRC Press (2007) and in Ausubel *et al.* (1989) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, Baltimore, Md.).

[0309] Следующие примеры приведены с целью иллюстрации, а не с целью ограничения.

ПРИМЕРЫ

[0310] Следующие экспериментальные способы и детали указаны в следующих примерах.

Пример 1. Конструирование Ab612 с помощью сайт-направленного мутагенеза.

[0311] Человеческое антитело Ab417, связывающее L1CAM млекопитающих (*например*, человека и мыши) и методика его получения описаны в патенте США № 9777060 и в международной публикации № WO2014/077648, которые включены в данный документ посредством ссылки. Чтобы улучшить биофизические свойства антитела Ab417, исследовали влияние соответствующих аминокислот, составляющих переменную область антитела Ab417, на связывающую способность антитела Ab417.

[0312] Синтезировали ДНК, несущую мутации R16G, D54E, K76A и P88A в переменной области тяжелой цепи антитела Ab417, и подвергали рекомбинации с геном, кодирующим домен CN1 человеческого Cγ1, с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Полученный продукт ПЦР подвергали электрофорезу в 1,5% агарозном геле. Полосы, содержащие ДНК, вырезали и очищали с использованием набора для очистки продуктов ПЦР (GeneAII®). Оба конца очищенных ДНК расщепляли рестрикционными ферментами *NcoI* и *ApaI* (New England Biolabs) и субклонировали в сайты *NcoI* и *ApaI* модифицированной версии (pKRIBB-full

GIII) вектора для фагового дисплея человеческих Fab-фрагментов pKRIBB-FabD (ref), который несет полноразмерный ген III. Полученная рекомбинантная фагида была названа pKRIBB-full GIII-Fd612.

[0313] Синтезировали ДНК, несущую мутации I31S и V95P в варибельной области легкой цепи антитела Ab417 и подвергали рекомбинации с геном, кодирующим человеческий Ск с помощью ПЦР. Полученный продукт ПЦР подвергали электрофорезу в 1,5% агарозном геле. Полосы, содержащие ДНК, вырезали и очищали с использованием набора для очистки продуктов ПЦР (GeneAll®). Оба конца очищенной ДНК расщепляли рестрикционным ферментом *Bst*XI (New England Biolabs) и субклонировали в сайты *Bst*XI вектора pKRIBB-full GIII-Fd612. Полученная рекомбинантная фагида была названа pKRIBB-full GIII-Fab612. С этой целью антитело, содержащее мутации R16G, D54E, K76A и P88A в варибельной области тяжелой цепи и мутации I31S и V95P в варибельной области легкой цепи антитела Ab417, было названо антителом Ab612.

Пример 2. Создание библиотеки фагового дисплея Fab-фрагментов вариантов Ab612

[0314] Для улучшения аффинности и биофизических свойств антитела Ab612, полученного в примере 1, пять положений Ab612 LCDR3 рандомизировали с помощью TRIM (тринуклеотидный мутагенез, ELLA biotech, Германия). Был синтезирован фрагмент А, который содержит последовательность от FR1 до FR3 антитела Ab612. Был синтезирован фрагмент В (5'-TTT AAT TTC CAC TTT AGT TCC CTG CCC GAA CGT CCA CGG X17 X15 X15 X13 X15 TTG CTG ACA ATA ATA GGT GGC AAA ATC TTC-3'), который содержит последовательность антитела Ab612 от FR3 до FR4 с рандомизированным LCDR3. X обозначает номер аминокислоты; X17 - это 17-й номер аминокислоты X15 и X13 - 15-й и 13-й номера аминокислот соответственно. Фрагменты А и В собирали с помощью рекомбинантной ПЦР с ДНК-полимеразой Phusion High-Fidelity (Thermo Fisher Scientific). Полученные продукты ПЦР очищали с использованием набора для очистки продуктов ПЦР (GeneAll®), расщепляли рестриктазой *Bst*XI (New England Biolabs) и лигировали с *Bst*XI-расщепленным вектором экспрессии pKRIBB-full GIII-Fab612 с молярным соотношением вектора к вставке 1:3. ДНК подвергали электропорации в компетентную *E.coli* TG1. Библиотека Fab-фрагментов вариантов Ab612 дала $5,92 \times 10^8$ колоний.

[0315] Чтобы выделить моноклональные антитела, которые распознают L1CAM человека, в качестве антигена в первом, втором и третьем раундах пэннинга использовали L1CAM человека.

[0316] После трех раундов пэннинга 470 колоний отбирали случайным образом и отдельно инокулировали в 96-луночные планшеты, а затем культивировали в 300 мкл смеси $2 \times$ YТ/ карбенициллин/глюкоза в течение 8 часов при температуре 37 °С. Затем 30 мкл клеток высевали в каждую лунку, содержащую 1 мл среды $2 \times$ YТ/карбенициллин/глюкоза, и культивировали в течение 2 часов до достижения OD600 0,5. Клетки инфицировали вспомогательным фагом KM13 с показателем множественности заражения (МОИ) равным 20 без встряхивания при 37 °С в течение 30 мин, а затем инкубировали при встряхивании в течение 30 мин. Инфицированные клетки ресуспендировали в $2 \times$ YТ/карбенициллин/канамицин после центрифугирования при $2900 \times g$ в течение 10 минут и культивировали при 30 °С в течение 12 часов. Супернатант, содержащий Fab-фаги из 470 колоний, подвергали непрямому и количественному ИФА.

[0317] Среди них был отобран 41 клон, связывающийся с L1CAM человека с высокой активностью, и их плазмидные ДНК были выделены и секвенированы. В результате было обнаружено, что 32 клона отличались друг от друга.

[0318] Для анализа связывающей способности 32 уникальных клонов к L1CAM человека был проведен непрямой ИФА. В результате было обнаружено, что 4 клон демонстрируют наивысшую способность к связыванию антигена (т.е. Ab4H5, Ab2C2, Ab4H6 и Ab5D12).

Пример 3. Превращение Fab-фрагмента в IgG1 и его продукция

[0319] Чтобы преобразовать Fab-фрагмент в цельный IgG1 с кодон-оптимизированной последовательностью для клеток млекопитающих, вариабельные области тяжелой и легкой цепей с лидерными последовательностями амплифицировали с помощью ПЦР и субклонировали в сайты EcoRI и ApaI (New England Biolabs) и сайты BsiWI и HindIII (New England Biolabs), соответственно, в плазмидный вектор экспрессии IgG1 млекопитающих pdCMV-dhfr-Ab612. Клетки HEK293F культивировали и трансфицировали плазмидой экспрессии IgG1 с использованием ExpiFectamin (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с протоколами ExpiCHO. Через 7-14 дней после трансфекции супернатанты культур клеток центрифугировали и фильтровали, используя фильтр для бутылки (0,22 мкм PES, Sartorius), и продуцируемость соответствующего мутанта сравнивали с продуцируемостью существующего антитела Ab417 с помощью ИФА, как описано ниже в примере. 5.

[0320] Как показано в таблице 8, варианты антитела показали продуцируемость, которая в 1,25–1,44 раза выше, чем у Ab417. Продуктивность Ab612 была увеличена в 1,44 раза, тогда как продуцируемость Ab4H5, Ab2C2, Ab4H6 и Ab5D12 была увеличена в 1,25 раза, 1,26 раза, 1,36 раза и 1,26 раза, соответственно.

Таблица 8. Продуцируемость антител Ab612, Ab4H5, Ab2C2, Ab4H6 и Ab5D12 по сравнению с Ab417

Антитело	Продуцируемость (мг/л)
к L1CAM («Ab417»)	52
к L1CAM («Ab612»)	75
к L1CAM («Ab4H5»)	65
к L1CAM («Ab2C2»)	66
к L1CAM («Ab4H6»)	71
к L1CAM («Ab5D12»)	66

Пример 4. Очищение вариантов антител Ab417.

[0321] Плазмидные ДНК векторов экспрессии этих антител были получены в большом количестве и экспрессированы в клетках ExpiCHO таким же образом, как в примерах 1-3 соответственно. Культуры клеток центрифугировали для сбора супернатантов. Супернатанты фильтровали с использованием фильтра для бутылки (0,22 мкм PES, Sartorius) и очищали с помощью аффинной хроматографии. Соответствующие супернатанты наносили на колонку, заполненную гранулами, связанными с белком А (Amicogen), и антитела

элюировали из белка А, используя 0,1 М раствор натрий-лимонной кислоты (рН 3,2). Затем к элюированным антителам сразу же добавляли 1,0 М раствор Трис (рН 8,0) для нейтрализации. Очищенные IgG1 хранили в буфере (10 мМ Napi, 5% сорбитол, 0,01% твин 20) после диализа с использованием колонки PD-10 с сефадексом G-25 (GE Healthcare). Концентрацию очищенных антител определяли с помощью Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Nanodrop 2000) используя молярный коэффициент экстинкции. Очищенные антитела подвергали электрофорезу в 10% ДСН-ПААГ и окрашиванию Кумасси для подтверждения того, что каждая из тяжелой и легкой цепей экспрессируется и собирается в единый IgG.

Пример 5. Определение характеристик вариантов антител Ab417.

