

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092360** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.02.25

(51) Int. Cl. *C07K 16/24* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.04.11

(54) КОМБИНАЦИЯ ИНГИБИТОРОВ LIF И ИНГИБИТОРОВ ОСИ PD-1 ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ РАКА

(31) 18382248.5; 18382326.9; 18382360.8;
19382132.9

(72) Изобретатель:

(32) 2018.04.12; 2018.05.14; 2018.05.25;
2019.02.22

Сеоане Суарез Жоан, Анидо
Фолгуэйра Джудит (ES), Франссон
Йохан, Халлетт Робин Мэттью (CA),
Паскуаль Гарсиа Моника, Бонфилл
Тейксидор Эстер, Планас Риголь
Эстер (ES)

(33) EP

(86) PCT/IB2019/000423

(87) WO 2019/197903 2019.10.17

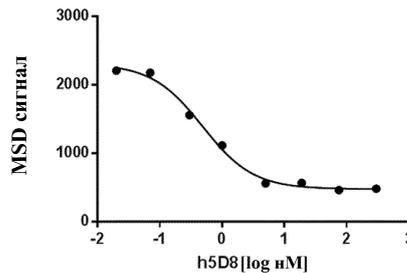
(71) Заявитель:

(74) Представитель:

МЕДИММУН ЛИМИТЕД
(GB); ФУНДАСИО ПРИВАДА
ИНСТИТУТ Д'ИНВЕСТИГАСИО
ОНКОЛЬОХИКА ДЕ ВАЛЬ
ЭБРОН; ФУНДАСИО ПРИВАДА
ИНСТИТУСИО КАТАЛАНА ДЕ
РЕСЕРКА И ЭСТУДИС АВАНКАТС
(ES)

Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатъев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) В изобретении описаны способы лечения рака с применением комбинаций полипептидов, связывающих лейкоз-ингибирующий фактор (LIF), и ингибиторов оси PD-1.



A1

202092360

202092360

A1

**КОМБИНАЦИЯ ИНГИБИТОРОВ LIF И ИНГИБИТОРОВ ОСИ PD-1 ДЛЯ
ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ РАКА
ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА**

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет заявки в отношении EP18382248.5, поданной 12 апреля 2018 г.; EP18382326.9, поданной 14 мая 2018 г.; EP18382360.8, поданной 25 мая 2018 г.; EP19382132.9, поданной 22 февраля 2019 г., каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей полноте.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0002] Лейкоз-ингибирующий фактор (LIF) представляет собой цитокин типа интерлейкин-6 (IL-6), который участвует в различных видах биологической активности, включая ингибирование дифференцировки клеток. Человеческий LIF представляет собой полипептид из 202 аминокислот, который оказывает биологические эффекты посредством связывания с рецептором LIF на поверхности клетки (LIFR или CD118), который гетеродимеризуется с gp130. Это приводит к активации сигнальных путей, активирующих рост, таких как путь митоген-активируемой протеинкиназы (MAPK) и путь янус-активируемой киназы (JAK/STAT). Было продемонстрировано, что высокие уровни экспрессии LIF и высокие уровни LIF в сыворотке крови ассоциированы с плохим прогнозом при многих типах рака.

[0003] Белок запрограммированной гибели клеток 1, также известный как PD-1 и CD279, представляет собой рецептор клеточной поверхности, экспрессируемый активированными Т- и В-клетками, который играет важную роль в подавлении иммунной системы и активации аутоотолерантности путем супрессии Т-клеточной воспалительной активности. Было показано, что PD-1 связывается с двумя разными лигандами, PDL-1 (CD274) и PDL-2 (CD273). Передача сигналов через данную ось PD-1 является механизмом важным для роста и метастазирования опухоли, позволяя уклониться от иммунного надзора. Недавно было показано, что многие различные типы опухолей экспрессируют PDL-1 и PDL-2, что способствует уклонению от иммунного надзора и приводит к повышенному росту опухоли и метастазированию.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] В данном документе описаны способы лечения или предотвращения рака, опухолей или других новообразований у индивидуума. Заявляемые способы и композиции включают комбинации полипептидов, связывающих LIF, и ингибиторов оси PD-1. В данных способах можно использовать антитела к LIF, которые противодействуют активности LIF или блокируют ее, и полипептиды, которые ингибируют связывающую

активность или передачу сигналов посредством PD-1, PDL-1 и PDL-2. В определенных вариантах осуществления ингибиторы оси PD-1 связывают и ингибируют взаимодействия между PD-1 и PDL-1 или PDL-2. В частности, данные комбинации демонстрируют неожиданный синергизм по сравнению с антителами к LIF или с ингибиторами оси PD-1 по отдельности.

[0005] В одном аспекте данного документа описано применение антитела, связывающего лейкоз-ингибирующий фактор (LIF), в комбинации с ингибитором передачи сигналов PD-1 (CD279), PDL-1 (CD274) или PDL-2 (CD-273) для лечения рака у индивидуума, где антитело, связывающее LIF, содержит: (a) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 1-3; (b) определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 4 или 5; (c) определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 6-8; (d) определяющую комплементарность область 1 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 9 или 10; (e) определяющую комплементарность область 2 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 11 или 12; и (f) определяющую комплементарность область 3 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13. В определенных вариантах осуществления антитело, связывающее LIF, и ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводят индивидууму в отдельных составах. В определенных вариантах осуществления антитело, связывающее LIF, и ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводят индивидууму в одном и том же составе. В определенных вариантах осуществления антитело, связывающее LIF, вводят индивидууму до введения индивидууму ингибитора передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводят индивидууму до введения индивидууму антитела, связывающего LIF. В определенных вариантах осуществления ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводят индивидууму одновременно с введением индивидууму антитела, связывающего LIF. В определенных вариантах осуществления антитело, связывающее LIF, содержит по меньшей мере одну каркасную область, полученную из каркасной

области человеческого антитела. В определенных вариантах осуществления антитело, связывающее LIF, является гуманизированным. В определенных вариантах осуществления антитело, связывающее LIF, является деиммунизированным. В определенных вариантах осуществления антитело, связывающее LIF, содержит переменную область тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 90% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 42; и переменную область легкой цепи (VL) иммуноглобулина, которая на по меньшей мере приблизительно 90% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46. В определенных вариантах осуществления последовательность VH идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 42; и последовательность VL идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46. В определенных вариантах осуществления рак включает распространенную солидную опухоль, глиобластому, рак желудка, рак кожи, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичка, рак щитовидной железы, рак головы и шеи, рак печени, рак почки, рак пищевода, рак яичника, рак толстой кишки, рак легкого, лимфому, рак мягких тканей или любую их комбинацию. В определенных вариантах осуществления рак включает немелкоклеточный рак легкого. В определенных вариантах осуществления рак включает протоковую аденокарциному поджелудочной железы. В определенных вариантах осуществления лечение рака ранее осуществляли с помощью ингибитора контрольных точек иммунного ответа. В определенных вариантах осуществления ингибитор контрольных точек иммунного ответа представляет собой ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 представляет собой антитело или его фрагмент, которые связываются с PD-1.

[0006] В одном аспекте данного документа описано применение антитела, связывающего лейкоз-ингибирующий фактор (LIF), в комбинации с ингибитором передачи сигналов PD-1 (CD279), PDL-1 (CD274) или PDL-2 (CD-273) для лечения рака у индивидуума, где антитело, связывающее LIF, содержит: (a) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 1; (b) определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4; (c) определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-

CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 6; (d) определяющую комплементарность область 1 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 9; и (e) определяющую комплементарность область 2 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 11. В определенных вариантах осуществления антитело, связывающее LIF, и ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводят индивидууму в отдельных составах. В определенных вариантах осуществления антитело, связывающее LIF, и ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводят индивидууму в одном и том же составе. В определенных вариантах осуществления антитело, связывающее LIF, вводят индивидууму до введения индивидууму ингибитора передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводят индивидууму до введения индивидууму антитела, связывающего LIF. В определенных вариантах осуществления ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводят индивидууму одновременно с введением индивидууму антитела, связывающего LIF. В определенных вариантах осуществления антитело, связывающее LIF, содержит по меньшей мере одну каркасную область, полученную из каркасной области человеческого антитела. В определенных вариантах осуществления антитело, связывающее LIF, является гуманизированным. В определенных вариантах осуществления антитело, связывающее LIF, является деиммунизированным. В определенных вариантах осуществления антитело, связывающее LIF, содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 90% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 42; и вариабельную область легкой цепи (VL) иммуноглобулина, которая на по меньшей мере приблизительно 90% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46. В определенных вариантах осуществления последовательность VH идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 42; и последовательность VL идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46. В определенных вариантах осуществления рак включает распространенную солидную опухоль, глиобластому, рак желудка, рак кожи, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичка, рак щитовидной железы, рак головы и шеи, рак печени, рак почки, рак пищевода, рак яичника, рак толстой кишки, рак легкого, лимфому, рак мягких тканей или любую их комбинацию.

В определенных вариантах осуществления рак включает немелкоклеточный рак легкого. В определенных вариантах осуществления рак включает протоковую аденокарциному поджелудочной железы. В определенных вариантах осуществления лечение рака ранее осуществляли с помощью ингибитора контрольных точек иммунного ответа. В определенных вариантах осуществления ингибитор контрольных точек иммунного ответа представляет собой ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 представляет собой антитело или его фрагмент, которые связываются с PD-1.

[0007] В одном аспекте данного документа описано применение антитела, связывающего лейкоз-ингибирующий фактор (LIF), в комбинации с ингибитором передачи сигналов PD-1 (CD279), PDL-1 (CD274) или PDL-2 (CD-273) для лечения рака у индивидуума, где антитело, связывающее LIF, содержит: (a) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3; (b) определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 5; (c) определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 7; (d) определяющую комплементарность область 1 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 10; (e) определяющую комплементарность область 2 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 12; и (f) определяющую комплементарность область 3 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13. В определенных вариантах осуществления антитело, связывающее LIF, и ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводят индивидууму в отдельных составах. В определенных вариантах осуществления антитело, связывающее LIF, и ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводят индивидууму в одном и том же составе. В определенных вариантах осуществления антитело, связывающее LIF, вводят индивидууму до введения индивидууму ингибитора передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводят индивидууму до введения индивидууму антитела, связывающего LIF. В определенных вариантах осуществления ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1

или PDL-2 вводят индивидууму одновременно с введением индивидууму антитела, связывающего LIF. В определенных вариантах осуществления антитело, связывающее LIF, содержит по меньшей мере одну каркасную область, полученную из каркасной области человеческого антитела. В определенных вариантах осуществления антитело, связывающее LIF, является гуманизированным. В определенных вариантах осуществления антитело, связывающее LIF, является деиммунизированным. В определенных вариантах осуществления антитело, связывающее LIF, содержит переменную область тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 90% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 42; и переменную область легкой цепи (VL) иммуноглобулина, которая на по меньшей мере приблизительно 90% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46. В определенных вариантах осуществления последовательность VH идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 42; и последовательность VL идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46. В определенных вариантах осуществления рак включает распространенную солидную опухоль, глиобластома, рак желудка, рак кожи, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичка, рак щитовидной железы, рак головы и шеи, рак печени, рак почки, рак пищевода, рак яичника, рак толстой кишки, рак легкого, лимфому, рак мягких тканей или любую их комбинацию. В определенных вариантах осуществления рак включает немелкоклеточный рак легкого. В определенных вариантах осуществления рак включает протоковую аденокарциному поджелудочной железы. В определенных вариантах осуществления лечение рака ранее осуществляли с помощью ингибитора контрольных точек иммунного ответа. В определенных вариантах осуществления ингибитор контрольных точек иммунного ответа представляет собой ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 представляет собой антитело или его фрагмент, которые связываются с PD-1.

[0008] В одном аспекте данного документа описано применение антитела, связывающего лейкоз-ингибирующий фактор (LIF), в комбинации с ингибитором передачи сигналов PD-1 (CD279), PDL-1 (CD274) или PDL-2 (CD-273) для лечения рака у индивидуума, где антитело, связывающее LIF, содержит: (а) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 2; (b) определяющую

комплементарность область 2 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 4 или 5; (c) определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 7; (d) определяющую комплементарность область 1 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 9 или 10; (e) определяющую комплементарность область 2 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 11 или 12; и (f) определяющую комплементарность область 3 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13. В определенных вариантах осуществления антитело, связывающее LIF, и ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводят индивидууму в отдельных составах. В определенных вариантах осуществления антитело, связывающее LIF, и ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводят индивидууму в одном и том же составе. В определенных вариантах осуществления антитело, связывающее LIF, вводят индивидууму до введения индивидууму ингибитора передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводят индивидууму до введения индивидууму антитела, связывающего LIF. В определенных вариантах осуществления ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводят индивидууму одновременно с введением индивидууму антитела, связывающего LIF. В определенных вариантах осуществления антитело, связывающее LIF, содержит по меньшей мере одну каркасную область, полученную из каркасной области человеческого антитела. В определенных вариантах осуществления антитело, связывающее LIF, является гуманизированным. В определенных вариантах осуществления антитело, связывающее LIF, является деиммунизированным. В определенных вариантах осуществления антитело, связывающее LIF, содержит переменную область тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 90% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 42; и переменную область легкой цепи (VL) иммуноглобулина, которая на по меньшей мере приблизительно 90% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46. В определенных вариантах осуществления последовательность VH идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 42; и

последовательность VL идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46. В определенных вариантах осуществления рак включает распространенную солидную опухоль, глиобластому, рак желудка, рак кожи, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичка, рак щитовидной железы, рак головы и шеи, рак печени, рак почки, рак пищевода, рак яичника, рак толстой кишки, рак легкого, лимфому, рак мягких тканей или любую их комбинацию. В определенных вариантах осуществления рак включает немелкоклеточный рак легкого. В определенных вариантах осуществления рак включает протоковую аденокарциному поджелудочной железы. В определенных вариантах осуществления лечение рака ранее осуществляли с помощью ингибитора контрольных точек иммунного ответа. В определенных вариантах осуществления ингибитор контрольных точек иммунного ответа представляет собой ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 представляет собой антитело или его фрагмент, которые связываются с PD-1.

[0009] В одном аспекте данного документа описано применение полипептида, связывающего лейкоз-ингибирующий фактор (LIF), в комбинации с ингибитором передачи сигналов PD-1 (CD279), PDL-1 (CD274) или PDL-2 (CD-273) для лечения рака у индивидуума. В определенных вариантах осуществления полипептид, связывающий LIF, и ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводят индивидууму в отдельных составах. В определенных вариантах осуществления полипептид, связывающий LIF, и ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводят индивидууму в одном и том же составе. В определенных вариантах осуществления полипептид, связывающий LIF, вводят индивидууму до введения индивидууму ингибитора передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводят индивидууму до введения индивидууму полипептида, связывающего LIF. В определенных вариантах осуществления ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводят индивидууму одновременно с введением индивидууму полипептида, связывающего LIF. В определенных вариантах осуществления полипептид, связывающий LIF, содержит фрагмент варибельной области иммуноглобулина или константной области тяжелой цепи иммуноглобулина. В определенных вариантах осуществления полипептид, связывающий LIF, предусматривает антитело, которое специфически связывается с LIF. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, содержит по меньшей мере одну каркасную область, полученную из каркасной области человеческого антитела.