[0322] Аффинность очищенных антител к L1 CAM человека измеряли с помощью конкурентного ИФА. L1CAM человека готовили с концентрацией 1×10^{-7} М и серийно разводили до 1×10^{-12} М с использованием 0,1% раствора буфера РВА (PBS, содержащего 0,1% БСА). Соответствующие антитела получали путем их разбавления в 0,1% буферном растворе РВА при определенных концентрациях в соответствии с их связывающей способностью. Разбавленные антигены и антитела реагировали друг с другом при одинаковом объемном соотношении при температуре 37 °С в течение 3 часов. 96-луночные планшеты (MaxiSorp, Nunc) покрывали очищенным L1 CAM человека, который был разбавлен в буферном растворе (15 мМ Na_2CO_3 , 34,84 мМ NaHCO_3 , рН 9,6) в концентрации 100 нг/лунку при температуре 4°С в течение ночи. На следующий день обезжиренное молоко (BD) Difco растворяли в 0,05% буферном растворе PBS-T с концентрацией 2% и добавляли 200 мкл в каждую лунку с последующей инкубацией в течение 1 часа при температуре 37 °С. Лунки дважды промывали 0,05% буферным раствором PBS-T. Затем добавляли 100 мкл реагента антиген/антитело, прореагировавшего в течение 3 часов, и оставляли реагировать в течение 1 часа при комнатной температуре. Лунки трижды промывали 0,05% буферным раствором PBS-T для удаления антител, не связанных с антигеном. HPR-конъюгированное козьё антитело к IgG (Fc) человека (invitrogen, 1/10000), которое специфически распознает Fc-область человеческого антитела, добавляли в качестве вторичного антитела и оставляли реагировать в течение 1 часа при температуре 37 °С. Лунки промывали 0,05% буферным раствором PBS-T четыре раза для удаления оставшихся вторичных антител. Для проверки аффинности по проявлению цвета в каждую лунку добавляли 100 мкл раствора (BD OptEIA, BD), содержащего ТМВ в качестве субстрата фермента HRP (который был ковалентно связан с вторичным антителом), и инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре. Наконец, в каждую лунку добавляли 50 мкл 2,5 М раствора HSO для остановки ферментативной реакции. После остановки реакции оптическую плотность измеряли при 450 нм (микропланшетный спектрофотометр VERSAmax, Molecular Devices). Результаты представлены в Таблице 9. Аффинность Ab417 к L1CAM человека составляла 5×10^{-10} М, аффинность Ab612 составляла $2,6 \times 10^{-10}$ М, аффинность мутанта Ab4H5 составляла 6×10^{-11} М, аффинность мутанта Ab2C2 составляла 5×10^{-11} М, аффинность мутанта Ab4H6 составляла 6×10^{-11} М, аффинность мутанта Ab5D12 составляла $1,2 \times 10^{-10}$ М. Варианты антитела Ab417 показали примерно в 2-10 раз более высокую аффинность связывания с L1CAM человека, чем антитело Ab417.

Таблица 9. Аффинность (К) антител Ab612, Ab4H5, Ab2C2, Ab4H6 и Ab5D12 к L1CAM человека по сравнению с Ab417

Антитело	Аффинность (К) М
----------	------------------

к L1CAM («Ab417»)	5×10^{-10}
к L1CAM («Ab612»)	$2,6 \times 10^{-10}$
к L1CAM («Ab4H5»)	6×10^{-11}
к L1CAM («Ab2C2»)	5×10^{-11}
к L1CAM («Ab4H6»)	6×10^{-11}
к L1CAM («Ab5D12»)	$1,2 \times 10^{-10}$

Пример 6. Анализ антигенсвязывающей специфичности вариантов Ab417.

[0323] Чтобы изучить, связываются ли варианты антител избирательно с L1CAM человека и мыши, была проведена проточная цитометрия с использованием различных типов клеток. В связи с этим в качестве сравнительного антитела использовали антитело Ab417, которое связывается с L1CAM человека и L1CAM мыши.

[0324] Клетки CHO-DG44 (ATCC № PTA-3356), которые, как известно, не экспрессируют L1CAM человека, культивировали и использовали в качестве отрицательного контроля. Также культивировали клетки, экспрессирующие человеческий L1CAM, карциномы яичников человека, SKOV3 (ATCC № HTB-77) и немелкоклеточной карциномы легкого человека, NCI-H522 (AYCC № CRL-5810). В качестве клеток, экспрессирующих L1CAM мыши, культивировали линию клеток меланомы B16F1 (ATCC № CRL-6323). Культивированные клетки собирали с использованием буфера для диссоциации или 0,05% трипсина (GIBCO) для клеток CHO-DG44, ресуспендировали в 1% растворе PBA и помещали на лед на 20 минут. Затем клетки добавляли в пробирку из полистирола с круглым дном (Falcon) с плотностью 4×10^5 клеток на пробирку. Очищенные антитела разводили в растворе PBA в концентрации 10 мкг/мл, добавляли по 100 мкл в каждую пробирку и хорошо перемешивали. Пробирки помещали на 1 час при температуре 4°C. Вторичное антитело, которое специфически связывается с Fc-областью человеческого IgG и ковалентно связано с FITC (Sigma), добавляли в каждую пробирку в соотношении 1:2000. Планшет оборачивали фольгой, чтобы предотвратить попадание света, и оставляли реагировать в течение 1 часа при температуре 4°C. Для оценки жизнеспособности клеток добавляли окрашивающий реагент PI (пропидий йодид, Sigma) в соотношении 1:200. После завершения всех реакций в клетках детектировались флуоресцентные сигналы FITC и PI. Фиг. 1A показывает, что варианты антител не связываются с L1CAM-отрицательными клетками (то есть с CHO-DG44). Фиг. 1B-1D показывают, что варианты антител связываются с L1CAM-положительными клетками человека, NCI-H522 (фиг. 1B), SKOV3 (фиг. 1C), и L1CAM-положительными клетками мыши, B16F1 (фиг. 1D). Варианты антител специфически связываются с линией клеток меланомы мыши B166F1, что позволяет предположить, что варианты Ab417 по данному изобретению специфически связываются как с человеческим, так и с мышинным L1CAM.

Пример 7. Измерение качества очищенных вариантов Ab417 с помощью SEC-HPLC.

[0325] Растворители UPLC степени чистоты для ВЭЖХ и PBS были приобретены у Fisher Scientific (Фейр-Лон, Нью-Джерси, США) и GIBCO (Сент-Луис, Миссури, США), соответственно. Эксклюзионную хроматографию использовали для разделения образцов антител с помощью колонки Biosuit High Resolution SEC (7,5 × 300 мм, размер частиц 250 Å). Образцы разделяли с использованием PBS pH 7,4 в изократическом потоке. В экспериментах использовали модуль разделения Waters® e2695, а детектор 2489 UV/Vis контролировал оптическую плотность при 280 нм. Анализ методом эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (SEC-HPLC) показал, что варианты антител демонстрируют мономерный пик (фиг. 2B-2F), даже если Ab417 имеет агрегаты с высокой молекулярной массой и низкомолекулярные фрагменты с широким пиком (фиг. 2A).

Пример 8. Анализ аффинности вариантов Ab417 к L1CAM человека.

[0326] Аффинность вариантов Ab417 и Ab417 к L1CAM человека исследовали с помощью BLI с использованием Octet RED384 (ForteBio). Для анализа аффинности антитела разбавляли раствором PBA, приготовленным путем добавления 0,1% БСА к PBS. L1CAM человека был серийно разбавлен PBA в концентрации 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,5625, 0,78125 или 0 нМ, затем 200 мкл разведенного L1CAM добавляли в непрозрачный 96-луночный планшет для предотвращения пропускания света. Сенсорный чип АНС (антитело к Fc IgG человека) был использован для анализа кинетики связывания антител с антигенами путем изучения изменений показателя преломления, которые возникают при ассоциации и диссоциации антитела и антигена при переносе сенсорного чипа в раствор PBA, раствор антитела, раствор PBA, раствор антигена и раствор PBA в указанном порядке.

[0327] Таблица 10 показывает, что аффинность (K_D) антитела Ab417 к L1CAM человека составляла примерно 0,2 нМ, аффинность антитела Ab612 составляла 0,1 нМ, аффинность антитела Ab4H5 составляла 8 пМ, аффинность антитела Ab2C2H была вне допустимого диапазона, аффинность антитела Ab4H6 составляла 0,07 нМ, а аффинность антитела Ab5D12 составляла 0,09 нМ. Повышенная аффинность вариантов по сравнению с Ab417 (например, до 25 раз) была связана с более низкой скоростью диссоциации.

Таблица 10. Аффинность (K_D) антител Ab612, Ab4H5, Ab2C2, Ab4H6 и Ab5D12 к L1CAM человека по сравнению с Ab417

Antigen	Antibody	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	Full X^2	Full R^2
hL1-s1	Ab417	2.63E-10	3.59E+05	9.45E-05	0.2376	0.9936
	Ab612	1.05E-10	3.13E+05	3.28E-05	0.1235	0.997
	Ab4H5	8.22E-12	3.63E+05	2.98E-06	0.2097	0.9956
	Ab2C2	<1.0E-12	3.44E+05	<1.0E-07	0.3084	0.9933
	Ab4H6	7.41E-11	3.73E+05	2.77E-05	0.2228	0.9943
	Ab5D12	9.60E-11	4.11E+05	3.94E-05	0.2524	0.9936

Пример 9. Анализ изоэлектрической точки (PI) вариантов Ab417.

[0328] Прибор Sciex PA800 plus с капилляром с нейтральным покрытием (Sciex PN 477441) использовали для проведения капиллярного изоэлектрического фокусирования (сIEF) Ab417 и его мутантов. Все эксперименты проводили трижды. Значения PI соответствующих материалов определяли с использованием программного обеспечения 32 Karat. Таблица 11 показывает, что значение pI для антитела Ab417 составляло 9,62, значение pI для Ab612 составляло 9,25, значение pI для Ab4H5 составляло 8,96, значение pI для Ab2C2 составляло 8,96, значение pI для Ab4H6 составляло 9,03 и значение pI для Ab5D12 составляло 9,04.

Таблица 11. Значение PI Ab612, Ab4H5, Ab2C2, Ab4H6 и Ab5D12 по сравнению с Ab417

Антитело	Значение PI
κ L1CAM («Ab417»)	9,62
κ L1CAM («Ab612»)	9,25
κ L1CAM («Ab4H5»)	8,96
κ L1CAM («Ab2C2»)	8,96
κ L1CAM («Ab4H6»)	9,03
κ L1CAM («Ab5D12»)	9,04

Пример 10. Анализ эффекта ингибирования роста опухоли вариантов Ab417.

[0329] Для исследования противоопухолевого эффект антитела Ab612 самцам голых мышей Balb/c трансплантировали клеточную линию холангиокарциномы человеческого происхождения Choi-CK. Сконструированную опухолевую ткань Choi-CK (3 x 3 x 3 мм³) инокулировали в спину мышей. После того, как объем опухоли достиг 100 мм³ (n = 8 на группу), антитело Ab417 в дозе 10 мг/кг, антитело Ab612 в дозе 10 мг/кг, контрольное антитело hFc в дозе 3,3 мг/кг и отрицательный контроль (PBS) или (носитель) вводили внутривенно три раза в неделю в течение 3 недель. Объем опухоли, масса тела мышей и масса опухоли были измерены и показаны на фиг. 1A-1C соответственно.

[0330] Фиг. 3A и 3C показывают, что группы, получавшие Ab612, показали средний объем опухоли 311 мм³ и вес опухоли 0,20 г, тогда как группы, получавшие Ab417, показали средний объем опухоли 387 мм³ и вес опухоли 0,41 г. У контрольных мышей, получавших имитацию, средний объем опухоли составлял 1096 мм³, а вес опухоли составлял 0,93 г. Результат показывает, что Ab612 (78,2% коэффициент ингибирования роста опухоли (IR)) проявлял в 1,4 раза более высокое ингибирование роста опухоли по сравнению с Ab417 (55,5% IR), исходя из веса опухоли (фиг. 3C). Фиг. 3D показывает изображения опухолей каждой группы из восьми мышей, умерщвленных после окончания эксперимента, как описано на фиг. 3A-3C. Размер раковых тканей, выделенных у восьми мышей, получавших антитело Ab612, меньше, чем у мышей, получавших антитело Ab417. Противоопухолевый эффект антитела Ab612, по-видимому, хорошо проявляется *in vivo*, приводя к улучшению микроокружения опухоли (TME) за счет проникновения антител в раковые ткани или среду нападения на основе иммунных клеток.

[0331] Следовательно, группа, обработанная антителом Ab612, описанным в данном документе, показала значительный ингибирующий эффект на рост опухоли по сравнению с группой, которой вводили отрицательный контроль. Кроме того, во время введения антитела у мышей не наблюдали потери веса тела и токсичности.

[0332] Вышеизложенное описание конкретных аспектов полностью отражает общий характер изобретения, который другие могут, применяя знания в пределах уровня техники, легко модифицировать и/или адаптировать для различных применений подобных конкретных аспектов, без излишнего экспериментирования, не отступая от общей концепции данного изобретения. Следовательно, такие адаптации и модификации предназначены для того, чтобы быть в пределах значения и диапазона эквивалентов раскрытых аспектов на основе представленных в данном документе инструкций и указаний. Следует понимать, что формулировки или терминология в данном документе предназначены для описания, а не ограничения, так что терминология или формулировки данного описания должна интерпретироваться квалифицированным специалистом в свете инструкций и указаний.

[0333] Другие аспекты реализации изобретения станут очевидны для специалистов в данной области техники после рассмотрения описания изобретения и при практической реализации описанного в данном документе изобретения. Подразумевается, что описание изобретения и примеры являются исключительно иллюстративными, а фактические объем и сущность изобретения определены нижеприведенной формулой изобретения.

[0334] Все публикации, патенты и патентные заявки, описанные в данном документе, включены посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент были специально и индивидуально указаны для включения посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с тем же эпитопом молекулы адгезии клеток L1 (L1CAM), что и эталонное антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), причем:

(a) VH эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 23, а VL эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 24,

(b) VH эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 25, а VL эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 26,

(c) VH эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 27, а VL эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 28,

(d) VH эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 29, а VL эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 30, или

(e) VH эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 31, а VL эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 32.

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, отличающееся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющую комплементарность область 1 (CDR1) VH, CDR2 VH и CDR3 VH, и CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, причем по меньшей мере одна аминокислота в CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и/или CDR3 VL антитела или его антигенсвязывающего фрагмента отличается от CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и/или CDR3 VL антитела mAb417, причем

CDR1 VH антитела mAb417 содержит RFGMH (SEQ ID NO: 2);

CDR2 VH антитела mAb417 содержит FISNDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 9);

CDR3 VH антитела mAb417 содержит GRAYGSGSLFDP (SEQ ID NO: 10);

CDR1 VL антитела mAb417 содержит RASRTISIVN (SEQ ID NO: 6);

CDR2 VL антитела mAb417 содержит AASNLHS (SEQ ID NO: 7); и

CDR3 VL антитела mAb417 содержит QQSIGRGGVVT (SEQ ID NO: 11).

3. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое перекрестно конкурирует за связывание с эпитопом молекулы адгезии клеток L1 (L1CAM) с эталонным антителом, содержащее переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), причем:

(a) VH эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 23, а VL эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 24,

(b) VH эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 25, а VL эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 26,

(c) VH эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 27, а VL эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 28,

(d) VH эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 29, а VL эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 30, или

(e) VH эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 31, а VL эталонного антитела содержит SEQ ID NO: 32,

отличающееся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющую комплементарность область 1 (CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, и CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, причем по меньшей мере одна аминокислота в CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и/или CDR3 VL антитела или его антигенсвязывающего фрагмента отличается от CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и/или CDR3 VL антитела mAb417, причем

CDR1 VH антитела mAb417 содержит RFGMH (SEQ ID NO: 2);

CDR2 VH антитела mAb417 содержит FISNDGSKNYADSVKG (SEQ ID NO: 9);

CDR3 VH антитела mAb417 содержит GRAYGSGSLFDP (SEQ ID NO: 10);

CDR1 VL антитела mAb417 содержит RASRTISIVN (SEQ ID NO: 6);

CDR2 VL антитела mAb417 содержит AASNLHS (SEQ ID NO: 7); и

CDR3 VH антитела mAb417 содержит QQSIGRQVVT (SEQ ID NO: 11).

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 2 или 3, отличающееся тем, что по меньшей мере одно аминокислотное различие находится в CDR2 VH антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и при этом CDR2 VH антитела или антигенсвязывающего фрагмента содержит глутамин в 5 остатке.

5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 2-4, отличающееся тем, что по меньшей мере одно аминокислотное различие находится в CDR1 VL антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и при этом CDR1 VL антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит серин в 8 остатке.

6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 2-5, отличающееся тем, что по меньшей мере одно аминокислотное различие находится в CDR3 VL антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и при этом CDR3 VL антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит пролин в 8 остатке.

7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 2-6, отличающееся тем, что по меньшей мере одно аминокислотное различие находится в CDR3 VL антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и при этом CDR3 VL антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит аланин, глицин, фенилаланин, тирозин, треонин, пролин и триптофан в остатках с 3 по 9, соответственно.

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 2-7, отличающееся тем, что по меньшей мере одно аминокислотное различие находится в CDR3 VL антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и при этом CDR3 VL антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит аланин, глицин, фенилаланин, тирозин, серин, пролин и триптофан в остатках с 3 по 9, соответственно.

9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 2-8, отличающееся тем, что по меньшей мере одно аминокислотное различие находится в CDR3 VL антитела или его антигенсвязывающего

фрагмента, и при этом CDR3 VL антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит лейцин, гистидин, фенилаланин, тирозин, пролин и триптофан в остатках с 4 по 9, соответственно.

10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 2-9, отличающееся тем, что по меньшей мере одно аминокислотное различие находится в CDR3 VL антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и при этом CDR3 VL антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит лейцин, валин, триптофан, тирозин, пролин и триптофан в остатках с 4 по 9, соответственно.

11. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 2-10, отличающееся тем, что CDR3 VL антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ. ID NO: 19 или SEQ ID NO: 21.

12. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 2-11, отличающееся тем, что CDR1 VH антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит RFGMH (SEQ ID NO: 2).

13. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 2-12, отличающееся тем, что CDR2 VH антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит FISNEGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 10).

14. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 2-13, отличающееся тем, что CDR3 VH антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит GRAYGSGSLFDP (SEQ ID NO: 4).

15. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 2-14, отличающееся тем, что CDR1 VL содержит RASRTISSYVN (SEQ ID NO: 12).

16. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 2-15, отличающееся тем, что CDR2 VL содержит AASNLHS (SEQ ID NO: 7).

17. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 2-16, отличающееся тем, что CDR3 VL содержит QQSIGRGPVT SEQ ID NO: 13.

18. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-17, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, причем CDR3 легкой цепи содержит QQSIGRGPVT (SEQ ID NO: 13).

19. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-17, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, причем CDR3 легкой цепи содержит QQAGFYTPWT (SEQ ID NO: 15).

20. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-17, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, причем CDR3 легкой цепи содержит QQAGFYSPWT (SEQ ID NO: 17).

21. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-17, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, причем CDR3 легкой цепи содержит QQSLHFYPWT (SEQ ID NO: 19).

22. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-17, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, причем CDR3 легкой цепи содержит QQSLVWYPWT (SEQ ID NO: 21).

23. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-22, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет одну или более характеристик, выбранную из группы, состоящей из:

- (a) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрирует повышенную продуцируемость;
- (b) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрирует повышенную аффинность при измерении с помощью константы равновесной диссоциации (K_D);
- (c) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрирует повышенное значение PI ,
- (d) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрирует повышенную аффинность при измерении с помощью константы ассоциации (K); или
- (e) любой их комбинации.

24. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-23, отличающееся тем, что указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрирует повышенную продуцируемость по сравнению с антителом mAb417.

25. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 24, отличающееся тем, что улучшенная продуцируемость составляет по меньшей мере 55 мг/л, по меньшей мере 56 мг/л, по меньшей мере 57 мг/л, по меньшей мере, 58 мг/л, по меньшей мере 59 мг/л, по меньшей мере примерно 60 мг/л, по меньшей мере примерно 61 мг/л, по меньшей мере примерно 62 мг/л, по меньшей мере примерно 63 мг/л, по меньшей мере примерно 64 мг/л, по меньшей мере примерно 65 мг/л, по меньшей мере примерно 66 мг/л, по меньшей мере примерно 67 мг/л, по меньшей мере примерно 68 мг/л, по меньшей мере примерно 69 мг/л, по меньшей мере примерно 70 мг/л, по меньшей мере примерно 71 мг/л, по меньшей мере примерно 72 мг/л, по меньшей мере примерно 73 мг/л, по меньшей мере примерно 74 мг/л, по меньшей мере примерно 75 мг/л, по меньшей мере примерно 76 мг/л, по меньшей мере примерно 77 мг/л, по меньшей мере примерно 78 мг/л, по меньшей мере примерно 79 мг/л, по меньшей мере примерно 80 мг/л, по меньшей мере примерно 81 мг/л, по меньшей мере примерно 82 мг/л, по меньшей мере примерно 83 мг/л, по меньшей мере примерно 84 мг/л или по меньшей мере примерно 85 мг/л при экспрессии в соответствии с примером 3.

26. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-25, отличающееся тем, что указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрирует повышенную K_D по сравнению с антителом mAb417.

27. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 26, отличающееся тем, что повышенная K_D составляет менее $2,6 \times 10^{-10}$ М, менее $2,5 \times 10^{-10}$ М, менее $2,0 \times 10^{-10}$ М, менее $1,5 \times 10^{-10}$ М, менее $1,0 \times 10^{-10}$ М, менее 9×10^{-11} М, менее 8×10^{-11} М, менее 7×10^{-11} М, менее 6×10^{-11} М, менее 5×10^{-11} М, менее 4×10^{-11} М, менее 3×10^{-11} М, менее 2×10^{-11} М, менее 1×10^{-11} М, менее 9×10^{-12} М, менее 8×10^{-12} М, менее 7×10^{-12} М, менее 6×10^{-12} М, менее 5×10^{-12} М, менее 4×10^{-12} М, менее 3×10^{-12} М, менее 2×10^{-12} М, менее 1×10^{-12} М, менее 9×10^{-13} М или менее 8×10^{-13} М.

28. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-27, отличающееся тем, что указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрирует повышенную аффинность (K) по сравнению с антителом mAb417.

29. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 28, отличающееся тем, что повышенная аффинность (K) составляет менее 5×10^{-10} М, менее 4×10^{-10} М, менее 3×10^{-10} М, менее 2×10^{-10} М, менее $1,0 \times 10^{-10}$ М, менее 9×10^{-11} М, менее 8×10^{-11} М, менее 7×10^{-11} М, менее 6×10^{-11} М, менее 5×10^{-11} М, менее 4×10^{-11} М, менее 3×10^{-11} М, менее 2×10^{-11} М, менее 1×10^{-11} М, менее 9×10^{-12} М, менее 8×10^{-12} М, менее 7×10^{-12} М, менее 6×10^{-12} М, менее 5×10^{-12} М, менее 4×10^{-12} М, менее 3×10^{-12} М, менее 2×10^{-12} М, менее 1×10^{-12} М, менее 9×10^{-13} М или менее 8×10^{-13} М.

30. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-29, отличающееся тем, что указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрирует повышенное значение PI по сравнению с антителом mAb417.

31. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 30, отличающееся тем, что повышенное значение PI составляет менее 9,6, менее 9,5, менее 9,4, менее 9,3, менее 9,2, меньше 9,1, меньше 9,0, меньше 8,9, меньше 8,8, меньше 8,7, меньше 8,6, меньше 8,5, меньше 8,4, меньше 8,3, меньше 8,2, меньше 8,1, меньше 8,0, менее 7,9, менее 7,8, менее 7,7 или менее 7,6.

32. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающееся с L1CAM, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1, CDR2 и CDR3 VH и CDR1, CDR2 и CDR3 VL;

при этом CDR1, CDR2 и CDR3 VH содержат RFGMH (SEQ ID NO: 2), FISNEGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 10) и GRAYGSGSLFDP (SEQ ID NO: 4), соответственно; и

причем CDR1, CDR2 и CDR3 VL содержат RASRTISSYVN (SEQ ID NO: 12), AASNLHS (SEQ ID NO: 7) и QQSIGRGPVT (SEQ ID NO: 13), соответственно.

33. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающееся с L1CAM, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1, CDR2, CDR3 VH и CDR1, CDR2, CDR3 VL;

при этом CDR1, CDR2 и CDR3 VH содержат RFGMH (SEQ ID NO: 2), FISNEGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 10) и GRAYGSGSLFDP (SEQ ID NO: 4) соответственно; и

при этом CDR1, CDR2 и CDR3 VL содержат RASRTISSYVN (SEQ ID NO: 12), AASNLHS (SEQ ID NO: 7) и QQAGFYSPWT (SEQ ID NO: 17), соответственно.

34. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающееся с L1CAM, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1, CDR2, CDR3 VH и CDR1, CDR2, CDR3 VL;

при этом CDR1, CDR2 и CDR3 VH содержат RFGMH (SEQ ID NO: 2), FISNEGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 10) и GRAYGSGSLFDP (SEQ ID NO: 4), соответственно; и

при этом CDR1, CDR2 и CDR3 VL содержат RASRTISSYVN (SEQ ID NO: 12), AASNLHS (SEQ ID NO: 7) и QQAGFYTPWT (SEQ ID NO: 17), соответственно.

35. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающееся с L1CAM, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1, CDR2, CDR3 VH и CDR1, CDR2, CDR3 VL;

при этом CDR1, CDR2 и CDR3 VH содержат RFGMH (SEQ ID NO: 2), FISNEGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 10) и GRAYGSGSLFDP (SEQ ID NO: 4), соответственно; и

при этом CDR1, CDR2 и CDR3 VL содержат RASRTISSYVN (SEQ ID NO: 12), AASNLHS (SEQ ID NO: 7) и QQSLHFYPWT (SEQ ID NO: 19), соответственно.

36. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающееся с L1CAM, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1, CDR2, CDR3 VH и CDR1, CDR2, CDR3 VL;

при этом CDR1, CDR2 и CDR3 VH содержат RFGMH (SEQ ID NO: 2), FISNEGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 10) и GRAYGSGSLFDP (SEQ ID NO: 4), соответственно; и

при этом CDR1, CDR2 и CDR3 VL содержат RASRTISSYVN (SEQ ID NO: 12), AASNLHS (SEQ ID NO: 7) и QQSLVWYPWT (SEQ ID NO: 19), соответственно.

37. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-36, отличающееся тем, что VH содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере примерно 80%, на по меньшей мере примерно 85%, на по меньшей мере примерно 90%, на по меньшей мере примерно 95%, на по меньшей мере примерно 96%, на по меньшей мере примерно 97%, на по меньшей мере примерно 98%, на по меньшей мере примерно 99% или примерно на 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной как EVQLVESGGG

WQPGGSLRLSCAASGFTFSRFGMHWVRQAPGKGLEWVAFISNEGSNKYYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARGRAYGSGSLFDPWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 23).

38. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-37, отличающееся тем, что VL содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере примерно 80%, на по меньшей мере примерно 85%, на по меньшей мере примерно 90%, на по меньшей мере примерно 95%, на по меньшей мере примерно 96%, на по меньшей мере примерно 97%, на по меньшей мере примерно 98%, на по меньшей мере примерно 99% или примерно на 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной как DIQLTQSPSS

LSASVGDRVITTCRASRTISSYVNWYRQRPGKAPESLIYAASNLSHGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF
ATYYCQQSIGRGPVTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 24).

39. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-38, отличающееся тем, что VH содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере примерно 80%, на по меньшей мере примерно 85%, на по меньшей мере примерно 90%, на по меньшей мере примерно 95%, на по меньшей мере примерно 96%, на по меньшей мере примерно 97%, на по меньшей мере примерно 98%, на по меньшей мере примерно 99% или примерно на 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной как EVQLVESGGG

WQPGGSLRLSCAASGFTFSRFGMHWVRQAPGKGLEWVAFISNEGSNKYYADSVKGRFTISRDNLSANTLYL
QMNSLRAEDTAVYYCARGRAYGSGSLFDPWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 27).

40. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-39, отличающееся тем, что VL содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере примерно 80%, на по меньшей мере примерно 85%, на по меньшей мере примерно 90%, на по меньшей мере примерно 95%, на по меньшей мере примерно 96%, на по меньшей мере примерно 97%, на по меньшей мере примерно 98%, на по меньшей мере примерно 99% или примерно на 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной как DIQLTQSPSS

LSASVGDRVITTCRASRTISSYVNWYRQRPGKAPESLIYAASNLSHGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF
ATYYCQQAGFYSPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 28).

41. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-40, отличающееся тем, что VH содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере примерно 80%, на по меньшей мере примерно 85%, на по меньшей мере примерно 90%, на по меньшей мере примерно 95%, на по меньшей мере примерно 96%, на по меньшей мере примерно 97%, на по меньшей мере примерно 98%, на по меньшей мере примерно 99% или примерно на 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной как EVQLVESGGG

WQPGGSLRLSCAASGFTFSRFGMHWVRQAPGKGLEWVAFISNEGSNKYYADSVKGRFTISRDNLSANTLYL
QMNSLRAEDTAVYYCARGRAYGSGSLFDPWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 25).

42. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-41, отличающееся тем, что VL содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере примерно 80%, на по меньшей мере примерно 85%, на по меньшей мере примерно 90%, на по меньшей мере примерно 95%, на по меньшей мере примерно 96%, на по меньшей мере примерно 97%, на по меньшей мере примерно 98%, на по меньшей мере

мере примерно 99% или примерно на 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной как DIQLTQSPSS

LSASVGDRVTITCRASRTISSYVNWYRQRPGKAPESLIYAASNLSHGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF
ATYYCQQAGFYTPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 26).

43. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-42, отличающееся тем, что VH содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере примерно 80%, на по меньшей мере примерно 85%, на по меньшей мере примерно 90%, на по меньшей мере примерно 95%, на по меньшей мере примерно 96%, на по меньшей мере примерно 97%, на по меньшей мере примерно 98%, на по меньшей мере примерно 99% или примерно на 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной как EVQLVESGGG

WQPGGSLRLSCAASGFTFSRFGMHWVRQAPGKGLEWVAFISNEGSNKYYADSVKGRFTISRDNANTLYL
QMNSLRAEDTAVYYCARGRAYGSGSLFDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 29).

44. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-43, отличающееся тем, что VL содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере примерно 80%, на по меньшей мере примерно 85%, на по меньшей мере примерно 90%, на по меньшей мере примерно 95%, на по меньшей мере примерно 96%, на по меньшей мере примерно 97%, на по меньшей мере примерно 98%, на по меньшей мере примерно 99% или примерно на 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной как DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRTISSYVNWYRQRPGKAPESLIYAASNLSHGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCQQLHFYTPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 30).

45. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-44, отличающееся тем, что VH содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере примерно 80%, на по меньшей мере примерно 85%, на по меньшей мере примерно 90%, на по меньшей мере примерно 95%, на по меньшей мере примерно 96%, на по меньшей мере примерно 97%, на по меньшей мере примерно 98%, на по меньшей мере примерно 99% или примерно на 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной как

EVQLVESGGGWQPGGSLRLSCAASGFTFSRFGMHWVRQAPGKGLEWVAFISNEGSNKYYADSVKGRFTIS
RDNSANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRAYGSGSLFDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 31).

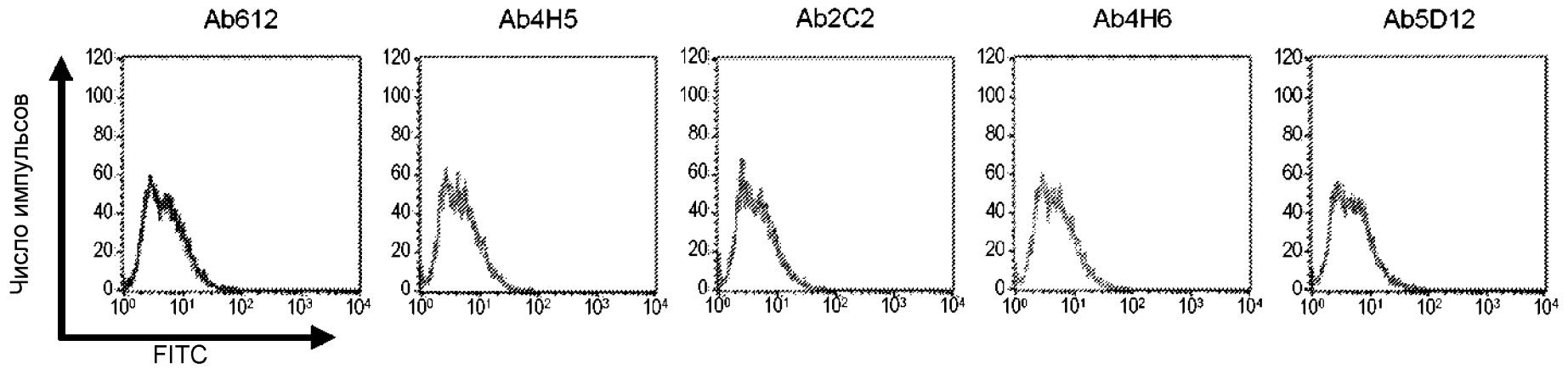
46. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-45, отличающееся тем, что VL содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере примерно 80%, на по меньшей мере примерно 85%, на по меньшей мере примерно 90%, на по меньшей мере примерно 95%, на по меньшей мере примерно 96%, на по меньшей мере примерно 97%, на по меньшей мере примерно 98%, на по меньшей мере примерно 99% или примерно на 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной как DIQLTQSPSS

LSASVGDRVTITCRASRTISSYVNWYRQRPGKAPESLIYAASNLSHGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF
ATYYCQQLVWYPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 32).

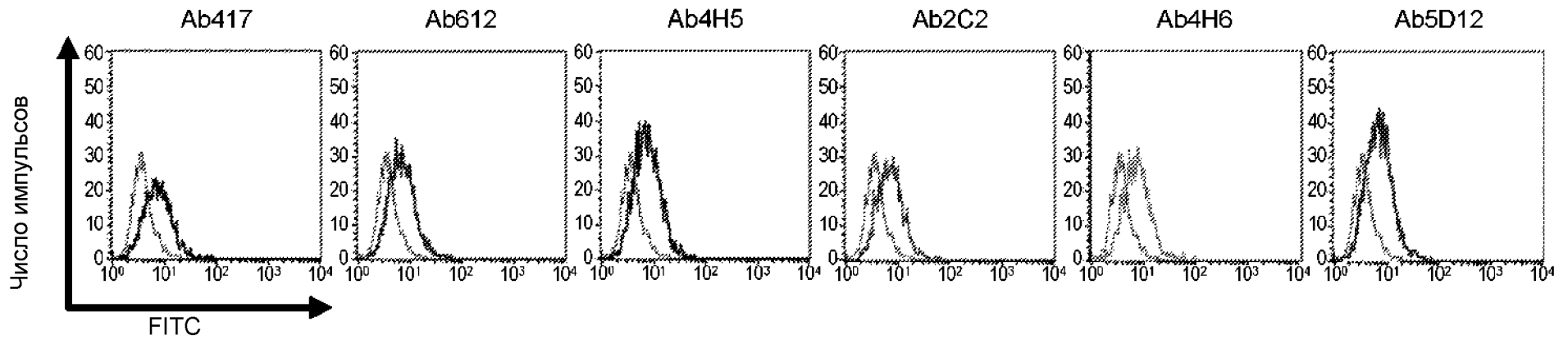
57. Антитело по любому из пп. 1-56, отличающееся тем, что антитело выбрано из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, его варианта и любой их комбинации.
58. Антитело по любому из пп. 1-57, которое представляет собой химерное антитело, человеческое антитело или гуманизированное антитело.
59. Антитело по любому из пп. 1-56, содержащее Fab, Fab', F(ab')₂, Fv или одноцепочечный Fv (scFv).
60. Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело по любому из пп. 1-59.
61. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 60.
62. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п. 61.
63. Клетка-хозяин по п. 63, которая выбрана из группы, состоящей из *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, дрожжей, CHO, YB/20, NS0, PER-C6, HEK-293T, NIH-3T3, HeLa, ВНК, Hep G2, SP2/0, R1.1, B-W, L-M, COS 1, COS 7, BSC1, BSC40, клеток ВМТ10, растительных клеток, клеток насекомых и клеток человека в культуре тканей.
64. Иммуноконъюгат, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-59, связанное с агентом.
65. Биспецифическое или мультиспецифическое антитело, содержащее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-59 и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с антигеном.
66. Композиция, содержащая антитело по любому из пп. 1-59, нуклеиновую кислоту по п. 60, вектор по п. 61, клетку по п. 62 или п. 63, иммуноконъюгат по п. 64 или биспецифическое или мультиспецифическое антитело по п. 65 и носитель.
67. Набор, содержащий антитело по любому из пп. 1-59, нуклеиновую кислоту по п. 60, вектор по п. 61, клетку по п. 62 или п. 63, иммуноконъюгат по п. 64 или биспецифическое или мультиспецифическое антитело по п. 65 и инструкцию по применению.
68. Иммунная клетка, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 60 или вектор по п. 61.
69. Иммунная клетка по п. 68, которая представляет собой Т-клетку или НК-клетку.

70. Иммуная клетка по п. 68 или п. 69, которая содержит химерный антигенный рецептор, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-59.
71. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывается с человеческим белком L1CAM, включающий культивирование клетки по п. 62 или п. 63 в подходящих условиях и выделение антитела.
72. Способ лечения заболевания или патологического состояния у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту антитела по любому из пп. 1-59, нуклеиновой кислоты по п. 60, вектора по п. 61, клетки по п. 62 или п. 63, иммуноконъюгата по п. 64, биспецифического или мультиспецифического антитела по п. 65, композиции по п. 66 или иммунной клетки по любому из пп. 68-70.
73. Способ по п. 72, отличающийся тем, что заболевание или патологическое состояние включает опухоль.
74. Способ по п. 72 или п. 73, отличающийся тем, что опухоль включает рак желчных протоков, меланому, рак поджелудочной железы, глиому, рак груди, лимфому, рак легких, рак почек, рак простаты, фибросаркому, аденокарциному толстой кишки, рак печени или рак яичников.
75. Способ по п. 74, отличающийся тем, что опухоль представляет собой рак желчных протоков.
76. Способ по любому из пп. 72-75, отличающийся тем, что антитело, нуклеиновая кислота, вектор, клетка, иммуноконъюгат, биспецифическое или мультиспецифическое антитело, композиция или иммунная клетка подавляют рост опухоли.
77. Способ по любому из пп. 72-76, отличающийся тем, что антитело, нуклеиновая кислота, вектор, клетка, иммуноконъюгат, композиция или иммунная клетка усиливают инфильтрацию иммунных клеток в опухоль.
78. Способ по любому из пп. 72-77, включающий введение дополнительного терапевтического агента.
79. Способ по п. 78, отличающийся тем, что дополнительный терапевтический агент включает химиотерапию, иммунотерапию, лучевую терапию или их комбинации.
80. Способ по п. 79, отличающийся тем, что дополнительный терапевтический агент представляет собой ингибитор контрольных точек иммунного ответа.