В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, является гуманизированным. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, является деиммунизированным. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, содержит две тяжелые цепи иммуноглобулина и две легкие цепи иммуноглобулина. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, представляет собой антитело IgG. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, представляет собой Fab, F(ab)₂, однодоменное антитело, одноцепочечный переменный фрагмент (scFv) или наноантитело. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, содержит: (a) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 1-3; (b) определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 4 или 5; (c) определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 6-8; (d) определяющую комплементарность область 1 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 9 или 10; (e) определяющую комплементарность область 2 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 11 или 12; и (f) определяющую комплементарность область 3 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, содержит (a) последовательность переменной области тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 41, 42, 44 или 66; и (b) последовательность переменной области легкой цепи (VL) иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 45-48. В определенных вариантах осуществления последовательность VH на по меньшей мере приблизительно

80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 42; и последовательность VL на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46. В определенных вариантах осуществления последовательность VH идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 42; и последовательность VL идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, содержит: (а) последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 57-60 или 67; и (b) последовательность легкой цепи иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 61-64. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, связывается с K_D , составляющей менее приблизительно 200 пикомоль. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, связывается с K_D , составляющей менее приблизительно 100 пикомоль. В определенных вариантах осуществления ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 предусматривает антитело или его фрагмент, связывающий PD-1, PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления антитело специфически связывает PD-1. В определенных вариантах осуществления антитело предусматривает пембролизумаб, ниволумаб, AMP-514, тислелизумаб, спартализумаб или их фрагмент, связывающий PD-1. В определенных вариантах осуществления антитело специфически связывает PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления антитело предусматривает дурвалумаб, атезолизумаб, авелумаб, BMS-936559 или FAZ053 или их фрагмент, связывающий PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 предусматривает Fc-слитый белок, который связывает PD-1, PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления Fc-слитый белок предусматривает AMP-224 или его фрагмент, связывающий PD-1. В определенных вариантах осуществления ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 предусматривает низкомолекулярный ингибитор PD-1, PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления низкомолекулярный ингибитор передачи сигналов посредством PD-1,

PDL-1 или PDL-2 предусматривает: N-{2-[(2-метокси-6-[(2-метил[1,1'-бифенил]-3-ил)метокси]пиридин-3-ил)метил)амино]этил}ацетамид (BMS 202); (2-((3-цианобензил)окси)-4-((3-(2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-ил)-2-метилбензил)окси)-5-метилбензил)-D-серина гидрохлорид; (2R,4R)-1-(5-хлор-2-((3-цианобензил)окси)-4-((3-(2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-ил)-2-метилбензил)окси)бензил)-4-гидроксипирролидин-2-карбоновую кислоту; 3-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-1-фенилиндол; 3-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-1-фенил-1H-индол; L-α-глутамин, N2, N6-бис(L-серил-L-аспарагинил-L-треонил-L-серил-L-α-глутамил-L-серил-L-фенилаланил)-L-лизил-L-фенилаланил-L-аргинил-L-валил-L-треонил-L-глутаминил-L-лейцил-L-аланил-L-пролил-L-лизил-L-аланил-L-глутаминил-L-изолейцил-L-лизил; (2S)-1-[[2,6-диметокси-4-[(2-метил[1,1'-бифенил]-3-ил)метокси]фенил]метил]-2-пиперидинкарбоновую кислоту; глицинамид, N-(2-меркаптоацетил)-L-фенилаланил-N-метил-L-аланил-L-аспарагинил-L-пролил-L-гистидил-L-лейцил-N-метилглицил-L-триптофил-L-серил-L-триптофил-N-метил-L-норлейцил-N-метил-L-норлейцил-L-аргинил-L-цистеинил-, циклический(1→14)-тиоэфир или их производное или аналог. В определенных вариантах осуществления рак включает распространенную солидную опухоль, глиобластому, рак желудка, рак кожи, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичка, рак щитовидной железы, рак головы и шеи, рак печени, рак почки, рак пищевода, рак яичника, рак толстой кишки, рак легкого, лимфому или рак мягких тканей. В определенных вариантах осуществления рак включает немелкоклеточный рак легкого, эпителиальную карциному яичника или аденокарциному поджелудочной железы. В определенных вариантах осуществления рак является рефрактерным к лечению терапевтическим количеством полипептида, связывающего LIF, или ингибитора передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2, вводимых в режиме монотерапии.

[0010] В другом аспекте данного документа описано применение антитела, которое специфически связывает лейкоз-ингибирующий фактор (LIF), в комбинации с антителом, связывающим PD-1, для лечения рака у индивидуума, где антитело, связывающее LIF, содержит: (a) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 1-3; (b) определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 4 или 5; (c) определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым

из SEQ ID NO: 6-8; (d) определяющую комплементарность область 1 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 9 или 10; (e) определяющую комплементарность область 2 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 11 или 12; и (f) определяющую комплементарность область 3 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13.

[0011] В другом аспекте данного документа описан способ лечения индивидуума, страдающего от рака, предусматривающий введение индивидууму, страдающему от рака, эффективного количества: (a) полипептида, связывающего лейкоз-ингибирующий фактор (LIF); и (b) ингибитора передачи сигналов PD-1 (CD279), PDL-1 (CD274) или PDL-2 (CD273). В определенных вариантах осуществления способ предусматривает введение эффективного количества полипептида, связывающего LIF, индивидууму, страдающему от рака. В определенных вариантах осуществления способ предусматривает введение эффективного количества ингибитора PD-1 индивидууму, страдающему от рака. В определенных вариантах осуществления полипептид, связывающий LIF, содержит фрагмент вариабельной области иммуноглобулина или константной области тяжелой цепи иммуноглобулина. В определенных вариантах осуществления полипептид, связывающий LIF, предусматривает антитело, которое специфически связывается с LIF. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, содержит по меньшей мере одну каркасную область, полученную из каркасной области человеческого антитела. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, является гуманизированным. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, является деиммунизированным. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, содержит две тяжелые цепи иммуноглобулина и две легкие цепи иммуноглобулина. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, представляет собой антитело IgG. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, представляет собой Fab, F(ab)₂, однодоменное антитело, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) или наноантитело. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, содержит: (a) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-

CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 1-3; (b) определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 4 или 5; (c) определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 6-8; (d) определяющую комплементарность область 1 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 9 или 10; (e) определяющую комплементарность область 2 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 11 или 12; и (f) определяющую комплементарность область 3 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, содержит: (a) последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 41, 42, 44 или 66; и (b) последовательность вариабельной области легкой цепи (VL) иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 45-48. В определенных вариантах осуществления последовательность VH на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 42; и последовательность VL на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46. В определенных вариантах осуществления последовательность VH идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 42; и последовательность VL идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, содержит: (a) последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под

любым из SEQ ID NO: 57-60 или 67; и последовательность легкой цепи иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 61-64. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, связывается с K_D , составляющей менее приблизительно 200 пикомоль. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, связывается с K_D , составляющей менее приблизительно 100 пикомоль. В определенных вариантах осуществления ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 предусматривает антитело или его фрагмент, связывающий PD-1, PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления антитело специфически связывает PD-1. В определенных вариантах осуществления антитело предусматривает пембролизумаб, ниволумаб, AMP-514, тислелизумаб, спартализумаб или их фрагмент, связывающий PD-1. В определенных вариантах осуществления антитело специфически связывает PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления антитело предусматривает дурвалумаб, атезолизумаб, авелумаб, BMS-936559 или FAZ053 или их фрагмент, связывающий PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 предусматривает Fc-слитый белок, который связывает PD-1, PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления Fc-слитый белок предусматривает AMP-224 или его фрагмент, связывающий PD-1. В определенных вариантах осуществления ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 предусматривает низкомолекулярный ингибитор PD-1, PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления низкомолекулярный ингибитор передачи сигналов посредством PD-1, PDL-1 или PDL-2 предусматривает: N-{2-[(2-метокси-6-[(2-метил[1,1'-бифенил]-3-ил)метокси]пиридин-3-ил)метил)амино]этил}ацетамид (BMS 202); (2-((3-цианобензил)окси)-4-((3-(2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-ил)-2-метилбензил)окси)-5-метилбензил)-D-серина гидрохлорид; (2R,4R)-1-(5-хлор-2-((3-цианобензил)окси)-4-((3-(2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-ил)-2-метилбензил)окси)бензил)-4-гидроксипирролидин-2-карбоновую кислоту; 3-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-1-фенилиндол; 3-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-1-фенил-1H-индол; L- α -глутамин, N2, N6-бис(L-серил-L-аспарагинил-L-треонил-L-серил-L- α -глутамил-L-серил-L-фенилаланил)-L-лизил-L-фенилаланил-L-аргинил-L-валил-L-треонил-L-глутаминил-L-лейцил-L-аланил-L-пролил-L-лизил-L-аланил-L-глутаминил-L-изолейцил-L-лизил; (2S)-1-[[2,6-диметокси-4-[(2-метил[1,1'-бифенил]-3-ил)метокси]фенил]метил]-2-пиперидинкарбоновую кислоту;

глицинамид, N-(2-меркаптоацетил)-L-фенилаланил-N-метил-L-аланил-L-аспарагинил-L-пролил-L-гистидил-L-лейцил-N-метилглицил-L-триптофил-L-серил-L-триптофил-N-метил-L-норлейцил-N-метил-L-норлейцил-L-аргинил-L-цистеинил-, циклический(1→14)-тиоэфир или их производное или аналог. В определенных вариантах осуществления рак включает распространенную солидную опухоль, глиобластому, рак желудка, рак кожи, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичка, рак щитовидной железы, рак головы и шеи, рак печени, рак почки, рак пищевода, рак яичника, рак толстой кишки, рак легкого, лимфому или рак мягких тканей. В определенных вариантах осуществления рак включает немелкоклеточный рак легкого, эпителиальную карциному яичника или аденокарциному поджелудочной железы. В определенных вариантах осуществления рак является рефрактерным к лечению терапевтическим количеством ингибитора полипептида, связывающего LIF. В определенных вариантах осуществления рак является рефрактерным к лечению терапевтическим количеством ингибитора передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления полипептид, связывающий лейкоз-ингибирующий фактор (LIF), и ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводят по отдельности. В определенных вариантах осуществления полипептид, связывающий LIF, и ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводят одновременно. В определенных вариантах осуществления полипептид, связывающий LIF, и ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводят в одной композиции.

[0012] В другом аспекте данного документа описан способ лечения индивидуума, страдающего от рака, при этом способ предусматривает: введение индивидууму, страдающему от рака, эффективного количества полипептида, связывающего лейкоз-ингибирующий фактор (LIF), где индивидууму вводили терапевтическое количество ингибитора передачи сигналов PD-1 (CD279), PDL-1 (CD274) или PDL-2 (CD-273). В определенных вариантах осуществления способ обеспечивает ингибирование роста или метастазирования рака. В определенных вариантах осуществления полипептид, связывающий LIF, содержит фрагмент вариабельной области иммуноглобулина или константной области тяжелой цепи иммуноглобулина. В определенных вариантах осуществления полипептид, связывающий LIF, предусматривает антитело, которое специфически связывается с LIF. В определенных вариантах осуществления полипептид, связывающий LIF, содержит по меньшей мере одну каркасную область, полученную из каркасной области человеческого иммуноглобулина. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, является

гуманизированным. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, является деиммунизированным. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, содержит две тяжелые цепи иммуноглобулина и две легкие цепи иммуноглобулина. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, представляет собой антитело IgG. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, представляет собой Fab, F(ab)₂, однодоменное антитело, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) или наноантитело. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, содержит: (a) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 1-3; (b) определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 4 или 5; (c) определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 6-8; (d) определяющую комплементарность область 1 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 9 или 10; (e) определяющую комплементарность область 2 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 11 или 12; и (f) определяющую комплементарность область 3 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, содержит: (a) последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 41, 42, 44 или 66; и (b) последовательность вариабельной области легкой цепи (VL) иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 45-48. В определенных вариантах осуществления последовательность VH на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности,

представленной под SEQ ID NO: 42; и последовательность VL на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46. В определенных вариантах осуществления последовательность VH идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 42; и последовательность VL идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, содержит: (a) последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 57-60 или 67; и (b) последовательность легкой цепи иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 61-64. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, связывается с K_D , составляющей менее приблизительно 200 пикомоль. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, связывается с K_D , составляющей менее приблизительно 100 пикомоль. В определенных вариантах осуществления ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 предусматривает антитело или его фрагмент, связывающий PD-1, PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления антитело специфически связывает PD-1. В определенных вариантах осуществления антитело предусматривает пембролизумаб, ниволумаб, AMP-514, спартализумаб или их фрагмент, связывающий PD-1. В определенных вариантах осуществления антитело специфически связывает PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления антитело предусматривает дурвалумаб, атезолизумаб, авелумаб, BMS-936559 или FAZ053 или их фрагмент, связывающий PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 предусматривает Fc-слитый белок, который связывает PD-1, PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления Fc-слитый белок предусматривает AMP-224 или его фрагмент, связывающий PD-1. В определенных вариантах осуществления ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 предусматривает низкомолекулярный ингибитор PD-1, PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления низкомолекулярный ингибитор передачи сигналов посредством PD-1, PDL-1 или PDL-2 предусматривает: N-{2-[(2-метокси-6-[(2-метил[1,1'-бифенил]-3-ил)метокси]пиридин-3-

ил}метил)амино]этил}ацетамид (BMS 202); (2-((3-цианобензил)окси)-4-((3-(2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-ил)-2-метилбензил)окси)-5-метилбензил)-D-серина гидрохлорид; (2R,4R)-1-(5-хлор-2-((3-цианобензил)окси)-4-((3-(2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-ил)-2-метилбензил)окси)бензил)-4-гидроксипирролидин-2-карбоновую кислоту; 3-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-1-фенилиндол; 3-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-1-фенил-1H-индол; L- α -глутамин, N2, N6-бис(L-серил-L-аспарагинил-L-треонил-L-серил-L- α -глутамил-L-серил-L-фенилаланил)-L-лизил-L-фенилаланил-L-аргинил-L-валил-L-треонил-L-глутаминил-L-лейцил-L-аланил-L-пролил-L-лизил-L-аланил-L-глутаминил-L-изолейцил-L-лизил; (2S)-1-[[2,6-диметокси-4-[(2-метил[1,1'-бифенил]-3-ил)метокси]фенил]метил]-2-пиперидинкарбоновую кислоту; глицинамид, N-(2-меркаптоацетил)-L-фенилаланил-N-метил-L-аланил-L-аспарагинил-L-пролил-L-гистидил-L-лейцил-N-метилглицил-L-триптофил-L-серил-L-триптофил-N-метил-L-норлейцил-N-метил-L-норлейцил-L-аргинил-L-цистеинил-, циклический(1 \rightarrow 14)-тиозофир или их производное или аналог. В определенных вариантах осуществления рак включает распространенную солидную опухоль, глиобластому, рак желудка, рак кожи, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичка, рак щитовидной железы, рак головы и шеи, рак печени, рак почки, рак пищевода, рак яичника, рак толстой кишки, рак легкого, лимфому или рак мягких тканей. В определенных вариантах осуществления рак включает немелкоклеточный рак легкого, эпителиальную карциному яичника или аденокарциному поджелудочной железы. В определенных вариантах осуществления рак является рефрактерным к лечению терапевтическим количеством ингибитора передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2.

[0013] В другом аспекте данного документа описан способ лечения индивидуума, страдающего от рака, при этом способ предусматривает: введение индивидууму, страдающему от рака, эффективного количества ингибитора передачи сигналов PD-1 (CD279), PDL-1 (CD274) или PDL-2 (CD-273), где индивидууму вводили терапевтическое количество полипептида, связывающего лейкоз-ингибирующий фактор (LIF). В определенных вариантах осуществления способ обеспечивает ингибирование роста или метастазирования рака. В определенных вариантах осуществления полипептид, связывающий LIF, содержит фрагмент вариабельной области иммуноглобулина или константной области тяжелой цепи иммуноглобулина. В определенных вариантах осуществления полипептид, связывающий LIF, предусматривает антитело, которое специфически связывается с LIF. В определенных вариантах осуществления полипептид, связывающий LIF, содержит по меньшей мере одну каркасную область, полученную из

каркасной области человеческого иммуноглобулина. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, является гуманизированным. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, является деиммунизированным. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, содержит две тяжелые цепи иммуноглобулина и две легкие цепи иммуноглобулина. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, представляет собой антитело IgG. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, представляет собой Fab, F(ab)₂, однодоменное антитело, одноцепочечный переменный фрагмент (scFv) или наноантитело. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, содержит: (a) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 1-3; (b) определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 4 или 5; (c) определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 6-8; (d) определяющую комплементарность область 1 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 9 или 10; (e) определяющую комплементарность область 2 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 11 или 12; и (f) определяющую комплементарность область 3 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, содержит: (a) последовательность переменной области тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 41, 42, 44 или 66; и (b) последовательность переменной области легкой цепи (VL) иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 45-48. В определенных

вариантах осуществления последовательность VH на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 42; и последовательность VL на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46. В определенных вариантах осуществления последовательность VH идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 42; и последовательность VL идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, содержит: (a) последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 57-60 или 67; и (b) последовательность легкой цепи иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 61-64. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, связывается с K_D , составляющей менее приблизительно 200 пикомоль. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, связывается с K_D , составляющей менее приблизительно 100 пикомоль. В определенных вариантах осуществления ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 включает антитело или его фрагмент, связывающий PD-1, PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления антитело специфически связывает PD-1. В определенных вариантах осуществления антитело предусматривает пембролизумаб, ниволумаб, AMP-514, спартализумаб или их фрагмент, связывающий PD-1. В определенных вариантах осуществления антитело специфически связывает PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления антитело предусматривает дурвалумаб, атезолизумаб, авелумаб, BMS-936559 или FAZ053 или их фрагмент, связывающий PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 предусматривает Fc-слитый белок, который связывает PD-1, PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления Fc-слитый белок предусматривает AMP-224 или его фрагмент, связывающий PD-1. В определенных вариантах осуществления ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 предусматривает низкомолекулярный ингибитор PD-1,

PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления низкомолекулярный ингибитор передачи сигналов посредством PD-1 (CD279), PDL-1 (CD274) или PDL-2 (CD273) предусматривает: N-{2-[(2-метокси-6-[(2-метил[1,1'-бифенил]-3-ил)метокси]пиридин-3-ил)метил]амино}этил}ацетамид (BMS 202); (2-((3-цианобензил)окси)-4-((3-(2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-ил)-2-метилбензил)окси)-5-метилбензил)-D-серина гидрохлорид; (2R,4R)-1-(5-хлор-2-((3-цианобензил)окси)-4-((3-(2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-ил)-2-метилбензил)окси)бензил)-4-гидроксипирролидин-2-карбоновую кислоту; 3-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-1-фенилиндол; 3-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-1-фенил-1H-индол; L- α -глутамин, N2, N6-бис(L-серил-L-аспарагинил-L-треонил-L-серил-L- α -глутамил-L-серил-L-фенилаланил)-L-лизил-L-фенилаланил-L-аргинил-L-валил-L-треонил-L-глутаминил-L-лейцил-L-аланил-L-пролил-L-лизил-L-аланил-L-глутаминил-L-изолейцил-L-лизил; (2S)-1-[[2,6-диметокси-4-[(2-метил[1,1'-бифенил]-3-ил)метокси]фенил]метил]-2-пиперидинкарбоновую кислоту; глицинамид, N-(2-меркаптоацетил)-L-фенилаланил-N-метил-L-аланил-L-аспарагинил-L-пролил-L-гистидил-L-лейцил-N-метилглицил-L-триптофил-L-серил-L-триптофил-N-метил-L-норлейцил-N-метил-L-норлейцил-L-аргинил-L-цистеинил-, циклический(1 \rightarrow 14)-тиоэфир или их производное или аналог. В определенных вариантах осуществления рак включает распространенную солидную опухоль, глиобластому, рак желудка, рак кожи, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичка, рак щитовидной железы, рак головы и шеи, рак печени, рак почки, рак пищевода, рак яичника, рак толстой кишки, рак легкого, лимфому или рак мягких тканей. В определенных вариантах осуществления рак включает немелкоклеточный рак легкого, эпителиальную карциному яичника или аденокарциному поджелудочной железы. В определенных вариантах осуществления рак является рефрактерным к лечению терапевтическим количеством ингибитора полипептида, связывающего LIF.

[0014] В другом аспекте данного документа описан способ лечения индивидуума, страдающего от рака, предусматривающий введение индивидууму, страдающему от рака, эффективного количества: (a) антитела, которое специфически связывает лейкоз-ингибирующий фактор (LIF), содержащего: (i) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 1-3; (ii) определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 4 или 5; (iii) определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-

CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 6-8; (iv) определяющую комплементарность область 1 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 9 или 10; (v) определяющую комплементарность область 2 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 11 или 12; и (vi) определяющую комплементарность область 3 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13; и (b) антитела, связывающего PD-1.

[0015] В другом аспекте данного документа описан набор, содержащий: (a) полипептид, связывающий лейкоз-ингибирующий фактор (LIF); и (b) ингибитор передачи сигналов PD-1 (CD279), PDL-1 (CD274) или PDL-2 (CD273). В определенных вариантах осуществления полипептид, связывающий LIF, содержит фрагмент вариабельной области иммуноглобулина или константной области тяжелой цепи иммуноглобулина. В определенных вариантах осуществления полипептид, связывающий LIF, предусматривает антитело, которое специфически связывается с LIF. В определенных вариантах осуществления полипептид, связывающий LIF, содержит по меньшей мере одну каркасную область, полученную из каркасной области человеческого иммуноглобулина. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, является гуманизированным. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, является деиммунизированным. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, содержит две тяжелые цепи иммуноглобулина и две легкие цепи иммуноглобулина. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, представляет собой антитело IgG. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, представляет собой Fab, F(ab)₂, однодоменное антитело, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) или наноантитело. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, содержит: (a) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 1-3; (b) определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 4 или 5; (c) определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-

CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 6-8; (d) определяющую комплементарность область 1 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 9 или 10; (e) определяющую комплементарность область 2 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 11 или 12; и (f) определяющую комплементарность область 3 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, содержит: (a) последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 41, 42, 44 или 66; и (b) последовательность вариабельной области легкой цепи (VL) иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 45-48. В определенных вариантах осуществления последовательность VH на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 42; и последовательность VL на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46. В определенных вариантах осуществления последовательность VH идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 42; и последовательность VL идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, содержит: (a) последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 57-60 или 67; и (b) последовательность легкой цепи иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 61-64. В определенных вариантах осуществления антитело,

которое специфически связывается с LIF, связывается с K_D , составляющей менее приблизительно 200 пикомоль. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, связывается с K_D , составляющей менее приблизительно 100 пикомоль. В определенных вариантах осуществления ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 предусматривает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В определенных вариантах осуществления антитело специфически связывает PD-1. В определенных вариантах осуществления антитело предусматривает пембролизумаб, ниволумаб, AMP-514, спартализумаб или их фрагмент, связывающий PD-1. В определенных вариантах осуществления антитело специфически связывает PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления антитело предусматривает дурвалумаб, атезолизумаб, авелумаб, BMS-936559 или FAZ053 или их фрагмент, связывающий PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 предусматривает Fc-слитый белок, который связывает PD-1, PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления Fc-слитый белок предусматривает AMP-224 или его фрагмент, связывающий PD-1. В определенных вариантах осуществления ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 предусматривает низкомолекулярный ингибитор PD-1, PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления низкомолекулярный ингибитор передачи сигналов посредством PD-1, PDL-1 или PDL-2 предусматривает: N-{2-[(2-метокси-6-[(2-метил[1,1'-бифенил]-3-ил)метокси]пиридин-3-ил)метил]амино}этил}ацетамид (BMS 202); (2-((3-цианобензил)окси)-4-((3-(2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-ил)-2-метилбензил)окси)-5-метилбензил)-D-серина гидрохлорид; (2R,4R)-1-(5-хлор-2-((3-цианобензил)окси)-4-((3-(2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-ил)-2-метилбензил)окси)бензил)-4-гидроксипирролидин-2-карбоновую кислоту; 3-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-1-фенилиндол; 3-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-1-фенил-1H-индол; L- α -глутамин, N2, N6-бис(L-серил-L-аспарагинил-L-треонил-L-серил-L- α -глутамил-L-серил-L-фенилаланил)-L-лизил-L-фенилаланил-L-аргинил-L-валил-L-треонил-L-глутаминил-L-лейцил-L-аланил-L-пролил-L-лизил-L-аланил-L-глутаминил-L-изолейцил-L-лизил; (2S)-1-[[2,6-диметокси-4-[(2-метил[1,1'-бифенил]-3-ил)метокси]фенил]метил]-2-пиперидинкарбоновую кислоту; глицинамид, N-(2-меркаптоацетил)-L-фенилаланил-N-метил-L-аланил-L-аспарагинил-L-пролил-L-гистидил-L-лейцил-N-метилглицил-L-триптофил-L-серил-L-триптофил-N-метил-L-норлейцил-N-метил-L-норлейцил-L-аргинил-L-цистеинил-, циклический(1 \rightarrow 14)-тиоэфир или их производное или аналог. В

определенных вариантах осуществления набор дополнительно содержит фармацевтически приемлемые вспомогательное вещество, носитель или разбавитель.

[0016] В другом аспекте данного документа описана композиция, содержащая: (a) полипептид, связывающий лейкоз-ингибирующий фактор (LIF); и (b) ингибитор передачи сигналов PD-1 (CD279), PDL-1 (CD274) или PDL-2 (CD273). В определенных вариантах осуществления полипептид, связывающий LIF, содержит фрагмент вариабельной области иммуноглобулина или константной области тяжелой цепи иммуноглобулина. В определенных вариантах осуществления полипептид, связывающий LIF, предусматривает антитело, которое специфически связывается с LIF. В определенных вариантах осуществления полипептид, связывающий LIF, содержит по меньшей мере одну каркасную область, полученную из каркасной области человеческого иммуноглобулина. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, является гуманизированным. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, является деиммунизированным. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, содержит две тяжелые цепи иммуноглобулина и две легкие цепи иммуноглобулина. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, представляет собой антитело IgG. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, представляет собой Fab, F(ab)₂, однодоменное антитело, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) или наноантитело. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, содержит: (a) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 1-3; (b) определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 4 или 5; (c) определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 6-8; (d) определяющую комплементарность область 1 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 9 или 10; (e) определяющую комплементарность область 2 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 11 или 12; и (f) определяющую комплементарность область 3 легкой цепи иммуноглобулина (VL-

CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, содержит: (a) последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 41, 42, 44 или 66; и (b) последовательность вариабельной области легкой цепи (VL) иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 45-48. В определенных вариантах осуществления последовательность VH на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 42; и последовательность VL на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46. В определенных вариантах осуществления последовательность VH идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 42; и последовательность VL идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, содержит: (a) последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 57-60 или 67; и (b) последовательность легкой цепи иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 61-64. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, связывается с K_D , составляющей менее приблизительно 200 пикомоль. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, связывается с K_D , составляющей менее приблизительно 100 пикомоль. В определенных вариантах осуществления ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 предусматривает антитело или его фрагмент, связывающийся PD-1. В определенных вариантах осуществления антитело специфически связывает PD-1. В определенных вариантах осуществления антитело предусматривает

пембролизумаб, ниволумаб, AMP-514, спартализумаб или их фрагмент, связывающий PD-1. В определенных вариантах осуществления антитело специфически связывает PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления антитело предусматривает дурвалумаб, атезолизумаб, авелумаб, BMS-936559 или FAZ053 или их фрагмент, связывающий PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 предусматривает Fc-слитый белок, который связывает PD-1, PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления Fc-слитый белок предусматривает AMP-224 или его фрагмент, связывающий PD-1. В определенных вариантах осуществления ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 предусматривает низкомолекулярный ингибитор PD-1, PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления низкомолекулярный ингибитор передачи сигналов посредством PD-1 (CD279), PDL-1 (CD274) или PDL-2 (CD273) предусматривает: N-{2-[(2-метокси-6-[(2-метил[1,1'-бифенил]-3-ил)метокси]пиридин-3-ил)метил)амино]этил}ацетамид (BMS 202); (2-((3-цианобензил)окси)-4-((3-(2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-ил)-2-метилбензил)окси)-5-метилбензил)-D-серина гидрохлорид; (2R,4R)-1-(5-хлор-2-((3-цианобензил)окси)-4-((3-(2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-ил)-2-метилбензил)окси)бензил)-4-гидроксипирролидин-2-карбоновую кислоту; 3-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-1-фенилиндол; 3-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-1-фенил-1H-индол; L- α -глутамин, N2, N6-бис(L-серил-L-аспарагинил-L-треонил-L-серил-L- α -глутамил-L-серил-L-фенилаланил)-L-лизил-L-фенилаланил-L-аргинил-L-валил-L-треонил-L-глутаминил-L-лейцил-L-аланил-L-пролил-L-лизил-L-аланил-L-глутаминил-L-изолейцил-L-лизил; (2S)-1-[[2,6-диметокси-4-[(2-метил[1,1'-бифенил]-3-ил)метокси]фенил]метил]-2-пиперидинкарбоновую кислоту; глицинамид, N-(2-меркаптоацетил)-L-фенилаланил-N-метил-L-аланил-L-аспарагинил-L-пролил-L-гистидил-L-лейцил-N-метилглицил-L-триптофил-L-серил-L-триптофил-N-метил-L-норлейцил-N-метил-L-норлейцил-L-аргинил-L-цистеинил-, циклический(1 \rightarrow 14)-тиоэфир или их производное или аналог. В определенных вариантах осуществления композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемые вспомогательное вещество, носитель или разбавитель.

[0017] В другом аспекте данного документа описан способ лечения индивидуума, страдающего от рака, предусматривающий введение индивидууму, страдающему от рака, эффективного количества комбинации: (а) антитела, которое специфически связывает лейкоз-ингибирующий фактор (LIF), содержащего: (i) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 1-3; (ii) определяющую

комплементарность область 2 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 4 или 5; (iii) определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 6-8; (iv) определяющую комплементарность область 1 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 9 или 10; (v) определяющую комплементарность область 2 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 11 или 12; и (vi) определяющую комплементарность область 3 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13; и антитела, связывающего PD-1 или PDL-1. В определенных вариантах осуществления способ предусматривает введение эффективного количества антитела, которое специфически связывает LIF, индивидууму, страдающему от рака. В определенных вариантах осуществления способ предусматривает введение эффективного количества антитела, которое специфически связывает PD-1 или PDL-1, индивидууму, страдающему от рака. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывает LIF, и антитело, связывающее PD-1 или PDL-1, вводят по отдельности. В определенных вариантах осуществления рак представляет собой мультиформную глиобластому (GBM), NSCLC (немелкоклеточную карциному легкого), рак яичника, колоректальный рак, рак щитовидной железы или рак поджелудочной железы.

[0018] В другом аспекте данного документа описан способ уменьшения количества проопухолевых макрофагов, ассоциированных с опухолью (TAM), у индивидуума, страдающего от рака, предусматривающий введение индивидууму, страдающему от рака, эффективного количества комбинации: (a) антитела, которое специфически связывает лейкоз-ингибирующий фактор (LIF), содержащего: (i) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 1-3; (ii) определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 4 или 5; (iii) определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 6-8; (iv) определяющую комплементарность область 1 легкой цепи

иммуноглобулина (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 9 или 10; (v) определяющую комплементарность область 2 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 11 или 12; и (vi) определяющую комплементарность область 3 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13; и антитела, связывающего PD-1 или PDL-1. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывает LIF, и антитело, связывающее PD-1 или PDL-1, вводят по отдельности. В определенных вариантах осуществления ТАМ демонстрирует экспрессию на клеточной поверхности любых 1, 2 или 3 молекул, выбранных из списка, состоящего из CD11b, CD206 и CD163.

[0019] В другом аспекте данного документа описан способ индуцирования иммунологической памяти у индивидуума, страдающего от рака, предусматривающий введение индивидууму, страдающему от рака, эффективного количества комбинации: (a) антитела, которое специфически связывает лейкоз-ингибирующий фактор (LIF), содержащего: (i) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 1-3; (ii) определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 4 или 5; (iii) определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 6-8; (iv) определяющую комплементарность область 1 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 9 или 10; (v) определяющую комплементарность область 2 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 11 или 12; и (vi) определяющую комплементарность область 3 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13; и антитела, связывающего PD-1 или PDL-1. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывает LIF, и антитело, связывающее PD-1 или PDL-1, вводят по отдельности. В определенных вариантах осуществления иммунологическая память опосредована CD8⁺ Т-клетками. В определенных вариантах осуществления иммунологическая память опосредована CD4⁺ Т-клетками.

[0020] В другом аспекте данного документа описан способ увеличения количества Т-лимфоцитов в опухоли, предусматривающий введение индивидууму, страдающему от опухоли, эффективного количества комбинации: (а) антитела, которое специфически связывает лейкоз-ингибирующий фактор (LIF), содержащего: (i) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 1-3; (ii) определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 4 или 5; (iii) определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 6-8; (iv) определяющую комплементарность область 1 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 9 или 10; (v) определяющую комплементарность область 2 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 11 или 12; и (vi) определяющую комплементарность область 3 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13; и антитела, связывающего PD-1 или PDL-1. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывает LIF, и антитело, связывающее PD-1 или PDL-1, вводят по отдельности. В определенных вариантах осуществления Т-лимфоциты предусматривают CD8+ Т-клетки. В определенных вариантах осуществления Т-лимфоциты предусматривают CD4+ Т-клетки.

[0021] В другом аспекте данного документа описано применение антитела, связывающего лейкоз-ингибирующий фактор (LIF), в комбинации с ингибитором передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 для лечения рака у индивидуума, где антитело, связывающее LIF, содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 90% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 42; и вариабельную область легкой цепи (VL) иммуноглобулина, которая на по меньшей мере приблизительно 90% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46. В определенных вариантах осуществления антитело, связывающее LIF, и ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводят индивидууму в отдельных составах. В определенных вариантах осуществления антитело, связывающее LIF, и ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1

или PDL-2 вводят индивидууму в одном и том же составе. В определенных вариантах осуществления антитело, связывающее LIF, вводят индивидууму до введения индивидууму ингибитора передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводят индивидууму до введения индивидууму антитела, связывающего LIF. В определенных вариантах осуществления ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводят индивидууму одновременно с введением индивидууму антитела, связывающего LIF. В определенных вариантах осуществления антитело, связывающее LIF, является гуманизированным. В определенных вариантах осуществления последовательность VH идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 42; и последовательность VL идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46. В определенных вариантах осуществления рак включает распространенную солидную опухоль, глиобластому, рак желудка, рак кожи, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичка, рак щитовидной железы, рак головы и шеи, рак печени, рак почки, рак пищевода, рак яичника, рак толстой кишки, рак легкого, лимфому, рак мягких тканей или любую их комбинацию. В определенных вариантах осуществления рак включает немелкоклеточный рак легкого. В определенных вариантах осуществления рак включает протоковую аденокарциному поджелудочной железы. В определенных вариантах осуществления лечение рака уже осуществляли посредством ингибитора контрольных точек иммунного ответа. В определенных вариантах осуществления лечение рака ранее осуществляли с помощью антитела к LIF. В определенных вариантах осуществления ингибитор контрольных точек иммунного ответа представляет собой ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 представляет собой антитело или его фрагмент, которые связываются с PD-1.