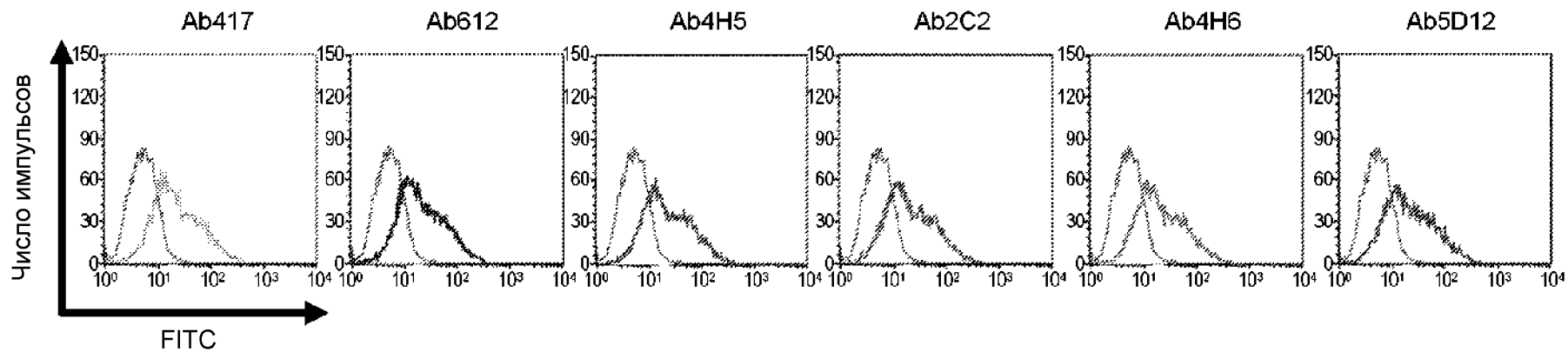
ФИГ. 1А CHO-DG44



ФИГ. 1В NCI-H522

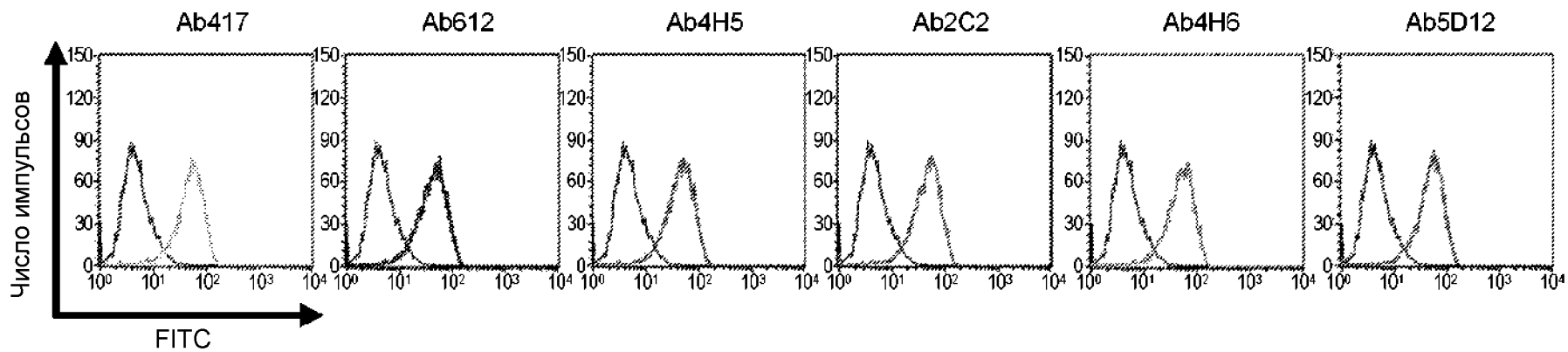


ФИГ. 1C SKOV3

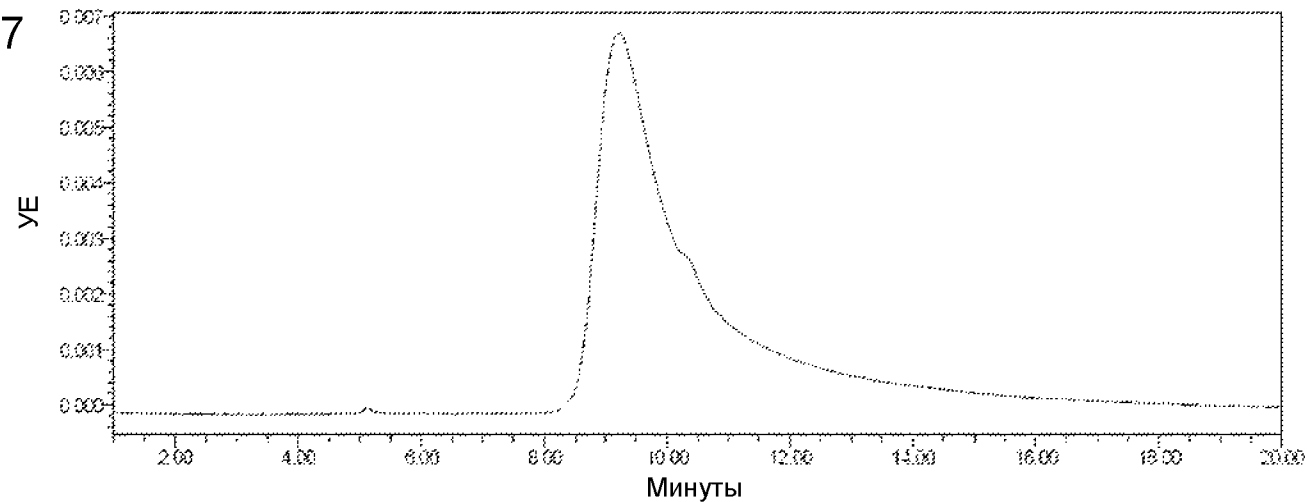


ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ (ПРАВИЛО 26)

ФИГ. 1D B16F1

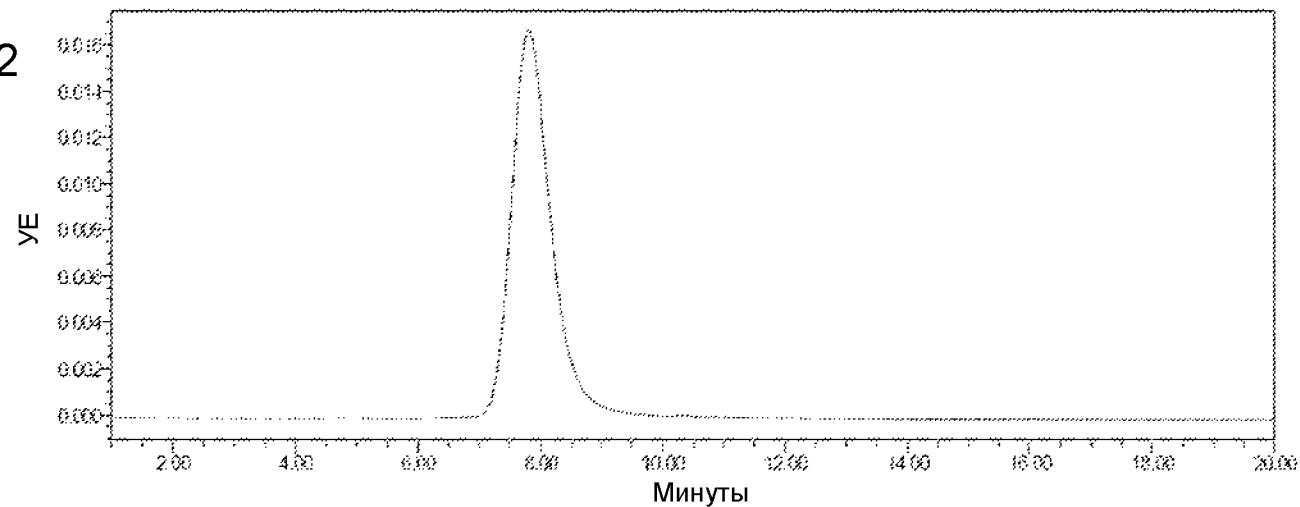


ФИГ. 2А Ab417



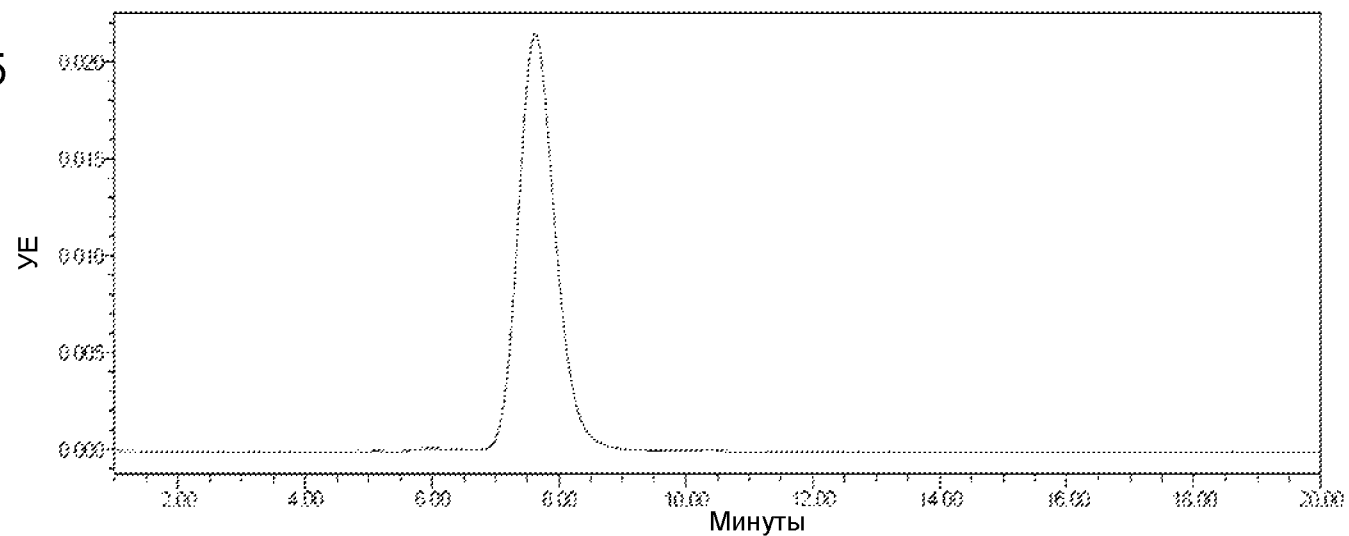
Название пика	КТ	Площадь	% площади	Высота
Пик 1	9.216	642894	100.00	6508