[0022] В другом аспекте данного документа описан способ лечения индивидуума, страдающего от рака, предусматривающий введение индивидууму, страдающему от рака, эффективного количества комбинации: (а) антитела, которое специфически связывает лейкоз-ингибирующий фактор (LIF), содержащего: (i) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 1-3; (ii) определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 4 или 5;

(iii) определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 6-8; (iv) определяющую комплементарность область 1 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 9 или 10; (v) определяющую комплементарность область 2 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 11 или 12; и (vi) определяющую комплементарность область 3 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13; и (b) ингибитора передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления антитело, связывающее LIF, содержит: (a) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 1; (b) определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4; (c) определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 6; (d) определяющую комплементарность область 1 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 9; и (e) определяющую комплементарность область 2 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 11. В определенных вариантах осуществления антитело, связывающее LIF, содержит: (a) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3; (b) определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 5; (c) определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 7; (d) определяющую комплементарность область 1 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 10; (e) определяющую комплементарность область 2 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 12; и (f) определяющую комплементарность область 3 легкой цепи иммуноглобулина

(VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13. В определенных вариантах осуществления антитело, связывающее LIF, и ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводят индивидууму в отдельных составах. В определенных вариантах осуществления антитело, связывающее LIF, и ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводят индивидууму в одном и том же составе. В определенных вариантах осуществления антитело, связывающее LIF, вводят индивидууму до введения индивидууму ингибитора передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводят индивидууму до введения индивидууму антитела, связывающего LIF. В определенных вариантах осуществления ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводят индивидууму одновременно с введением индивидууму антитела, связывающего LIF. В определенных вариантах осуществления антитело, связывающее LIF, является гуманизированным. В определенных вариантах осуществления антитело, связывающее LIF, содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 90% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 42; и вариабельную область легкой цепи (VL) иммуноглобулина, которая на по меньшей мере приблизительно 90% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46. В определенных вариантах осуществления последовательность VH идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 42; и последовательность VL идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46. В определенных вариантах осуществления рак включает распространенную солидную опухоль, глиобластому, рак желудка, рак кожи, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичка, рак щитовидной железы, рак головы и шеи, рак печени, рак почки, рак пищевода, рак яичника, рак толстой кишки, рак легкого, лимфому, рак мягких тканей или любую их комбинацию. В определенных вариантах осуществления рак включает немелкоклеточный рак легкого. В некоторых вариантах реализации рак включает протоковую аденокарциному поджелудочной железы. В определенных вариантах осуществления лечение рака ранее осуществляли с помощью ингибитора контрольных точек иммунного ответа. В определенных вариантах осуществления лечение рака ранее осуществляли с помощью антитела к LIF. В определенных вариантах осуществления ингибитор контрольных точек иммунного ответа представляет собой ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления ингибитор

передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 представляет собой антитело или его фрагмент, которые связываются с PD-1. В определенных вариантах осуществления антитело предусматривает пембролизумаб, ниволумаб, AMP-514, тислелизумаб, спартализумаб или их фрагмент, связывающий PD-1. В определенных вариантах осуществления антитело специфически связывает PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления антитело предусматривает дурвалумаб, атезолизумаб, авелумаб, BMS-936559 или FAZ053 или их фрагмент, связывающий PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 предусматривает Fc-слитый белок, который связывает PD-1, PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления Fc-слитый белок предусматривает AMP-224 или его фрагмент, связывающий PD-1. В определенных вариантах осуществления ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 предусматривает низкомолекулярный ингибитор PD-1, PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления низкомолекулярный ингибитор передачи сигналов посредством PD-1, PDL-1 или PDL-2 предусматривает: N-{2-[(2-метокси-6-[(2-метил[1,1'-бифенил]-3-ил)метокси]пиридин-3-ил)метил]амино}этил}ацетамид (BMS 202); (2-((3-цианобензил)окси)-4-((3-(2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-ил)-2-метилбензил)окси)-5-метилбензил)-D-серина гидрохлорид; (2R,4R)-1-(5-хлор-2-((3-цианобензил)окси)-4-((3-(2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-ил)-2-метилбензил)окси)бензил)-4-гидроксипирролидин-2-карбоновую кислоту; 3-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-1-фенилиндол; 3-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-1-фенил-1H-индол; L-α-глутамин,N2,N6-бис(L-серил-L-аспарагинил-L-треонил-L-серил-L-α-глутамил-L-серил-L-фенилаланил)-L-лизил-L-фенилаланил-L-аргинил-L-валил-L-треонил-L-глутаминил-L-лейцил-L-аланил-L-пролил-L-лизил-L-аланил-L-глутаминил-L-изолейцил-L-лизил; (2S)-1-[[2,6-диметокси-4-[(2-метил[1,1'-бифенил]-3-ил)метокси]фенил]метил]-2-пиперидинкарбоновую кислоту; глицинамид,N-(2-меркаптоацетил)-L-фенилаланил-N-метил-L-аланил-L-аспарагинил-L-пролил-L-гистидил-L-лейцил-N-метилглицил-L-триптофил-L-серил-L-триптофил-N-метил-L-норлейцил-N-метил-L-норлейцил-L-аргинил-L-цистеинил-,циклический(1→14)-тиозфир или их производное или аналог.

[0023] В другом аспекте данного документа описан способ лечения индивидуума, страдающего от рака, предусматривающий введение индивидууму, страдающему от рака, эффективного количества комбинации: (а) антитела, которое специфически связывает лейкоз-ингибирующий фактор (LIF), содержащего: (i) переменную область тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая

на по меньшей мере приблизительно 90% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 42; и (ii) варибельную область легкой цепи (VL) иммуноглобулина, которая на по меньшей мере приблизительно 90% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46; и (b) ингибитора передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления последовательность VH идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 42; и последовательность VL идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46. В определенных вариантах осуществления антитело, связывающее LIF, и ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводят индивидууму в отдельных составах. В определенных вариантах осуществления антитело, связывающее LIF, и ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводят индивидууму в одном и том же составе. В определенных вариантах осуществления антитело, связывающее LIF, вводят индивидууму до введения индивидууму ингибитора передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводят индивидууму до введения индивидууму антитела, связывающего LIF. В определенных вариантах осуществления ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводят индивидууму одновременно с введением индивидууму антитела, связывающего LIF. В определенных вариантах осуществления антитело, связывающее LIF, является гуманизированным. В определенных вариантах осуществления рак включает распространенную солидную опухоль, глиобластому, рак желудка, рак кожи, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичка, рак щитовидной железы, рак головы и шеи, рак печени, рак почки, рак пищевода, рак яичника, рак толстой кишки, рак легкого, лимфому, рак мягких тканей или любую их комбинацию. В определенных вариантах осуществления рак включает немелкоклеточный рак легкого. В определенных вариантах осуществления рак включает протоковую аденокарциному поджелудочной железы. В определенных вариантах осуществления лечение рака ранее осуществляли с помощью ингибитора контрольных точек иммунного ответа. В определенных вариантах осуществления лечение рака ранее осуществляли с помощью антитела к LIF. В определенных вариантах осуществления ингибитор контрольных точек иммунного ответа представляет собой ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 представляет собой антитело или его фрагмент, которые связываются с PD-1. В определенных вариантах осуществления антитело предусматривает

пембролизумаб, ниволумаб, AMP-514, тислелизумаб, спартализумаб или их фрагмент, связывающий PD-1. В определенных вариантах осуществления антитело специфически связывает PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления антитело предусматривает дурвалумаб, атезолизумаб, авелумаб, BMS-936559 или FAZ053 или их фрагмент, связывающий PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 предусматривает Fc-слитый белок, который связывает PD-1, PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления Fc-слитый белок предусматривает AMP-224 или его фрагмент, связывающий PD-1. В определенных вариантах осуществления ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 предусматривает низкомолекулярный ингибитор PD-1, PDL-1 или PDL-2. В определенных вариантах осуществления низкомолекулярный ингибитор передачи сигналов посредством PD-1, PDL-1 или PDL-2 предусматривает: N-{2-[(2-метокси-6-[(2-метил[1,1'-бифенил]-3-ил)метокси]пиридин-3-ил)метил)амино]этил}ацетамид (BMS 202); (2-((3-цианобензил)окси)-4-((3-(2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-ил)-2-метилбензил)окси)-5-метилбензил)-D-серина гидрохлорид; (2R,4R)-1-(5-хлор-2-((3-цианобензил)окси)-4-((3-(2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-ил)-2-метилбензил)окси)бензил)-4-гидроксипирролидин-2-карбоновую кислоту; 3-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-1-фенилиндол; 3-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-1-фенил-1H-индол; L- α -глутамин, N2, N6-бис(L-серил-L-аспарагинил-L-треонил-L-серил-L- α -глутамил-L-серил-L-фенилаланил)-L-лизил-L-фенилаланил-L-аргинил-L-валил-L-треонил-L-глутаминил-L-лейцил-L-аланил-L-пролил-L-лизил-L-аланил-L-глутаминил-L-изолейцил-L-лизил; (2S)-1-[[2,6-диметокси-4-[(2-метил[1,1'-бифенил]-3-ил)метокси]фенил]метил]-2-пиперидинкарбоновую кислоту; глицинамид, N-(2-меркаптоацетил)-L-фенилаланил-N-метил-L-аланил-L-аспарагинил-L-пролил-L-гистидил-L-лейцил-N-метилглицил-L-триптофил-L-серил-L-триптофил-N-метил-L-норлейцил-N-метил-L-норлейцил-L-аргинил-L-цистеинил-, циклический(1 \rightarrow 14)-тиоэфир или их производное или аналог.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0024] На **фиг. 1** представлены результаты вестерн-блоттинга, демонстрирующие ингибирование LIF-индуцированного фосфорилирования STAT3 различными гуманизированными антителами к LIF.

[0025] На **фиг. 2A** и **2B** представлены результаты вестерн-блоттинга, демонстрирующие ингибирование LIF-индуцированного фосфорилирования STAT3 гуманизированными и исходными антителами 5D8.

[0026] На **фиг. 3А** показана IC_{50} для ингибирования LIF в клетках U-251 с использованием антитела h5D8.

[0027] На **фиг. 3В** показаны репрезентативные IC_{50} , определенные по кривой зависимости доза-эффект ингибирования pSTAT3 посредством r5D8 и h5D8 в условиях стимуляции эндогенным LIF. Показаны репрезентативные кривые (n=1 h5D8, n=2 r5D8).

[0028] На **фиг. 4** представлены результаты вестерн-блоттинга, демонстрирующие ингибирование LI-индуцированного фосфорилирования STAT3 различными моноклональными антителами, описанных в данном документе.

[0029] На **фиг. 5** представлены результаты иммуногистохимического окрашивания и количественная оценка экспрессии LIF в мультиформной глиобластоме (GBM), NSCLC (немелкоклеточной карциноме легкого), раке яичника, колоректальном раке и опухолях поджелудочной железы от пациентов-людей. Горизонтальные черты представляют среднее значение \pm SEM.

[0030] На **фиг. 6А** представлен график, показывающий результаты эксперимента, проведенного на мышинной модели немелкоклеточного рака легкого с использованием гуманизированного антитела 5D8.

[0031] На **фиг. 6В** представлен график, показывающий результаты эксперимента, проведенного на мышинной модели немелкоклеточного рака легкого с использованием антитела r5D8.

[0032] На **фиг. 7А** показан эффект r5D8 в отношении ингибирования клеток U251 в ортотопической мышинной модели GBM. Количественная оценка показана для дня 26.

[0033] На **фиг. 7В** показаны данные по мышам, которым инокулировали человеческими клетками U251 GBM, экспрессирующие люциферазу, а затем обрабатывали с использованием 100, 200 или 300 мкг h5D8 или среды-носителя два раза в неделю. Размер опухоли определяли по биолюминесценции (Xenogen IVIS Spectrum) в день 7. На графике показаны отдельные значения измерения опухолей, при этом горизонтальные черты показывают среднее значение \pm SEM. Статистическую значимость рассчитывали с использованием непарного непараметрического U-критерия Манна-Уитни.

[0034] На **фиг. 8А** показан эффект r5D8 в отношении ингибирования роста клеток рака яичника в сингенной мышинной модели.

[0035] На **фиг. 8В** показаны значения измерения отдельных опухолей в день 25.

[0036] На **фиг. 8С** демонстрируется, что h5D8 показывает значительное уменьшение роста опухоли при введении в дозе 200 мкг/мышь два раза в неделю ($p < 0,05$). Символы представляют собой среднее значение \pm SEM, статистическая значимость сравнивается со

средой-носителем (посредством непарного непараметрического U-критерия Манна-Уитни).

[0037] На **фиг. 9А** показан эффект r5D8 в отношении ингибирования роста клеток колоректального рака в сингенной мышинной модели.

[0038] На **фиг. 9В** показаны значения измерения отдельных опухолей в день 17.

[0039] На **фиг. 10А** показано уменьшение инфильтрации макрофагами участков локализации опухоли в ортотопической мышинной модели GBM с репрезентативным изображением и количественным определением клеток CCL22+.

[0040] На **фиг. 10В** показано уменьшение инфильтрации макрофагами в человеческой модели органотипической культуры тканевых срезов. Показаны репрезентативное изображение (слева) и количественное определение (справа).

[0041] На **фиг. 10С** показано уменьшение инфильтрации макрофагами участков локализации опухоли в сингенной мышинной модели рака яичника с репрезентативным изображением и количественным определением клеток CCL22+.

[0042] На **фиг. 10D** показано уменьшение инфильтрации макрофагами участков локализации опухоли в сингенной мышинной модели колоректального рака с репрезентативным изображением и количественным определением клеток CCL22+.

[0043] На **фиг. 10Е** показан воспалительный фенотип ассоциированных с опухолью макрофагов (TAM), полученных из опухолей, обработанных с использованием h5D8 (15 мг/кг, 2QW), в день 25 (конечная точка). TAM в обработанных опухолях поляризованы в направлении провоспалительного фенотипа M1. Статистическую значимость определяли с помощью непарного t-критерия.

[0044] На **фиг. 10F** показаны данные экспрессии генов моноцитов, культивированных в кондиционированной среде клеток с нокдауном по LIF.

[0045] На **фиг. 11А** показано увеличение числа немиелоидных эффекторных клеток в сингенной мышинной модели рака яичника после обработки с использованием r5D8.

[0046] На **фиг. 11В** показано увеличение числа немиелоидных эффекторных клеток в сингенной мышинной модели колоректального рака после обработки с использованием r5D8.

[0047] На **фиг. 11С** показано снижение процентного содержания CD4+ T_{REG}-клеток в мышинной модели рака NSCLC после обработки с использованием r5D8.

[0048] На **фиг. 12** показаны данные по мышам с опухолями CT26, которых два раза в неделю обрабатывали с использованием PBS (контроль) или r5D8, вводимыми интраперитонеально в присутствии или в отсутствие истощающих антител к CD4 и CD8.

График показывает отдельные значения измерения опухолей в день 13, выраженные в виде среднего объема опухоли + SEM. Статистические различия между группами определяли с использованием непарного непараметрического U-критерия Манна-Уитни. R5D8 ингибировало рост опухолей CT26 (* $p < 0,05$). Ингибирование роста опухоли за счет r5D8 было значительно снижено в присутствии истощающих антител к CD4 и CD8 (**** $p < 0,0001$).

[0049] На **фиг. 13A** продемонстрирован обзор сокристаллической структуры h5D8 Fab в комплексе с LIF. Сайт взаимодействия gp130 картирован на поверхности LIF (заштрихован темным).

[0050] На **фиг. 13B** продемонстрированы подробные взаимодействия между LIF и h5D8 и показаны остатки, образующие солевые мостики, и остатки h5D8 со скрытой площадью поверхности более 100 \AA^2 .

[0051] На **фиг. 14A** продемонстрирована суперпозиция пяти кристаллических структур h5D8 Fab и указана высокая степень сходства, несмотря на то, что они кристаллизовались в разных химических условиях.

[0052] На **фиг. 14B** продемонстрирована обширная сеть ван-дер-ваальсовых взаимодействий, опосредованных непарным Cys100. Этот остаток высокоупорядочен, участвует в образовании конформаций HCDR1 и HCDR3 и не вовлечен в нежелательную перестановку дисульфидных связей. Расстояния между остатками показаны пунктирными линиями и отмечены.

[0053] На **фиг. 15A** посредством ELISA продемонстрировано связывание мутантов h5D8 C100 с LIF человека.

[0054] На **фиг. 15B** посредством ELISA продемонстрировано связывание мутантов h5D8 C100 с LIF мыши.

[0055] На **фиг. 16A** посредством Octet продемонстрировано, что h5D8 не блокирует связывание между LIF и LIFR. Последовательное связывание h5D8 с LIF с последующим связыванием с LIFR.

[0056] На **фиг. 16B** и **16C** продемонстрирован ELISA-анализ связывания комплексов LIF/mAb с иммобилизованным LIFR или gp130. Сигналы видоспецифических конъюгированных с пероксидазой антител к IgG (к человеческому для (-) и h5D8, к крысиному для r5D8 и B09), детектирующих антительную часть комплексов mAb/LIF, связывающуюся с LIFR (**фиг. 16B**) или gp130 (**фиг. 16C**), иммобилизованных на планшетах.

[0057] На **фиг. 17А** и **17В** продемонстрирована экспрессия мРНК LIF (**фиг. 16А**) или LIFR (**фиг. 16В**) в 72 различных тканях человека.

[0058] На **фиг. 18А-Д** показаны данные, полученные от мышей с опухолями СТ26, обработанных с использованием h5D8 и антитела к PD-1, демонстрирующие значительно более медленный рост по сравнению с опухолями, обработанными с использованием антитела к PD-1. Аналогичные результаты были получены в трех независимых экспериментах по эффективности в отношении СТ26. На **фиг. 18А** показана динамика роста опухоли, а на **фиг. 18В** показаны отдельные точки данных на 24 день. Статистическую значимость определили посредством критерия Манна-Уитни. На **фиг. 18С** показаны графики выживаемости Каплана-Мейера для мышей, обработанных антителом к PD1 (RMP1-14) и h5D8/антителом к PD1, с опухолью СТ26 или МС38 (обработку антителом к PD1 начали на 10 день). Внизу показаны графики выживаемости Каплана-Мейера для контрольных (IgG) и получавших монотерапию с использованием h5D8 мышей с опухолями СТ26 или МС38. На **фиг. 18Д** показан объем опухоли у мышей с долгосрочной выживаемостью без опухоли СТ26 после повторной имплантации опухоли.

[0059] На **фиг. 19А-Д** показаны результаты анализа с использованием проточной цитометрии, обнаружившего количество функциональных CD8 Т-клеток в опухолях, обработанных с использованием h5D8/антитела к PD-1. На **фиг. 19А** показана функция CD8 Т-клеток, определенная на основе их способности продуцировать IFN γ в ответ на опухоль-ассоциированный пептид (gp70). На **фиг. 19В** показан репрезентативный график данных FACS. Значимость определяли с помощью непарного t-критерия. На **фиг. 19С** показаны: слева – частота встречаемости CD8⁺ TIL от общего количества CD45⁺ иммунного инфильтрата в опухолях СТ26 после терапии ($n=7$ /группа); справа – частота встречаемости IFN- γ ⁺ CD8⁺ TIL после стимуляции ex vivo пептидом, соответствующим ограниченному H2-L^d эпитопу gp70 (а.к. 423-431; AH1) из MuLV, экспрессируемого опухолями СТ26 ($n=7$ /группа). На **фиг. 19Д** показаны: слева – частота встречаемости CD8⁺ TIL от общего количества CD45⁺ иммунного инфильтрата в опухолях МС38 после терапии ($n=6-7$ /группа). Справа – частота встречаемости IFN- γ ⁺ CD8⁺ TIL после стимуляции ex vivo пептидом, соответствующим ограниченному H2-K^b эпитопу p15e (а.к. 604–611) из MuLV, экспрессируемого опухолями МС38 ($n=6-7$ /группа).

[0060] На **фиг. 20А-Р** показано, что блокирование LIF замедляет рост опухоли и регулирует инфильтрацию иммунными клетками в моделях GBM и рака яичника, экспрессирующих высокие уровни LIF. На **фиг. 20А** показано распределение экспрессии

мРНК LIF (\log_2 RSEM) по 28 отдельным солидным опухолям. Черная линия представляет собой граничное значение между низким уровнем экспрессии и фоновым шумом. На нижней панели показаны значения корреляции (значения R^2 Пирсона) между экспрессией LIF и относительной численностью TAM и Treg (регуляторных Т-клеток) на основе анализа ssGSEA генных сигнатур разных типов иммунных клеток. Значения корреляции показаны только в том случае, когда корреляция значима (скорректированное Р-значение $< 0,1$). На **фиг. 20B** показаны графики линейной регрессии экспрессии LIF и относительной численности (анализ ssGSEA, масштабированный от 0 до 1 для визуализации) TAM и Treg в когортах с GBM, аденокарциномой предстательной железы (PRAD), карциномой щитовидной железы (THCA) и карциномой яичника (OV). Заштрихованная область представляет собой доверительные интервалы оценки регрессии. На **фиг. 20C, 20H и 20K** показан опухолевый рост в моделях GL261N (**20C**), RCAS (**20H**) и ID8 (**20K**), измеренный как общий поток (фотон/сек) или объем брюшной полости (мм^3) соответственно. Показана схема экспериментальной процедуры. Обработку с использованием антитела к LIF (r5D8) или изотипического контроля (IgG) начинали в день оперативного вмешательства (GL261N и RCAS) или через 14 дней после инокуляции (ID8). На **фиг. 20D и 20L** показаны репрезентативные процентные доли иммуногистохимического окрашивания по p-STAT3, Ki67, CC3 и CD8 для опухолей GL261N (**20D**) и ID8 (**20L**). На **фиг. 20E - 20F, 20I - 20J и 20M - 20N** показано содержание в процентах $\text{CD11b}^+ \text{F4/80}^+ \text{CD163}^+ \text{CD206}^+ \text{MHCII}^{\text{low}}$ TAM (**20E, 20M**) или $\text{CD11b}^+ \text{Ly6G}^- \text{Ly6C}^- \text{CD163}^+ \text{CD206}^+ \text{MHCII}^{\text{low}}$ (**20I**) и CD8^+ Т-клеток ($\text{CD3}^+ \text{CD8}^+$) в опухолях GL261N (**20F**), RCAS (**20J**) и ID8 (**20N**), проанализированных с помощью проточной цитометрии. На **фиг. 20G и 20P** показана общая выживаемость моделей GL261N (**20G**) и ID8 (**20P**), обработанных с использованием антитела к LIF (r5D8) или IgG. Динамика изменения объема брюшной полости у мышей ID8, обработанных с использованием антитела к LIF (r5D8) или IgG (**20O**). Данные представляют собой среднее значение \pm SEM. Статистические анализы выполнены с использованием Т-критерия Манна-Уитни и лог-рангового критерия. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$.

[0061] На **фиг. 21A-G** показано, что LIF регулирует CXCL9, CCL2, CD206 и CD163 у TAM. На **фиг. 21A** показан анализ дифференциальной экспрессии клеток CD11b^+ , выделенных у мышей ID8, обработанных с использованием антитела к LIF (r5D8), по сравнению с контролем. Показана диаграмма рассеяния (volcano), представляющая гены, которые в значительной степени (Q -значение $< 0,1$) сверхэкспрессируются и в значительной степени недоэкспрессируются. Показана тепловая карта, представляющая

значения экспрессии указанных генов, при этом каждый столбец представляет анализируемый образец, а каждая строка представляет ген. Последний столбец представляет кратное \log_2 изменение ($\log_2 FC$) экспрессии гена. На **фиг. 21B** показана экспрессия на уровне мРНК указанных генов в выделенных клетках $CD11b^+$ из опухолей ID8 и GL261N, обработанных или необработанных с использованием антитела к LIF (r5D8). На **фиг. 21C** показаны процентное содержание и средняя интенсивность флуоресценции $CCL2^+$ и $CXCL9^+$ в TAM ($CD11b^+ Ly6G^- Ly6C^-$) из опухолей GL261N, обработанных или необработанных с использованием антитела к LIF (r5D8). На **фиг. 21D** показано процентное содержание дважды положительных клеток по сравнению с клетками, положительными по маркерам TAM. Количественное определение $CXCL9$ относится к общему количеству клеток. На **фиг. 21E** показано количественное определение иммуногистохимического окрашивания указанных маркеров из 20 опухолей GBM. Были рассчитаны корреляции между окрашиванием LIF (ось y) и окрашиванием $CCL2$, $CD206$, $CD163$ и $CXCL9$ (ось x) с помощью коэффициентов R-квадрат (R^2). На **фиг. 21F** показан рост опухоли GL261N у мышей $CXCL9^{-/-}$ и $CCL2^{-/-}$ или мышей, обработанных с использованием указанных антител, данные представлены в виде общего потока (фотон/сек). На **фиг. 21G** показано кратное увеличение опухоль-инфильтрирующих $CD8^+$ Т-клеток при обработке указанными соединениями. Данные представляют собой среднее значение \pm SEM. Статистические анализы выполнены с использованием Т-критерия Манна-Уитни. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$.

[0062] На **фиг. 22A-H** показано, что LIF подавляет $CXCL9$ посредством эпигенетического сайленсинга и индуцирует $CCL2$ посредством активации STAT3. На **фиг. 22A** и **22B** показаны результаты анализа qRT-PCR указанных генов в BMDM BMDM предварительно инкубировали с 20 нг/мл LIF в течение 72 часов, а затем стимулировали с использованием 5 нг/мл $IFN\gamma$ или 10 мкг/мл IL-4 в течение 6 часов (**22A**) или с использованием 0,1, 0,5, 1 и 5 нг/мл $IFN\gamma$ в течение 24 часов (**22B**). На **фиг. 22C** показаны результаты анализа ELISA $CXCL9$ у BMDM, предварительно инкубированных с 20 нг/мл LIF и затем стимулированных с использованием 0,1 нг/мл $IFN\gamma$ в течение 24 часов. На **фиг. 22D** показаны результаты анализа ELISA $CXCL9$ у отсортированных по $CD11b^+$ клеток человека (77% $CD11b^+ CD14^+$, см. **фиг. 29A**) из GBM человека, культивированных с 20 нг/мл LIF в течение 72 часов, а затем с 0,1 нг/мл $IFN\gamma$ в течение 24 часов. На **фиг. 22E** показаны результаты ChIP-анализа триметил-гистона H3 (H3K27me3), EZH2 и ацетилгистона 4 (H4ac), который проводили на BMDM, обработанных с использованием 20 нг/мл LIF в течение 72 часов. На схеме показан анализируемый промоторный участок

CXCL9. На **фиг. 22F** показаны результаты анализа ELISA *CCL2* и уровни мРНК *CCL2* в BMDM, обработанных с использованием 20 нг/мл LIF в течение 6 и 24 часов. На **фиг. 22G** показаны результаты ChIP-анализа p-STAT3 в BMDM, стимулированных с использованием 20 нг/мл LIF в течение 15 мин. Представлено схематическое изображение сайта связывания STAT (SBS) в промоторе *CCL2*. Данные представляют собой среднее значение \pm SD и статистические анализы по *t*-критерию Стьюдента. На **фиг. 22H** показано процентное содержание дважды положительных клеток по отношению к клеткам Iba1⁺ и процентное содержание клеток *CXCL9*⁺ в органотипических срезах GBM (пациенты 1, 2, 3), инкубированных с 10 мкг/мл антитела к LIF (r5D8) в течение 3 дней, по отношению к общему количеству клеток. Данные представляют собой среднее значение для всех пациентов \pm SEM. Статистические анализы выполнены с использованием Т-критерия Манна-Уитни. *P < 0,05, **P < 0,01; ***P < 0,001; ****P < 0,0001.

[0063] На **фиг. 23A-I** показано, что блокирование LIF индуцирует инфильтрацию CD8⁺ Т-клетками опухоли в GBM человека, а комбинация блокирования с антителом к PD1 способствует регрессии опухоли. На **фиг. 23A** показано схематическое изображение экспериментальных процедур, выполненных с ксенотрансплантатами, полученных от пациентов с GBM, и с органотипическими моделях человека. На **фиг. 23B** показаны уровни экспрессии мРНК *CXCL9* и *CCL2* в органотипических образцах, обработанных с использованием антитела к LIF (r5D8) в течение 72 часов, а затем культивированных с PBMC в течение 24 часов (пациенты 4, 5, 6). На **фиг. 23C** показана кратность увеличения (FI) инфильтрирующих CD8⁺ Т-клеток, обнаруженных посредством проточной цитометрии в органотипических тканях, обработанных с использованием антитела к LIF (r5D8) в течение 72 часов, а затем культивированных с PBMC в течение 48 часов (пациенты 4, 5, 6). На **фиг. 23D** показана кратность увеличения (FI) инфильтрирующих CD8⁺ Т-клеток, обнаруженных посредством проточной цитометрии в органотипических тканях GBM, обработанных с использованием антитела к LIF (r5D8) и/или антитела к *CXCL9* в течение 72 часов, а затем культивированных с PBMC в течение 48 часов. На **фиг. 23E** показаны инфильтрирующие CD8⁺ Т-клетки в подкожно имплантированных образцах GBM у мышей NSG. На гистограмме представлено соотношение CD8⁺ Т-клеток, обнаруженных посредством проточной цитометрии в ткани, и CD8⁺ Т-клеток, обнаруженных в крови того же животного. Показаны четыре пациента (7, 8, 9, 10) с соответствующими PBMC. На **фиг. 23F** показана выживаемость мышей GL261N, обработанных с использованием антитела к LIF (r5D8), антитела к PD1 или их комбинации. Показана общая выживаемость, определенная по кривым Каплана-Мейера.

На **фиг. 23G** показан опухолевый рост в обработанной модели GL261N, представленный в виде кратного изменения размера опухоли между 13 и 6 днями после инокуляции (dpi). На **фиг. 23H** показана схема, представляющая экспериментальную процедуру инокуляции 3×10^5 клеток GL261N 6 мышам, с полной регрессией за счет обработки с использованием комбинации антитела к LIF (r5D8) и антитела к PD1. 10 наивным мышам параллельно инокулировали 3×10^5 клеток GL261N. На **фиг. 23I** схематически изображен эффект LIF в отношении инфильтрации опухоли CD8⁺ Т-клетками. Статистические анализы выполнены с использованием Т-критерия Манна-Уитни или лог-рангового критерия. *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001.

[0064] На **фиг. 24A-D** показана экспрессия LIF в опухолях. На **фиг. 24A** показано проведение иммуногистохимического анализа LIF в тканевых матрицах GBM человека и количественное определение степени окрашивания с использованием метода Н-балл. На **фиг. 24B** показаны результаты анализа ELISA LIF супернатанта из культур нейросфер 15 пациентов. На **фиг. 24C** и **фиг. 24D** показаны результаты анализа qRT-PCR указанных генов в CD45⁺ и CD45⁻ клетках, выделенных из опухолей GBM (**24C**) и опухолей GL261N (**24D**) человека.

[0065] На **фиг. 25A-J** показано, что блокирование LIF в мышинных моделях подавляет рост опухоли. На **фиг. 25A** показаны результаты qRT-PCR и ELISA LIF, проведенных на GL261, GL261N и GL261N CRISPR/LIF клетках. На **фиг. 25B** показан рост опухоли по общему потоку (фотон/сек) на 12 день после инокуляции у мышей, инокулированных GL261N и GL261N CRISPR/LIF. На **фиг. 25C** и **фиг. 25D** показано, что клетки ID8 были заражены лентивирусом rLKO.1 или двумя отдельными лентивирусами rLKO.1-shLIF. Экспрессию LIF определяли с помощью qRT-PCR и ELISA (**25C**). На **25D** показаны результаты по клеткам ID8, инокулированным в брюшную полость мышей. Показана схема обработки. Объем брюшной полости (мм³) измеряли на 40 день после инокуляции. На **фиг. 25E** показан рост опухоли GL261 у мышей, обработанных с использованием антитела к LIF (r5D8) или с использованием контроля IgG, на 12 день после инокуляции. На **фиг. 25F** показаны результаты по клеткам GL261N, инокулированным мышам C57BL/6, и двум моделям иммунодефицита – NOD SCID и RAG1^{-/-}. Показана схема обработки. Рост опухоли измеряли на 12 день после инокуляции. На **фиг. 25G - 25J** показано процентное содержание NK-клеток (CD335⁺) и Treg (CD3⁺CD4⁺FoxP3⁺), гейтированных по популяции CD4⁺ Т-клеток в опухолях GL261N (**25G - 25H**) и ID8 (**25I - 25J**). Данные получены посредством проточной цитометрии. Данные представлены в

виде среднего значения \pm SEM. Статистический анализ выполнен с использованием Т-критерия Манна-Уитни. *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; ****P < 0,0001.

[0066] На **фиг. 26А-Н** показаны характеристики инфильтрации иммунными клетками после обработки с использованием антитела к LIF (r5D8). На **фиг. 26А** показан процентное содержание и средняя интенсивность флуоресценции (MFI) GZMA в популяции CD8⁺ Т-клеток опухолей GL261N. На **фиг. 26В** и **фиг. 26С** показано процентное содержание PD1⁺ CD8⁺ Т-клеток в опухолевых опухолей GL261N (**26В**) и ID8 (**26С**). На **фиг. 26D** показано процентное содержание инфильтрирующих TAM (CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C⁻ CD49d⁺) в опухолях GL261N и RCAS в ответ на обработку с использованием антитела к LIF (r5D8). Показана стратегия гейтирования в проточной цитометрии. На **фиг. 26Е** показана популяция дендритных клеток (DC) (CD11b⁺ CD11c⁺ MHCII⁺) и презентирование антигена, определенное по экспрессии MHCII, в опухолях GL261N. На **фиг. 26F** показаны анализы ELISA IL-12 и IL-10 в опухолях GL261N. На **фиг. 26G** показаны результаты по мышам с опухолью GL261N, обработанным с использованием антитела к LIF (r5D8) на 8 день после инокуляции. Объем опухоли измеряли по общему потоку (фотон/сек) на 13 день после инокуляции. На **26H** показано процентное содержание CD8⁺ Т-клеток (CD3⁺ CD8⁺) в опухолях, определенное посредством проточной цитометрии. Данные представлены в виде среднего значения \pm SEM. Статистический анализ выполнен с использованием Т-критерия Манна-Уитни. *P < 0,05; **P < 0,01.

[0067] На **фиг. 27А** показан процент экспрессии CCR2, CXCR3 и LIFR в популяциях TAM (CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C⁻) и CD8⁺ Т-клеток (CD3⁺ CD8⁺), определенный посредством проточной цитометрии. Данные представлены в виде среднего значения \pm SEM. Статистический анализ выполнен с использованием Т-критерия Манна-Уитни. *P < 0,05. На **фиг. 27В** показаны результаты анализа qRT-PCR указанных генов в CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C⁻ и CD11b⁻ Ly6G⁻ Ly6C⁻ клетках, отсортированных из опухолей GL261N.

[0068] На **фиг. 28** показана корреляция между LIF и экспрессией CD163, CD206 и CCL2 при GBM и раке яичника. Графики регрессии между LIF и экспрессией CD163, CD206, CCL2 (в log₂ RSEM) в когортах опухолей GBM и рака яичника (OV) TCGA.