ФИГ. 2В Ab612



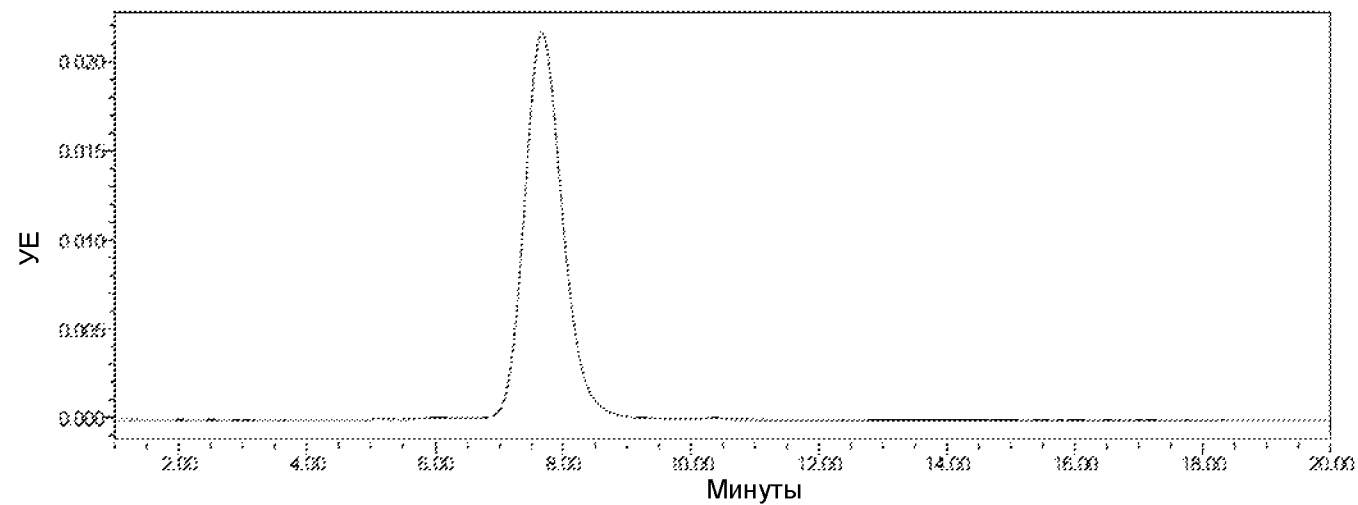
Название пика	КТ	Площадь	% площади	Высота
Пик 1	7.803	662476	100.00	16121

ФИГ. 2С Ab4H5



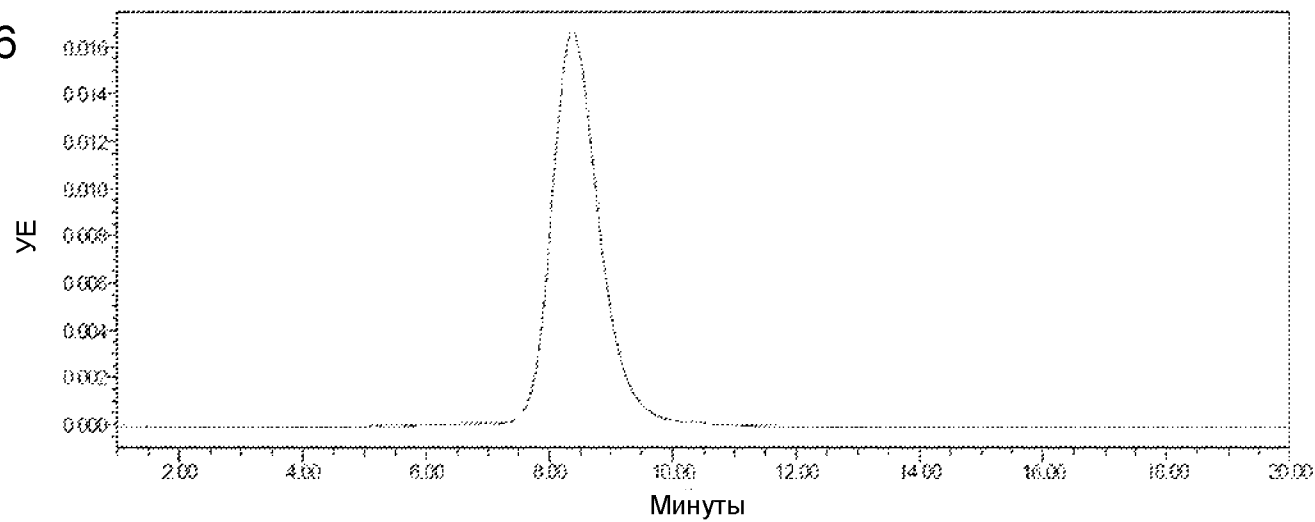
Название пика	КТ	Площадь	% площади	Высота
Пик 1	7.621	819321	100.00	21125

ФИГ. 2D Ab2C2



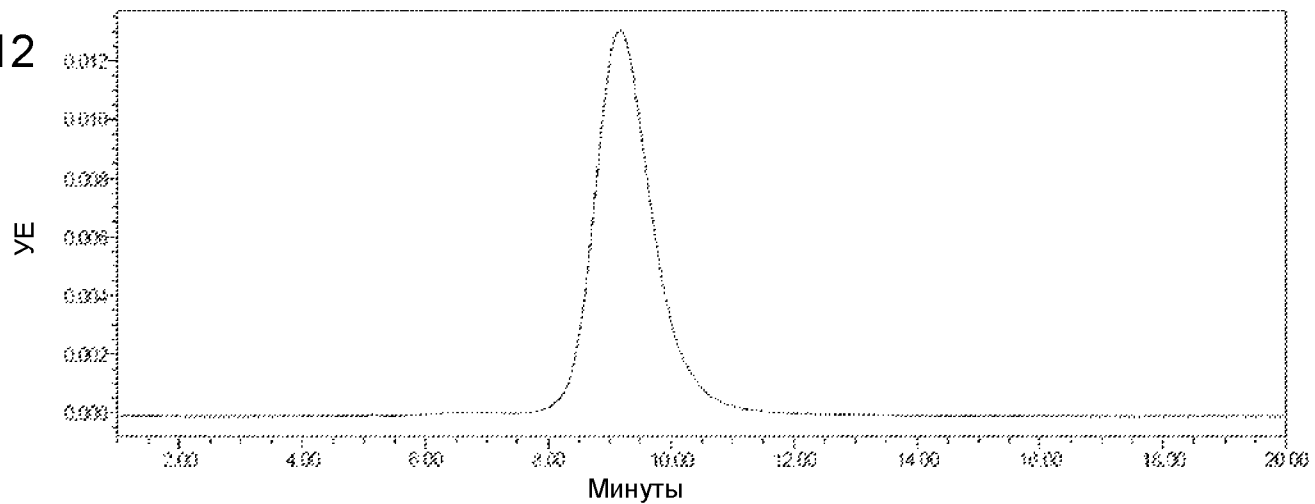
Название пика	КТ	Площадь	% площади	Высота
Пик 1	7.667	839178	100.00	21262

ФИГ. 2E Ab4H6

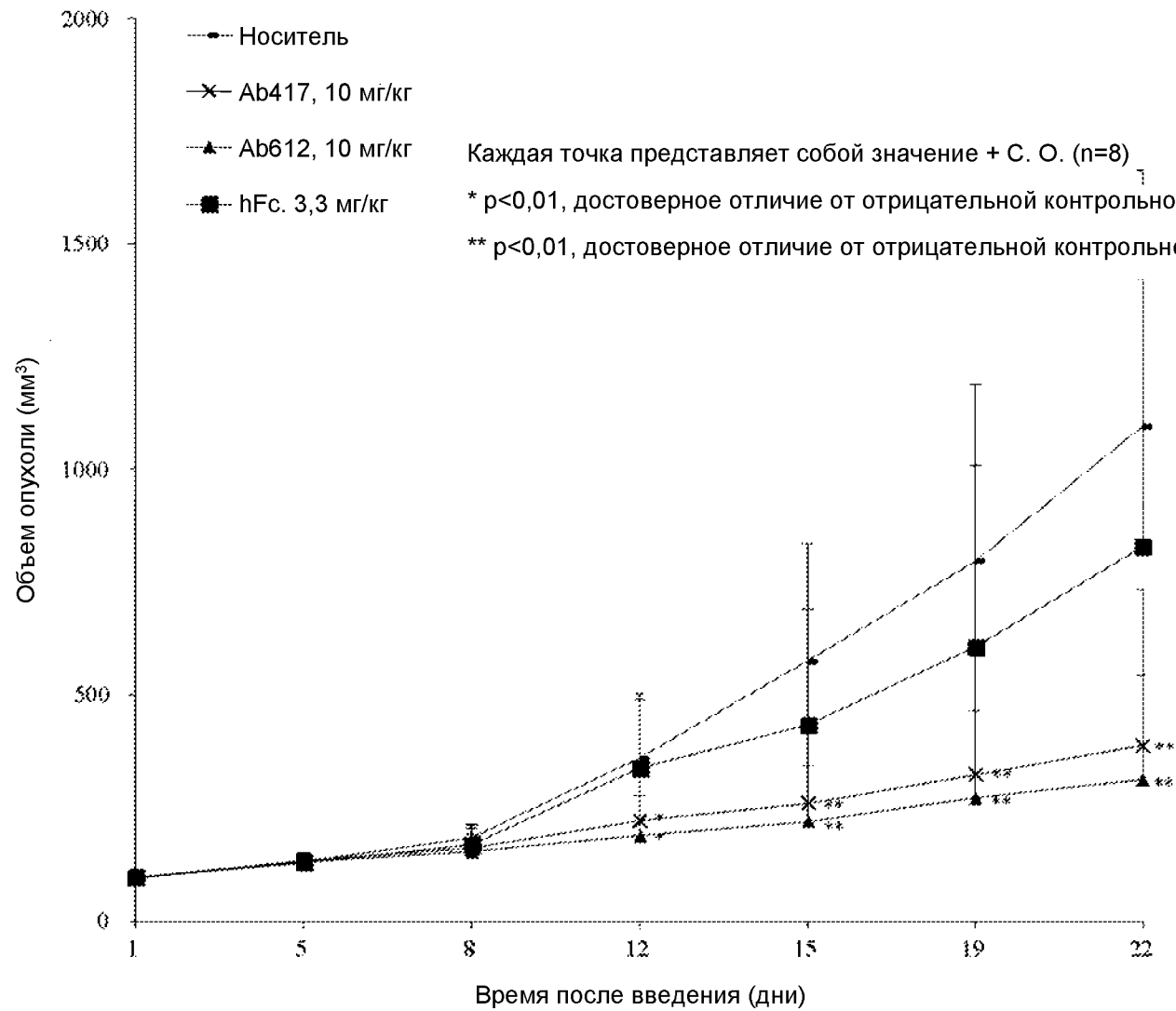


Название пика	КТ	Площадь	% площади	Высота
Пик 1	8.381	785126	100.00	15910

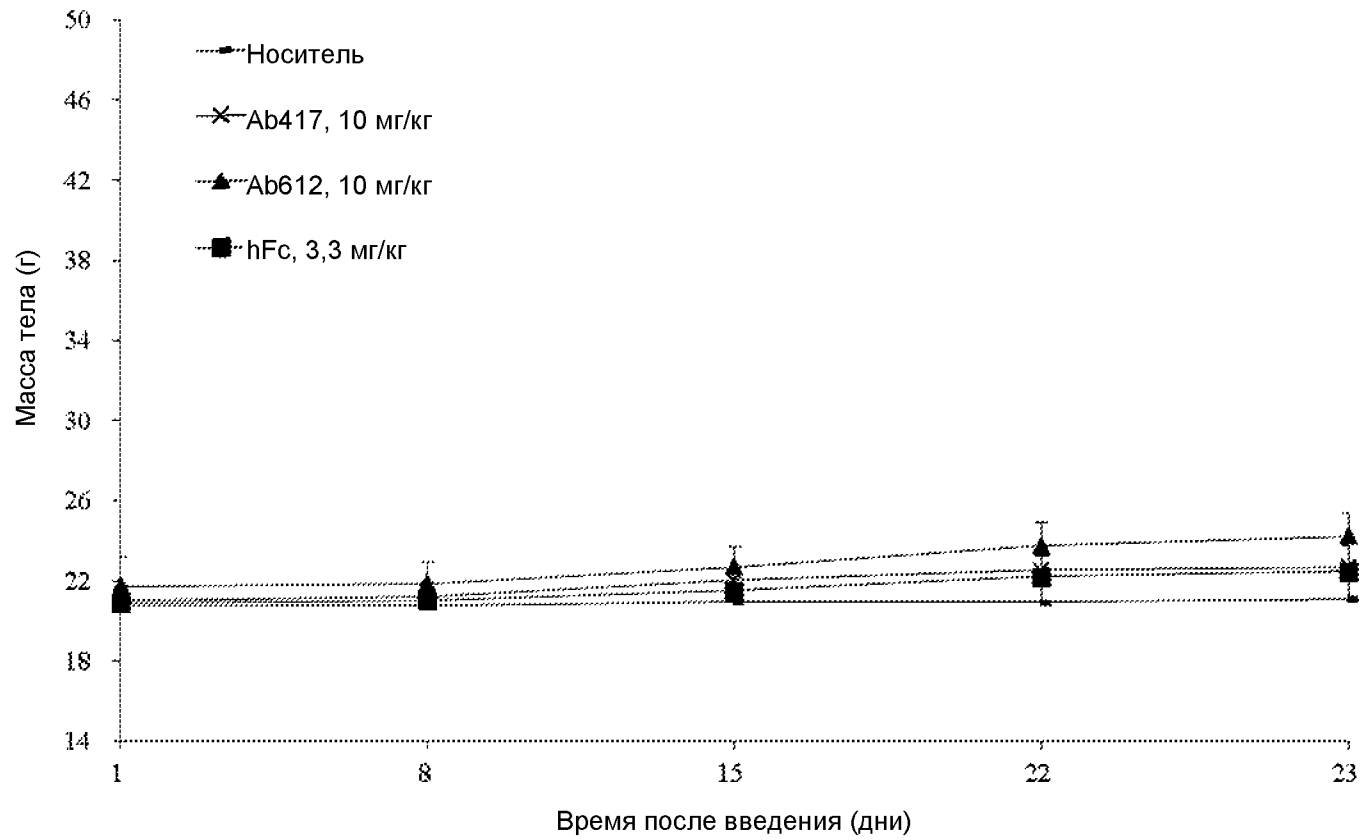
ФИГ. 2F Ab5D12



Название пика	КТ	Площадь	% площади	Высота
Пик 1	9.170	685457	100.00	12003

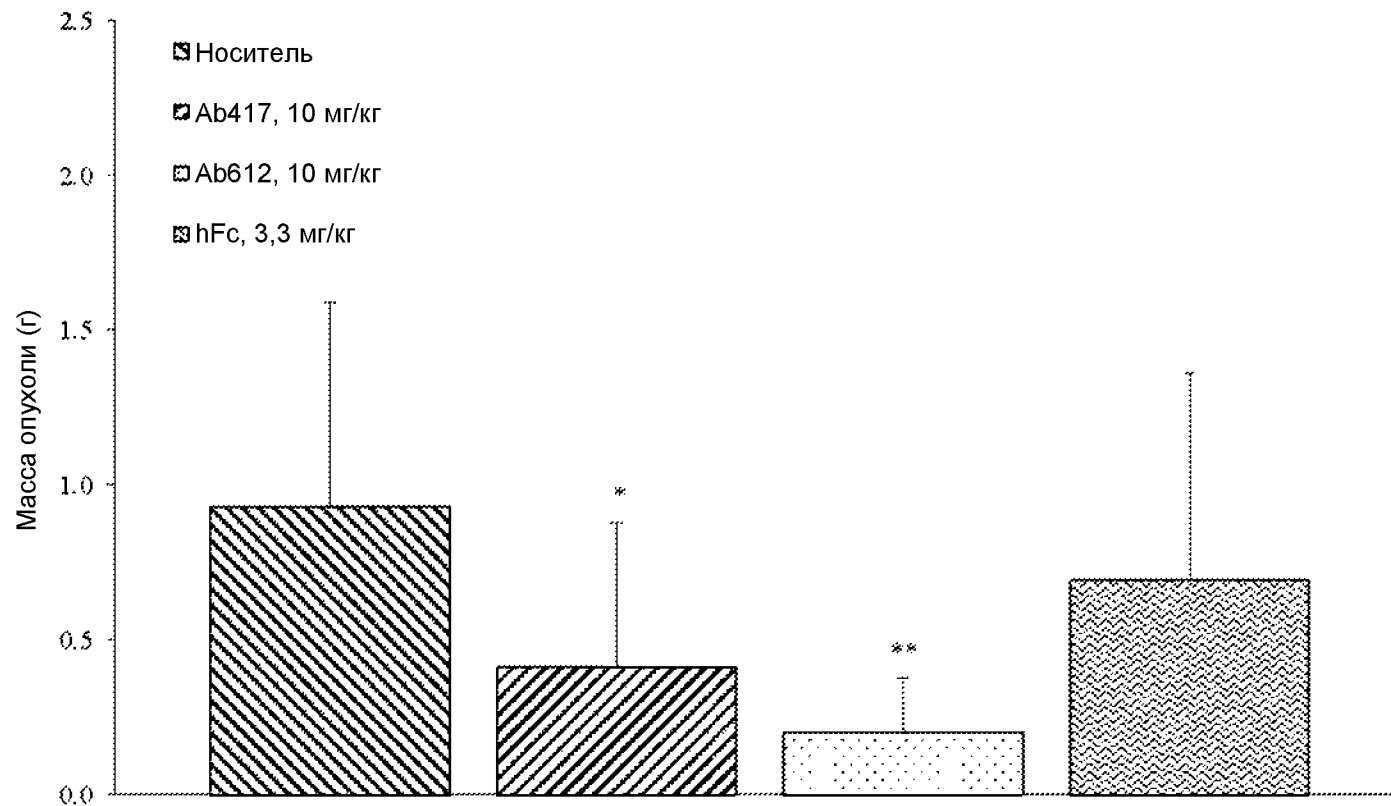


ФИГ. 3А



Каждая точка представляет собой значение + С. О. (n=8)

ФИГ. 3В



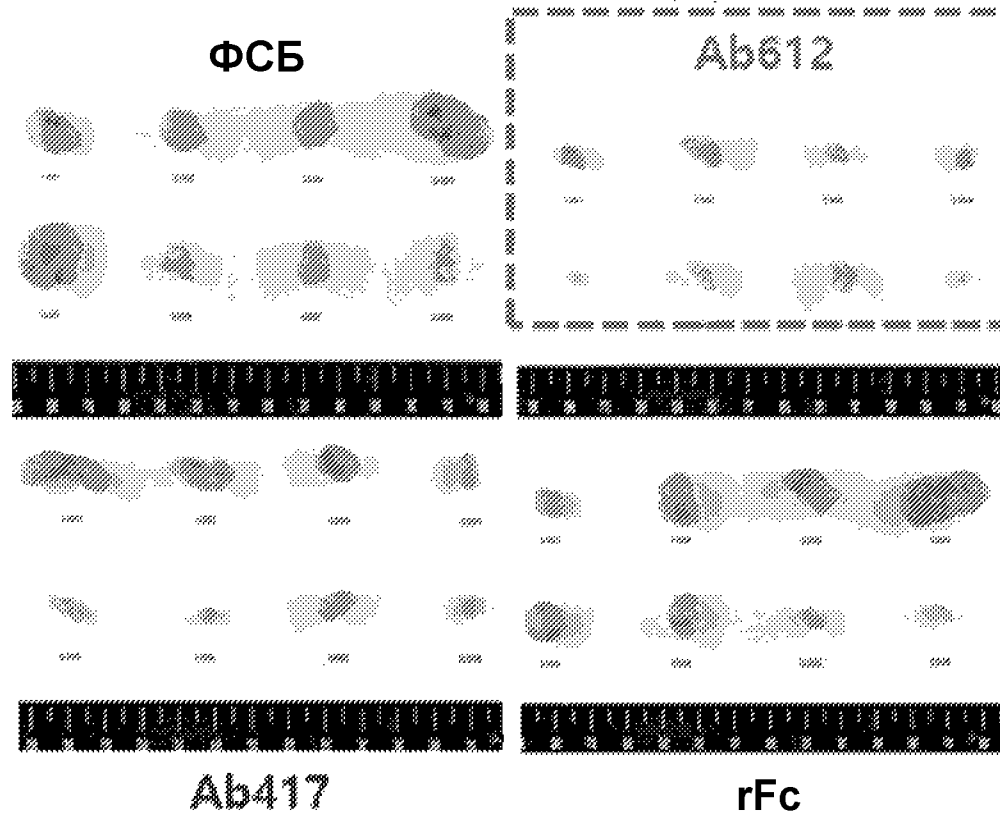
Каждая точка представляет собой значение + С. О. (n=8)

* $p < 0,01$, достоверное отличие от отрицательной контрольной группы (G1) по t-критерию Даннета

** $p < 0,01$, достоверное отличие от отрицательной контрольной группы (G1) по t-критерию Даннета

ФИГ. 3С

Время после введения (дни)



ФИГ. 3D