[0069] На **фиг. 29А** и **29В** показана регуляция CXCL9 посредством LIF в макрофагах мыши и человека. На **фиг. 29А** показаны CD11b⁺ CD14⁺ клетки в культуре, определенные посредством проточной цитометрии. Данные представлены в виде среднего значения \pm SD. Статистические анализы по *t*-критерию Стьюдента **P < 0,01; ***P < 0,001. На **фиг.**

29В показано, что BMDM предварительно инкубировали с LIF (20 нг/мл) в течение 18 часов, а затем стимулировали с использованием 1 мкг/мл LPS в течение 6 часов.

[0070] На **фиг. 30** показан противоопухолевый ответ на комбинированную обработку с использованием антитела к LIF (r5D8) и антитела к PD1 в моделях GL261N, RCAS и ID8. На **фиг. 30** показано, что мышей с опухолями GL261N, RCAS и ID8 обрабатывали с использованием антитела к LIF (r5D8) и/или антитела к PD1 (показана схема обработки). Рост опухоли измеряли по общему потоку (фотон/сек) (GL261N и RCAS) или по объему брюшной полости (мм³) (ID8). Статистические анализы выполнены с использованием Т-критерия Манна-Уитни. *P < 0,05; **P < 0,01.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0071] Если не определено иное, вся техническая терминология, используемая в данном документе, имеет такое же значение, которое обычно понятно специалисту в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение. Используемая в настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения форма единственного числа предусматривает определяемые объекты и во множественном числе, если из контекста явно не следует иное. Предполагается, что любое упоминание "или" в данном документе охватывает "и/или", если не указано иное.

[0072] В одном аспекте данного документа описано применение полипептида, связывающего лейкоз-ингибирующий фактор (LIF), в комбинации с ингибитором передачи сигналов PD-1 (CD279), PDL-1 (CD274) или PDL-2 (CD-273) для лечения рака у индивидуума.

[0073] В другом аспекте данного документа описано применение антитела, связывающего лейкоз-ингибирующий фактор (LIF), в комбинации с антителом, связывающим PD-1, для лечения рака у индивидуума, где антитело, связывающее LIF, содержит: (a) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 1-3; (b) определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 4 или 5; (c) определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 6-8; (d) определяющую комплементарность область 1 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 9 или 10; (e) определяющую

комплементарность область 2 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 11 или 12; и (f) определяющую комплементарность область 3 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13.

[0074] В другом аспекте данного документа описан способ лечения индивидуума, страдающего от рака, предусматривающий введение индивидууму, страдающему от рака, эффективного количества: (a) полипептида, связывающего лейкоз-ингибирующий фактор (LIF); и (b) ингибитора передачи сигналов PD-1 (CD279), PDL-1 (CD274) или PDL-2 (CD273).

[0075] В другом аспекте данного документа описан способ лечения индивидуума, страдающего от рака, при этом способ предусматривает: введение индивидууму, страдающему от рака, эффективного количества полипептида, связывающего лейкоз-ингибирующий фактор (LIF), где индивидууму вводили терапевтическое количество ингибитора передачи сигналов PD-1 (CD279), PDL-1 (CD274) или PDL-2 (CD-273).

[0076] В другом аспекте данного документа описан способ лечения индивидуума, страдающего от рака, при этом способ предусматривает: введение индивидууму, страдающему от рака, эффективного количества ингибитора передачи сигналов PD-1 (CD279), PDL-1 (CD274) или PDL-2 (CD-273), где индивидууму вводили терапевтическое количество полипептида, связывающего лейкоз-ингибирующий фактор (LIF).

[0077] В другом аспекте данного документа описан способ уменьшения количества проопухолевых макрофагов, ассоциированных с опухолью (TAM), в опухоли у индивидуума, страдающего от рака, предусматривающий введение индивидууму, страдающему от рака, эффективного количества комбинации: (a) антитела, которое специфически связывает лейкоз-ингибирующий фактор (LIF); и (b) ингибитора передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2.

[0078] В другом аспекте данного документа описан способ индуцирования иммунологической памяти у индивидуума, страдающего от рака, предусматривающий введение индивидууму, страдающему от рака, эффективного количества комбинации: (a) антитела, которое специфически связывает лейкоз-ингибирующий фактор (LIF); и (b) ингибитора передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2.

[0079] В другом аспекте данного документа описан способ увеличения количества Т-лимфоцитов в опухоли индивидуума, предусматривающий введение индивидууму, страдающему от опухоли, эффективного количества комбинации: (a) антитела, которое

специфически связывает лейкоз-ингибирующий фактор (LIF); и (b) ингибитора передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2.

[0080] В другом аспекте данного документа описан способ лечения индивидуума, страдающего от рака, предусматривающий введение индивидууму, страдающему от рака, эффективного количества: (a) антитела, которое специфически связывает лейкоз-ингибирующий фактор (LIF), содержащего: (i) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 1-3; (ii) определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 4 или 5; (iii) определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 6-8; (iv) определяющую комплементарность область 1 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 9 или 10; (v) определяющую комплементарность область 2 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 11 или 12; и (vi) определяющую комплементарность область 3 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13; и (b) связывающего PD-1 антитела.

[0081] В другом аспекте данного документа описан набор, содержащий: (a) полипептид, связывающий лейкоз-ингибирующий фактор (LIF); и (b) ингибитор передачи сигналов PD-1 (CD279), PDL-1 (CD274) или PDL-2 (CD273).

[0082] В другом аспекте данного документа описана композиция, содержащая: (a) полипептид, связывающий лейкоз-ингибирующий фактор (LIF); и (b) ингибитор передачи сигналов PD-1 (CD279), PDL-1 (CD274) или PDL-2 (CD273).

[0083] В другом аспекте данного документа описан способ уменьшения количества проопухолевых макрофагов, ассоциированных с опухолью (TAM), у индивидуума, страдающего от рака, предусматривающий введение индивидууму, страдающему от рака, эффективного количества комбинации: (a) антитела, которое специфически связывает лейкоз-ингибирующий фактор (LIF), содержащего: (i) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 1-3; (ii) определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR2), содержащую

аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 4 или 5; (iii) определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 6-8; (iv) определяющую комплементарность область 1 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 9 или 10; (v) определяющую комплементарность область 2 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 11 или 12; и (vi) определяющую комплементарность область 3 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13; и ингибитора оси PD-1.

[0084] В другом аспекте данного документа описан способ индуцирования иммунологической памяти у индивидуума, страдающего от рака, предусматривающий введение индивидууму, страдающему от рака, эффективного количества комбинации: (a) антитела, которое специфически связывает лейкоз-ингибирующий фактор (LIF), содержащего: (i) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 1-3; (ii) определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 4 или 5; (iii) определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 6-8; (iv) определяющую комплементарность область 1 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 9 или 10; (v) определяющую комплементарность область 2 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 11 или 12; и (vi) определяющую комплементарность область 3 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13; и ингибитора оси PD-1.

[0085] В другом аспекте данного документа описан способ увеличения количества Т-лимфоцитов в опухоли, предусматривающий введение индивидууму, страдающему от опухоли, эффективного количества комбинации: (a) антитела, которое специфически связывает лейкоз-ингибирующий фактор (LIF), содержащего: (i) определяющую

комплементарность область 1 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 1-3; (ii) определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 4 или 5; (iii) определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 6-8; (iv) определяющую комплементарность область 1 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 9 или 10; (v) определяющую комплементарность область 2 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 11 или 12; и (vi) определяющую комплементарность область 3 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13; и ингибитора оси PD-1.

[0086] Используемые в данном документе термины "индивидуум", "субъект" и "пациент" используются взаимозаменяемо и включают людей, у которых диагностированы опухоль, рак или другое новообразование или подозревается их наличие. Индивидуум также может включать млекопитающих, таких как мышь, крыса, собака, кошка, свинья, овца, корова, лошадь, коза, лама, альпака или як.

[0087] Используемое в данном документе выражение "приблизительно" относится к количеству, которое находится в пределах 10% от заявленного.

[0088] Используемый в данном документе термин "лечить" или "лечение" относится к вмешательствам в нормальное или патологическое состояние индивидуума, разработанным или предназначенным для облегчения по меньшей мере одного признака или симптома, ассоциированного с указанным нормальным или патологическим состоянием. Описанное в данном документе "лечение" в отношении рака относится к вмешательствам, предназначенным для индуцирования полного ответа, частичного ответа, замедления прогрессирования рака или опухоли, подлежащих лечению, уменьшения размера опухоли или опухолевой нагрузки или замедления роста опухоли или опухолевой нагрузки. Под лечением также понимают вмешательства, направленные на уменьшение метастазов или степени злокачественности рака или опухоли. Специалист в данной области техники поймет, что с учетом гетерогенной популяции индивидуумов, страдающих от заболевания, не все индивидуумы будут одинаково или хоть в какой-либо степени реагировать на данное лечение. Тем не менее, эти индивидуумы считаются

такими, которые проходят лечение. Неудачное лечение обычно приводит к прогрессированию заболевания и необходимости дополнительного лечения с помощью другого терапевтического средства. В определенных аспектах антитела и способы, описанные в данном документе, можно использовать для поддержания ремиссии при раке или предотвращения повторного возникновения такого же вида рака или другого вида рака, связанного с раком, который лечат.

[0089] Используемый в данном документе термин "комбинация" или "комбинированное лечение" может относиться либо к одновременному введению препаратов, которые необходимо объединять, либо к последовательному введению препаратов, которые необходимо объединять. Как описано в данном документе, если комбинация относится к последовательному введению препаратов, то изделия можно вводить в любом временном порядке.

[0090] Термины "рак" и "опухоль" относятся к физиологическому состоянию млекопитающих, которое характеризуется нарушением клеточного роста. Рак представляет собой класс заболеваний, при которых группа клеток проявляет неконтролируемый или нежелательный рост. Раковые клетки также могут распространяться в другие места, что может приводить к образованию метастазов. Диссеминация раковых клеток в организме может происходить, например, посредством лимфы или крови. Неконтролируемый рост, инвазию и образование метастазов также называют злокачественными свойствами рака. Эти злокачественные свойства отличают рак от доброкачественных опухолей, которые, как правило, не инвазируют и не метастазируют.

[0091] Используемый в данном документе термин "эффективное количество" относится к количеству терапевтического средства, которое вызывает биологический эффект при введении млекопитающему. Биологические эффекты включают без ограничения ингибирование или блокирование лиганд-рецепторного взаимодействия (например, LIF-LIFR, PD-1-PDL1/PDL-2), ингибирование сигнального пути (например, фосфорилирование STAT3), замедление роста опухоли, уменьшение метастазирования опухоли или повышение выживаемости животного с опухолью. "Терапевтическое количество" означает концентрацию лекарства, которая, по расчетам, оказывает терапевтический эффект. Терапевтическое количество охватывает диапазон доз, способных индуцировать терапевтический ответ у популяции индивидуумов. Млекопитающее может быть индивидуумом-человеком. Индивидуум-человек может подозреваться на наличие опухоли или собственно иметь опухоль.

[0092] Используемый в данном документе термин "ингибитор контрольных точек иммунного ответа" относится к лекарственному средству, которое ингибирует биологическую молекулу ("молекулу контрольной точки иммунного ответа"), продуцируемую организмом, которая отрицательно регулирует противоопухолевую/противораковую активность Т-клеток в организме. Молекулы контрольных точек иммунного ответа включают без ограничения PD-1, PDL-1, PDL-2, CTLA4, TIM-3, LAG-3, VISTA, SIGLEC7, PVR, TIGIT, IDO, KIR, A2AR, B7-H3, B7H4 и NOX2.

[0093] Используемый в данном документе термин "антитело", если не указано иное, включает антигенсвязывающие фрагменты антител, т.е. фрагменты антител, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном, который связывается с полноразмерным антителом, например фрагменты, которые сохраняют одну или несколько областей CDR. Примеры фрагментов антител включают без ограничения фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv; диатела; линейные антитела; антитела, состоящие только из тяжелых цепей, молекулы одноцепочечных антител, например, одноцепочечные переменные фрагменты (scFv), наноантитела и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител с разными специфичностями, такие как биспецифические антитела. В определенных вариантах осуществления антитела гуманизируются таким образом, чтобы снизить иммунный ответ индивидуума на антитело. Например, антитела могут быть химерными, например отличная от человеческой переменная область с человеческой константной областью, или антителами с привитыми CDR, например отличные от человеческих области CDR с константной областью и последовательностями человеческого каркасного участка переменной области. В определенных вариантах осуществления антитела подвергают деиммунизации после гуманизации. Деиммунизация включает удаление или мутацию одного или нескольких эпитопов Т-клеток в константной области антитела. В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе антитела являются моноклональными. Используемый в данном документе термин "рекомбинантное антитело" представляет собой антитело, которое содержит аминокислотную последовательность, полученную из двух разных видов или двух разных источников, и включает синтетические молекулы, например антитело, которое содержит отличную от человеческой область CDR и человеческую каркасную или константную область. В определенных вариантах осуществления рекомбинантные антитела по настоящему изобретению получают из молекулы рекомбинантной ДНК или синтезируют.

[0094] Процент (%) идентичности последовательностей относительно референтной полипептидной последовательности или последовательности антитела представляет собой процентную долю аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в референтной полипептидной последовательности или последовательности антитела после выравнивания последовательностей и введения гэпов при необходимости для достижения максимального процента идентичности последовательностей и без учета каких-либо консервативных замен как части идентичности последовательностей. Выравнивание с целью определения процента идентичности аминокислотных последовательностей может быть достигнуто различными известными способами, например с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Могут быть определены подходящие параметры для выравнивания последовательностей, в том числе алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Однако в данном документе значения % идентичности аминокислотных последовательностей получают с использованием компьютерной программы для сравнения последовательностей ALIGN-2. Компьютерная программа для сравнения последовательностей ALIGN-2 была разработана Genentech, Inc., а исходный код был подан вместе с пользовательской документацией в Бюро авторского права США, Вашингтон, округ Колумбия, 20559, где он зарегистрирован под регистрационным номером авторских прав США TXU510087. Программа ALIGN-2 находится в открытом доступе, и ее можно получить от Genentech, Inc., Южный Сан-Франциско, Калифорния, США, или же ее можно скомпилировать из исходного кода. Программа ALIGN-2 должна быть скомпилирована для использования в операционной системе UNIX, включая цифровую версию UNIX V4.0D. Все параметры сравнения последовательностей задаются программой ALIGN-2 и не изменяются.

[0095] В тех случаях, когда для сравнения аминокислотных последовательностей используется ALIGN-2, % идентичности аминокислотной последовательности, свойственный данной аминокислотной последовательности А, в отношении данной аминокислотной последовательности В, с ней или в сравнении с ней (что в качестве альтернативы можно перефразировать как: данная аминокислотная последовательность А, которая характеризуется или обладает определенным % идентичности аминокислотной последовательности в отношении данной аминокислотной последовательности В, с ней или в сравнении с ней) рассчитывается следующим образом: частное X/Y умножить на

100, где X представляет собой число аминокислотных остатков, учитываемых в качестве идентичных совпадений программой для выравнивания последовательностей ALIGN-2 в выравнивании A и B данной программы, и где Y представляет собой общее число аминокислотных остатков в B. Следует принимать во внимание, что если длина аминокислотной последовательности A не равна длине аминокислотной последовательности B, то % идентичности аминокислотной последовательности A в отношении B не будет равен % идентичности аминокислотной последовательности B в отношении A. Если специально не указано иное, все значения % идентичности аминокислотной последовательности, используемые в данном документе, получены так, как это описано в предыдущем параграфе, с использованием компьютерной программы ALIGN-2.

[0096] Термин "эпитоп" включает любую детерминанту, способную связываться с антигенсвязывающим белком, таким как антитело. Эпитоп представляет собой область антигена, которая связывается антигенсвязывающим белком, который нацелен на этот антиген, и когда антиген представляет собой белок, включает специфические аминокислоты, которые непосредственно контактируют с антигенсвязывающим белком. Чаще всего эпитопы расположены на белках, но в некоторых случаях могут располагаться на других типах молекул, таких как сахараиды или липиды. Эпитопные детерминанты могут включать химически активные поверхностные группировки молекул, такие как аминокислоты, боковые цепи сахаров, фосфорильные или сульфонильные группы, и могут обладать специфическими характеристиками трехмерной структуры и/или специфическими характеристиками заряда. Обычно антитела, специфические к конкретному антигену-мишени, будут предпочтительно распознавать эпитоп на антигене-мишени среди сложного комплекса белков и/или макромолекул.

[0097] Используемый в данном документе термин "TAM" или "опухоль-ассоциированные макрофаги" включает иммунные клетки, произошедшие из макрофагов или моноцитов, присутствующие в большом количестве в микроокружении солидных опухолей. TAM включают без ограничения клетки, экспрессирующие CD11b⁺, Ly6G⁻, Ly6C⁻, CD206⁺, CD163⁺, MHCII^{low}, CD49d⁺, или любую их комбинацию.

Структурные атрибуты описанных в данном документе антител

[0098] Определяющая комплементарность область ("CDR") является частью варибельной области иммуноглобулина (антитела), которая прежде всего отвечает за специфичность антигенного связывания антитела. Области CDR значительно варьируются в разных антителах, даже если антитела специфически связывают одни и те же мишени

или эпитоп. Варибельная область тяжелой цепи содержит три области CDR, сокращенно именуемые VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3; и варибельная область легкой цепи содержит три области CDR, сокращенно именуемые VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3. Эти области CDR последовательно расположены в варибельной области, причем CDR1 расположена наиболее близко к N-концу, а CDR3 расположена наиболее близко к C-концу. Между CDR находятся каркасные области, которые вносят вклад в структуру и демонстрируют гораздо меньшую варибельность, чем области CDR. Варибельная область тяжелой цепи содержит четыре каркасных области, сокращенно именуемых VH-FR1, VH-FR2, VH-FR3 и VH-FR4; и варибельная область легкой цепи содержит четыре каркасных области, сокращенно именуемых VL-FR1, VL-FR2, VL-FR3 и VL-FR4. Полные полноразмерные двухвалентные антитела, содержащие две тяжелые и легкие цепи, будут содержать: 12 CDR, с тремя уникальными CDR тяжелой цепи и тремя уникальными CDR легкой цепи; 16 областей FR, с четырьмя уникальными областями FR тяжелой цепи и четырьмя уникальными областями FR легкой цепи. В определенных вариантах осуществления антитела, описанные в данном документе, содержат по меньшей мере три CDR тяжелой цепи. В определенных вариантах осуществления антитела, описанные в данном документе, содержат по меньшей мере три CDR легкой цепи. В определенных вариантах осуществления антитела, описанные в данном документе, содержат по меньшей мере три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи. Точные границы аминокислотной последовательности указанной CDR или FR можно легко определить с помощью любой из ряда хорошо известных схем, включая схемы, описанные в Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (схема нумерации по Кабату); Al-Lazikani et al., (1997) *JMB* 273,927-948 (схема нумерации по Чотиа); MacCallum et al., *J. Mol. Biol.* 262:732-745 (1996), "Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography," (схема нумерации "Контакт"); Lefranc MP et al., "IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains," *Dev Comp Immunol*, 2003 Jan;27(1):55-77 (схема нумерации "IMGT"); и Honegger A and Plückthun A, "Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool," *J Mol Biol*, 2001 Jun 8;309(3):657-70, (схема нумерации "Aho"). CDR в данном документе идентифицируются среди представленных варибельных последовательностей с использованием различных систем нумерации, с использованием системы нумерации по Кабату, IMGT, по Чотиа или любой их комбинации. Границы данной CDR или FR могут варьироваться в зависимости от схемы, используемой для идентификации. Например,

схема по Кабату основана на структурном выравнивании, тогда как схема по Чотиа основана на структурной информации. Нумерация как для схем по Кабату, так и для схем по Чотиа основана на наиболее распространенных значениях длины последовательностей области антитела со вставками, обозначенными буквами, например "30a", и делециями, появляющимися в некоторых антителах. Две схемы помещают определенные вставки и делеции ("вставки/делеции") в разные положения, что дает разную нумерацию. Схема Контакт основана на анализе сложных кристаллических структур и во многих отношениях аналогична схеме нумерации по Чотиа. В определенных вариантах осуществления CDR по настоящему изобретению определяю посредством способа по Кабату, способа IMGT, способа по Чотиа или любой их комбинации.

[0099] Термин "вариабельная область" или "вариабельный домен" относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, который участвует в связывании антитела с антигеном. Вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи (VH и VL соответственно) нативного антитела обычно имеют схожие структуры, причем каждый домен содержит четыре консервативных каркасных области (FR) и три CDR (см., например, Kindt et al. *Kuby Immunology, 6th ed.*, W.H. Freeman and Co., page 91(2007)). Одного домена VH или VL может быть достаточно для придания антигенсвязывающей специфичности. Кроме того, антитела, которые связывают конкретный антиген, могут быть выделены с использованием домена VH или VL антитела, которое связывает антиген, для скрининга библиотеки комплементарных доменов VL или VH соответственно (см., например, Portolano et al., *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson et al., *Nature* 352:624-628 (1991)). В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе антитела являются гуманизированными. В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе антитела являются химерными. В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе антитела содержат вариабельные области крысиного происхождения. В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе антитела содержат CDR крысиного происхождения. В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе антитела содержат вариабельные области мышиноного происхождения. В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе антитела содержат CDR мышиноного происхождения.

[00100] В CDR могут быть внесены изменения (например, замены), например, для повышения аффинности антитела. Такие изменения могут быть внесены в кодоны, кодирующие CDR, с высокой скоростью мутаций в ходе соматического созревания (см.

например, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)), и полученный вариант может быть протестирован на аффинность связывания. Созревание аффинности (например, с использованием ПЦР с ошибающейся полимеразой, перестановки цепей, рандомизации CDR или олигонуклеотид-направленного мутагенеза) можно использовать для улучшения аффинности антитела (см., например, Hoogenboom et al. *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (2001)). Остатки CDR, вовлеченные в связывание антигена, могут быть специфически идентифицированы, например, с использованием аланин-сканирующего мутагенеза или моделирования (см., например, Cunningham and Wells *Science*, 244:1081-1085 (1989)). CDR-H3 и CDR-L3, в частности, часто становятся мишенью. Альтернативно или дополнительно кристаллическую структуру комплекса антиген-антитело анализируют для определения точек контакта между антителом и антигеном. Такие контактные остатки и соседние остатки могут быть мишенью или могут быть исключены как кандидаты на замену. Варианты могут быть проверены, чтобы определить, имеют ли они требуемые свойства.

[00101] В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе антитела содержат константную область в дополнение к вариабельной области. Константная область тяжелой цепи (C_H) содержит четыре домена, сокращенно именуемые C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} и C_{H4} , расположенные на С-конце полипептида полной тяжелой цепи, со стороны С-конца вариабельной области. Константная область легкой цепи (C_L) существенно меньше, чем C_H , и расположена на С-конце полипептида полной легкой цепи, со стороны С-конца вариабельной области. Константная область является высококонсервативной и содержит разные изоформы, которые связаны с несколькими отличающимися функциями и свойствами. В определенных вариантах осуществления константная область не обязательна для связывания антитела с антигеном-мишенью. В определенных вариантах осуществления константные области антитела, как тяжелой, так и легкой цепей, не обязательны для связывания антитела. В определенных вариантах осуществления в описанных в данном документе антителах отсутствуют одна или несколько константных областей легкой цепи, константных областей тяжелой цепи или обеих цепей. Большинство моноклональных антител относятся к изоформе IgG, который дополнительно подразделяют на четыре подкласса: IgG₁, IgG₂, IgG₃ и IgG₄. В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе антитела предусматривают любой подкласс IgG. В определенных вариантах осуществления подкласс IgG предусматривает IgG₁. В определенных вариантах осуществления подкласс IgG предусматривает IgG₂. В определенных вариантах осуществления подкласс IgG

предусматривает IgG₃. В определенных вариантах осуществления подкласс IgG предусматривает IgG₄.

[00102] Антитела содержат область кристаллизующегося фрагмента (область Fc), которая отвечает за связывание с комплементом и рецепторами Fc. Область Fc содержит области C_H2, C_H3 и C_H4 молекулы антитела. Область Fc антитела отвечает за активацию комплемента и за антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC). Область Fc также вносит вклад в период полужизни антитела в сыворотке крови. В определенных вариантах осуществления область Fc антител, описанных в данном документе, содержит одну или несколько аминокислотных замен, которые способствуют комплемент-опосредованному лизису клеток. В определенных вариантах осуществления область Fc антител, описанных в данном документе, содержит одну или несколько аминокислотных замен, которые способствуют ADCC. В определенных вариантах осуществления область Fc антител, описанных в данном документе, содержит одну или несколько аминокислотных замен, которые уменьшают комплемент-опосредованный лизис клеток. В определенных вариантах осуществления область Fc антител, описанных в данном документе, содержит одну или несколько аминокислотных замен, которые увеличивают связывание антитела с рецептором Fc. В определенных вариантах осуществления рецептор Fc включает FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32), FcγRIIA (CD16a), FcγRIIB (CD16b) или любую их комбинацию. В определенных вариантах осуществления область Fc антител, описанных в данном документе, содержит одну или несколько аминокислотных замен, которые увеличивают период полужизни антитела в сыворотке крови. В определенных вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен, которые увеличивают время полужизни антитела в сыворотке крови, увеличивают аффинность антитела к неонатальному рецептору Fc (FcRn).

[00103] В определенных вариантах осуществления антитела в соответствии с настоящим изобретением представляют собой варианты, которые обладают некоторыми, но не всеми эффекторными функциями, что делает их желательным кандидатом для таких вариантов применения, в которых период полужизни антитела *in vivo* важен, но некоторые эффекторные функции (такие как активация комплемента и ADCC) не требуются или вредны. Анализы цитотоксичности *in vitro* и/или *in vivo* могут быть проведены для подтверждения снижения/истощения активности CDC и/или ADCC. Например, можно проводить анализы связывания рецептора Fc (FcR), чтобы убедиться в том, что антитело лишено способности связывания с FcγR (следовательно, вероятно, не обладает активностью ADCC), но сохраняет способность связывания с FcRn. Неограничивающие

примеры анализов *in vitro* для оценки активности ADCC молекулы, представляющей интерес, описаны в патентах США №№ 5500362 и 5821337. В качестве альтернативы можно использовать нерадиоактивные аналитические методики (например, нерадиоактивные анализы цитотоксичности АСТП™ и CytoTox 96®). Эффекторные клетки, пригодные для таких анализов, включают мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), моноциты, макрофаги и естественные клетки-киллеры (NK).

[00104] Антитела могут иметь увеличенный период полужизни и улучшенное связывание с неонатальным рецептором Fc (FcRn) (см., например, US 2005/0014934). Такие антитела могут содержать область Fc с одной или несколькими заменами в ней, которые улучшают связывание области Fc с FcRn, и включают антитела с заменами в одном или нескольких остатках области Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424, или 434 согласно системе нумерации ЕС (см., например, патент США № 7371826). Также рассматриваются другие примеры вариантов области Fc (см., например, Duncan & Winter, Nature 322:738-40 (1988); патенты США №№ 5648260 и 5624821; и WO94/29351).

[00105] Антитела, применимые в клинических условиях, часто "гуманизируют" для снижения иммуногенности у индивидуумов-людей. Гуманизированные антитела повышают безопасность и эффективность терапии моноклональными антителами. Одним из распространенных способов гуманизации является получение моноклонального антитела у любого подходящего животного (например, мыши, крысы, хомяка) и замена константной области на человеческую константную область; сконструированные таким образом антитела называются "химерными". Другой распространенный способ представляет собой "прививание CDR", при котором отличные от человеческих V-FR заменяют человеческими V-FR. В способе прививания CDR все остатки за исключением области CDR имеют человеческое происхождение. В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе антитела являются гуманизированными. В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе антитела являются химерными. В определенных вариантах осуществления описанным в данном документе антителам привиты CDR.

[00106] Гуманизация обычно снижает или оказывает незначительное влияние на общую аффинность антитела. В данном документе описаны антитела, которые неожиданно обладают большей аффинностью к своей мишени после гуманизации. В определенных вариантах осуществления гуманизация повышает аффинность антитела на 10%. В

определенных вариантах осуществления гуманизация повышает аффинность антитела на 25%. В определенных вариантах осуществления гуманизация повышает аффинность антитела на 35%. В определенных вариантах осуществления гуманизация повышает аффинность антитела на 50%. В определенных вариантах осуществления гуманизация повышает аффинность антитела на 60%. В определенных вариантах осуществления гуманизация повышает аффинность антитела на 75%. В определенных вариантах осуществления гуманизация повышает аффинность антитела на 100%. Соответственно, аффинность измеряют с использованием поверхностного плазмонного резонанса (SPR). В определенных вариантах осуществления аффинность измеряют с использованием гликозилированного LIF человека. В определенных вариантах осуществления гликозилированный LIF человека иммобилизован на поверхности чипа сенсора SPR. В определенных вариантах осуществления антитело связывается с K_D , составляющей менее приблизительно 300 наномоль, 200 наномоль, 150 наномоль, 125 наномоль, 100 наномоль, 90 наномоль, 80 наномоль, 70 наномоль, 60 наномоль, 50 наномоль, 40 наномоль или меньше.

[00107] Композиции и способы, описанные в данном документе, включают комбинации полипептидов, связывающих LIF, с ингибиторами оси PD-1. В определенных вариантах осуществления полипептид, связывающий LIF, содержит фрагмент вариабельной области иммуноглобулина или константной области тяжелой цепи иммуноглобулина. В определенных вариантах осуществления полипептид, связывающий LIF, представляет собой антитело, которое специфически связывается с LIF. В определенных вариантах осуществления антитело, связывающее LIF, содержит по меньшей мере одну каркасную область, полученную из каркасной области человеческого иммуноглобулина. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, является гуманизированным. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, является деиммунизированным. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, содержит две тяжелые цепи иммуноглобулина и две легкие цепи иммуноглобулина. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, представляет собой антитело IgG. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с LIF, представляет собой Fab, F(ab)₂, однодоменное антитело, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) или наноантитело. В определенных вариантах осуществления антитело, связывающее LIF, представляет собой антитело h5D8, описанное в данном документе (SEQ ID NO: 42 и SEQ

ID NO: 46), или тяжелую цепь с мутацией цистеина (SEQ ID NO: 66), или антитело, которое содержит CDR h5D8 или его форму с мутацией цистеина.

[00108] В определенных вариантах осуществления, описанных в данном документе, антитело, используемое или вводимое в комбинации с ингибитором PD-1, представляет собой антитело h5D8. Антитело h5d8, которое специфически связывает LIF, содержит VH-CDR1, представленную под любым из SEQ ID NO: 1-3, VH-CDR2, представленную под любым из SEQ ID NO: 4 или 5, и VH-CDR3, представленную под любым из SEQ ID NO: 6-8. В определенных вариантах осуществления, описанных в данном документе, h5D8 специфически связывает LIF и содержит VL-CDR1, представленную под любым из SEQ ID NO: 9 или 10, VL-CDR2, представленную под SEQ ID NO: 11 или 12, и VL-CDR3, представленную под SEQ ID NO: 13. В определенных вариантах осуществления, описанных в данном документе, h5D8 специфически связывает LIF и содержит VH-CDR1, представленную под любым из SEQ ID NO: 1-3, VH-CDR2, представленную под любым из SEQ ID NO: 4 или 5, и VH-CDR3, представленную под любым из SEQ ID NO: 6-8, VL-CDR1, представленную под любым из SEQ ID NO: 9 или 10, VL-CDR2, представленную под SEQ ID NO: 11 или 12, и VL-CDR3, представленную под SEQ ID NO: 13.

[00109] В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывает LIF, содержит одну или несколько человеческих каркасных областей тяжелой цепи, содержащих: аминокислотную последовательность VH-FR1, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 14-17, аминокислотную последовательность VH-FR2, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 18 или 19, аминокислотную последовательность VH-FR3, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 20-22, или аминокислотную последовательность области VH-FR4, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 23-25. В определенных вариантах осуществления одна или несколько человеческих каркасных областей тяжелой цепи содержат аминокислотную последовательность VH-FR1, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 15, аминокислотную последовательность VH-FR2, которая на по меньшей мере

приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 19, аминокислотную последовательность VH-FR3, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 20, и аминокислотную последовательность VH-FR4, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 24. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывает LIF, содержит одну или несколько человеческих каркасных областей легкой цепи, содержащих: аминокислотную последовательность VL-FR1, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 26-29, аминокислотную последовательность VL-FR2, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 30-33, аминокислотную последовательность VL-FR3, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 34-37, или аминокислотную последовательность VL-FR4, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 38-40. В определенных вариантах осуществления одна или несколько человеческих каркасных областей легкой цепи содержат аминокислотную последовательность VL-FR1, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 90% или приблизительно 95% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 27, аминокислотную последовательность VL-FR2, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 31, аминокислотную последовательность VL-FR3, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 35, и аминокислотную последовательность VL-FR4, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 38. В определенных вариантах осуществления одна или несколько человеческих каркасных областей тяжелой цепи и одна или несколько человеческих каркасных областей легкой

цепи содержат аминокислотную последовательность VH-FR1, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 15, аминокислотную последовательность VH-FR2, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 19, аминокислотную последовательность VH-FR3, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 20, аминокислотную последовательность VH-FR4, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 24, аминокислотную последовательность VL-FR1, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 27, аминокислотную последовательность VL-FR2, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 31, аминокислотную последовательность VL-FR3, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 35, и аминокислотную последовательность VL-FR4, которая на по меньшей мере 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 38. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывает LIF, содержит одну или несколько человеческих каркасных областей тяжелой цепи, содержащих: аминокислотную последовательность VH-FR1, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 14-17, аминокислотную последовательность VH-FR2, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 18 или 19, аминокислотную последовательность VH-FR3, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 20-22, или аминокислотную последовательность области VH-FR4, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 23-25. В определенных вариантах осуществления одна или несколько человеческих каркасных областей тяжелой цепи содержат аминокислотную последовательность VH-FR1, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 15,

аминокислотную последовательность VH-FR2, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 19, аминокислотную последовательность VH-FR3, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 20, и аминокислотную последовательность VH-FR4, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 24. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывает LIF, содержит одну или несколько человеческих каркасных областей легкой цепи, содержащих: аминокислотную последовательность VL-FR1, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 26-29, аминокислотную последовательность VL-FR2, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 30-33, аминокислотную последовательность VL-FR3, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 34-37, или аминокислотную последовательность VL-FR4, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 38-40. В определенных вариантах осуществления одна или несколько человеческих каркасных областей легкой цепи содержат аминокислотную последовательность VL-FR1, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 27, аминокислотную последовательность VL-FR2, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 31, аминокислотную последовательность VL-FR3, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 35, и аминокислотную последовательность VL-FR4, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 38. В определенных вариантах осуществления одна или несколько человеческих каркасных областей тяжелой цепи и одна или несколько человеческих каркасных областей легкой цепи содержат аминокислотную последовательность VH-FR1, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 15, аминокислотную последовательность VH-FR2, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 19, аминокислотную последовательность VH-FR3, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 20, аминокислотную последовательность VH-FR4, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 24, аминокислотную последовательность VL-FR1, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 27, аминокислотную

последовательность VL-FR2, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 31, аминокислотную последовательность VL-FR3, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 35, и аминокислотную последовательность VL-FR4, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 38. В определенных вариантах осуществления антитело специфически связывает человеческий LIF.

[00110] Описанное в данном документе антитело r5D8 было получено от крыс, иммунизированных с использованием ДНК, кодирующей человеческий LIF. Антитело r5D8 было клонировано и секвенировано и содержит CDR (с использованием комбинации способов нумерации CDR по Кабату и IMGT) со следующими аминокислотными последовательностями: VH-CDR1, соответствующая SEQ ID NO: 1 (GFTFSHAWMH), VH-CDR2, соответствующая SEQ ID NO: 4 (QIKAKSDDYATYYAESVKG), VH-CDR3, соответствующая SEQ ID NO: 6 (TCWEWDLDF), VL-CDR1, соответствующая SEQ ID NO: 9 (RSSQSLLDSDGHTYLN), VL-CDR2, соответствующая SEQ ID NO: 11 (SVSNLES), и VL-CDR3, соответствующая SEQ ID NO: 13 (MQATHAPPYT). Данное антитело гуманизировали посредством прививания CDR, и его гуманизированный вариант обозначен как h5D8.

[00111] В определенных вариантах осуществления в данном документе описано антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее область VH-CDR1, которая на по меньшей мере 80% или 90% идентична последовательности, представленной под SEQ ID NO: 1 (GFTFSHAWMH), VH-CDR2, которая на по меньшей мере 80%, 90% или 95% идентична последовательности, представленной под SEQ ID NO: 4 (QIKAKSDDYATYYAESVKG), и VH-CDR3, которая на по меньшей мере 80% или 90% идентична последовательности, представленной под SEQ ID NO: 6 (TCWEWDLDF). В определенных вариантах осуществления в данном документе описано антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее область VL-CDR1, которая на по меньшей мере 80% или 90% идентична последовательности, представленной под SEQ ID NO: 9 (RSSQSLLDSDGHTYLN), VL-CDR2, которая на по меньшей мере 80% идентична последовательности, представленной под SEQ ID NO: 11 (SVSNLES), и VL-CDR3, которая на по меньшей мере 80% или 90% идентична последовательности, представленной под SEQ ID NO: 13 (MQATHAPPYT). В определенных вариантах осуществления в данном документе описано антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее область VH-CDR1, представленную под SEQ ID NO: 1 (GFTFSHAWMH), VH-CDR2, представленную под SEQ ID NO: 4

(QIKAKSDDYATYYAESVKG), VH-CDR3, представленную под SEQ ID NO: 6 (TCWEWDLDF), VL-CDR1, представленную под SEQ ID NO: 9 (RSSQSLLDSDGHTYLN), VL-CDR2, представленную под SEQ ID NO: 11 (SVSNLES), и VL-CDR3, представленную под SEQ ID NO: 13 (MQATHAPPYT). Определенные консервативные аминокислотные замены предусмотрены в аминокислотных последовательностях CDR по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления антитело содержит CDR, которые отличаются от аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 1, 4, 6, 9, 11 и 13, по 1, 2, 3 или 4 аминокислотам. В определенных вариантах осуществления антитело содержит CDR, которые отличаются от аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 1, 4, 6, 9, 11 и 13, по 1, 2, 3 или 4 аминокислотам и не влияют на аффинность связывания более чем на 10%, 20% или 30%. В определенных вариантах осуществления антитела, которые специфически связывают LIF, содержат одну или несколько человеческих каркасных областей тяжелой цепи, содержащих: аминокислотную последовательность VH-FR1, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 14-17, аминокислотную последовательность VH-FR2, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 18 или 19, аминокислотную последовательность VH-FR3, которая на по меньшей мере приблизительно 90% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 20-22, или аминокислотную последовательность области VH-FR4, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 23-25. В определенных вариантах осуществления одна или несколько человеческих каркасных областей тяжелой цепи содержат аминокислотную последовательность VH-FR1, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 15, аминокислотную последовательность VH-FR2, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 19, аминокислотную последовательность VH-FR3, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 20, и аминокислотную последовательность VH-FR4, которая на по

меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 24. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывает LIF, содержит одну или несколько человеческих каркасных областей легкой цепи, содержащих: аминокислотную последовательность VL-FR1, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 26-29, аминокислотную последовательность VL-FR2, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 30-33, аминокислотную последовательность VL-FR3, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 34-37, или аминокислотную последовательность VL-FR4, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 38-40. В определенных вариантах осуществления одна или несколько человеческих каркасных областей легкой цепи содержат аминокислотную последовательность VL-FR1, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 27, аминокислотную последовательность VL-FR2, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 31, аминокислотную последовательность VL-FR3, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 35, и аминокислотную последовательность VL-FR4, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 38. В определенных вариантах осуществления одна или несколько человеческих каркасных областей тяжелой цепи и одна или несколько человеческих каркасных областей легкой цепи содержат все из аминокислотной последовательности VH-FR1, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 15, аминокислотной последовательности VH-FR2, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 19, аминокислотной

последовательности VH-FR3, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 20, аминокислотной последовательности VH-FR4, которая на по меньшей мере приблизительно 90% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 24, аминокислотной последовательности VL-FR1, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 27, аминокислотной последовательности VL-FR2, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 31, аминокислотной последовательности VL-FR3, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 35, и аминокислотной последовательности VL-FR4, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 38. В определенных вариантах осуществления антитело специфически связывает человеческий LIF. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывает LIF, содержит одну или несколько человеческих каркасных областей тяжелой цепи, содержащих: аминокислотную последовательность VH-FR1, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 14-17, аминокислотную последовательность VH-FR2, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 18 или 19, аминокислотную последовательность VH-FR3, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 20-22, или аминокислотную последовательность области VH-FR4, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 23-25. В определенных вариантах осуществления одна или несколько человеческих каркасных областей тяжелой цепи содержат аминокислотную последовательность VH-FR1, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 15, аминокислотную последовательность VH-FR2, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 19, аминокислотную последовательность VH-FR3, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 20, и аминокислотную последовательность VH-FR4, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO:

24. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывает LIF, содержит одну или несколько человеческих каркасных областей легкой цепи, содержащих: аминокислотную последовательность VL-FR1, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 26-29, аминокислотную последовательность VL-FR2, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 30-33, аминокислотную последовательность VL-FR3, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 34-37, или аминокислотную последовательность VL-FR4, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 38-40. В определенных вариантах осуществления одна или несколько человеческих каркасных областей легкой цепи содержат аминокислотную последовательность VL-FR1, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 27, аминокислотную последовательность VL-FR2, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 31, аминокислотную последовательность VL-FR3, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 35, и аминокислотную последовательность VL-FR4, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 38. В определенных вариантах осуществления одна или несколько человеческих каркасных областей тяжелой цепи и одна или несколько человеческих каркасных областей легкой цепи содержат аминокислотную последовательность VH-FR1, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 15, аминокислотную последовательность VH-FR2, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 19, аминокислотную последовательность VH-FR3, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 20, аминокислотную последовательность VH-FR4, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 24, аминокислотную последовательность VL-FR1, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 27, аминокислотную последовательность VL-FR2, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 31, аминокислотную последовательность VL-FR3, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 35, и аминокислотную последовательность VL-FR4, которая идентична аминокислотной

последовательности, представленной под SEQ ID NO: 38. В определенных вариантах осуществления антитело специфически связывает человеческий LIF.

[00112] В определенных вариантах осуществления в данном документе описано антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее аминокислотную последовательность VH-CDR1, которая на по меньшей мере 80% или 90% идентична последовательности, представленной под SEQ ID NO: 1 (GFTFSHAWMH), аминокислотную последовательность VH-CDR2, которая на по меньшей мере 80%, 90% или 95% идентична последовательности, представленной под SEQ ID NO: 4 (QIKAKSDDYATYYAESVKG), и аминокислотную последовательность VH-CDR3, которая на по меньшей мере 80% или 90% идентична последовательности, представленной под SEQ ID NO: 8 (TSWEWDLDF). В определенных вариантах осуществления в данном документе описано антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее аминокислотную последовательность VL-CDR1, которая на по меньшей мере 80% или 90% идентична последовательности, представленной под SEQ ID NO: 9 (RSSQSLLDSDGHTYLN), аминокислотную последовательность VL-CDR2, которая на по меньшей мере 80% идентична последовательности, представленной под SEQ ID NO: 11 (SVSNLES), и аминокислотную последовательность VL-CDR3, которая на по меньшей мере 80% или 90% идентична последовательности, представленной под SEQ ID NO: 13 (MQATHAPPYT). В определенных вариантах осуществления в данном документе описано антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее аминокислотную последовательность VH-CDR1, представленную под SEQ ID NO: 1 (GFTFSHAWMH), аминокислотную последовательность VH-CDR2, представленную под SEQ ID NO: 4 (QIKAKSDDYATYYAESVKG), аминокислотную последовательность VH-CDR3, представленную под SEQ ID NO: 8 (TSWEWDLDF), аминокислотную последовательность VL-CDR1, представленную под SEQ ID NO: 9 (RSSQSLLDSDGHTYLN), аминокислотную последовательность VL-CDR2, представленную под SEQ ID NO: 11 (SVSNLES), и аминокислотную последовательность VL-CDR3, представленную под SEQ ID NO: 13 (MQATHAPPYT). Определенные консервативные аминокислотные замены предусмотрены в аминокислотных последовательностях CDR по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления антитело содержит CDR, которые отличаются от аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 1, 4, 8, 9, 11 и 13, по 1, 2, 3 или 4 аминокислотам. В определенных вариантах осуществления антитело содержит CDR, которые отличаются от аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 1, 4, 8,

9, 11 и 13, по 1, 2, 3 или 4 аминокислотам и не влияют на аффинность связывания более чем на 10%, 20% или 30%. В определенных вариантах осуществления антитела, которые специфически связывают LIF, содержат одну или несколько человеческих каркасных областей тяжелой цепи, содержащих: аминокислотную последовательность VH-FR1, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 14-17, аминокислотную последовательность VH-FR2, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 18 или 19, аминокислотную последовательность VH-FR3, которая на по меньшей мере приблизительно 90% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 20-22, или аминокислотную последовательность области VH-FR4, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 23-25. В определенных вариантах осуществления одна или несколько человеческих каркасных областей тяжелой цепи содержат аминокислотную последовательность VH-FR1, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 15, аминокислотную последовательность VH-FR2, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 19, аминокислотную последовательность VH-FR3, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 20, и аминокислотную последовательность VH-FR4, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 24. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывает LIF, содержит одну или несколько человеческих каркасных областей легкой цепи, содержащих: аминокислотную последовательность VL-FR1, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 26-29, аминокислотную последовательность VL-FR2, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 30-33, аминокислотную последовательность VL-FR3, которая

на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 34-37, или аминокислотную последовательность VL-FR4, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 38-40. В определенных вариантах осуществления одна или несколько человеческих каркасных областей легкой цепи содержат аминокислотную последовательность VL-FR1, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 27, аминокислотную последовательность VL-FR2, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 31, аминокислотную последовательность VL-FR3, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 35, и аминокислотную последовательность VL-FR4, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 38. В определенных вариантах осуществления одна или несколько человеческих каркасных областей тяжелой цепи и одна или несколько человеческих каркасных областей легкой цепи содержат все из аминокислотной последовательности VH-FR1, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 15, аминокислотной последовательности VH-FR2, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 19, аминокислотной последовательности VH-FR3, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 20, аминокислотной последовательности VH-FR4, которая на по меньшей мере приблизительно 90% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 24, аминокислотной последовательности VL-FR1, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 27, аминокислотной последовательности VL-FR2, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 31, аминокислотной

последовательности VL-FR3, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 35, и аминокислотной последовательности VL-FR4, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 38. В определенных вариантах осуществления антитело специфически связывает человеческий LIF. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывает LIF, содержит одну или несколько человеческих каркасных областей тяжелой цепи, содержащих: аминокислотную последовательность VH-FR1, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 14-17, аминокислотную последовательность VH-FR2, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 18 или 19, аминокислотную последовательность VH-FR3, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 20-22, или аминокислотную последовательность области VH-FR4, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 23-25. В определенных вариантах осуществления одна или несколько человеческих каркасных областей тяжелой цепи содержат аминокислотную последовательность VH-FR1, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 15, аминокислотную последовательность VH-FR2, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 19, аминокислотную последовательность VH-FR3, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 20, и аминокислотную последовательность VH-FR4, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 24. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывает LIF, содержит одну или несколько человеческих каркасных областей легкой цепи, содержащих: аминокислотную последовательность VL-FR1, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 26-29, аминокислотную последовательность VL-FR2, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 30-33, аминокислотную последовательность VL-FR3, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 34-37, или аминокислотную последовательность VL-FR4, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 38-40. В определенных вариантах

осуществления одна или несколько человеческих каркасных областей легкой цепи содержат аминокислотную последовательность VL-FR1, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 27, аминокислотную последовательность VL-FR2, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 31, аминокислотную последовательность VL-FR3, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 35, и аминокислотную последовательность VL-FR4, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 38. В определенных вариантах осуществления одна или несколько человеческих каркасных областей тяжелой цепи и одна или несколько человеческих каркасных областей легкой цепи содержат аминокислотную последовательность VH-FR1, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 15, аминокислотную последовательность VH-FR2, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 19, аминокислотную последовательность VH-FR3, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 20, аминокислотную последовательность VH-FR4, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 24, аминокислотную последовательность VL-FR1, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 27, аминокислотную последовательность VL-FR2, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 31, аминокислотную последовательность VL-FR3, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 35, и аминокислотную последовательность VL-FR4, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 38. В определенных вариантах осуществления антитело специфически связывает человеческий LIF.

[00113] В определенных вариантах осуществления в данном документе описано антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее переменную область гуманизированной тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 41, 42 и 44. В определенных вариантах осуществления в данном документе описано антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее переменную область гуманизированной тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность,

представленную под любым из SEQ ID NO: 41, 42 и 44. В определенных вариантах осуществления в данном документе описано антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее вариабельную область гуманизированной легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 45-48. В определенных вариантах осуществления данного документа описано антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее вариабельную область гуманизированной легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 45-48. В определенных вариантах осуществления антитело специфически связывает человеческий LIF.

[00114] В определенных вариантах осуществления в данном документе описано антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее вариабельную область гуманизированной тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO:42; и вариабельную область гуманизированной легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46. В определенных вариантах осуществления в данном документе описано антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее вариабельную область гуманизированной тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 42; и вариабельную область гуманизированной тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 46.

[00115] В определенных вариантах осуществления в данном документе описано антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее вариабельную область гуманизированной тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 66; и

вариабельную область гуманизированной легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46. В определенных вариантах осуществления в данном документе описано антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее вариабельную область гуманизированной тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 66; и вариабельную область гуманизированной тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 46.

[00116] В определенных вариантах осуществления в данном документе описано антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее гуманизированную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 57-60; и гуманизированную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 61-64. В определенных вариантах осуществления в данном документе описано антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее гуманизированную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 57-60; и гуманизированную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 61-64.

[00117] В определенных вариантах осуществления в данном документе описано антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее гуманизированную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 58; и гуманизированную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентична аминокислотной

последовательности, представленной под SEQ ID NO: 62. В определенных вариантах осуществления в данном документе описано антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее гуманизованную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 58; и гуманизованную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 62. В определенных вариантах осуществления в данном документе описано антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее гуманизованную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO:67; и гуманизованную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 62. В определенных вариантах осуществления в данном документе описано антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее гуманизованную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 67; и гуманизованную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 62.

[00118] В определенных вариантах осуществления в данном документе описано рекомбинантное антитело, которое специфически связывает лейкоз-ингибирующий фактор (LIF), содержащее определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3; определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4; определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 7; определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 9; и определяющую комплементарность область 2 легкой цепи (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 11; и определяющую комплементарность область 3 легкой цепи (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13.

[00119] В определенных вариантах осуществления в данном документе описано рекомбинантное антитело, которое специфически связывает лейкоз-ингибирующий фактор (LIF), содержащее определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 2; определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 5; определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 6; определяющая комплементарность область легкой цепи 1 (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 10; и определяющую комплементарность область 2 легкой цепи (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 12; и определяющую комплементарность область 3 легкой цепи (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13. Определенные консервативные аминокислотные замены предусмотрены в аминокислотных последовательностях CDR по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления антитело содержит CDR, которые отличаются от аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 2, 5, 6, 10, 12 и 13, по 1, 2, 3 или 4 аминокислотам. В определенных вариантах осуществления антитело содержит CDR, которые отличаются от аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 2, 5, 6, 10, 12 и 13, по 1, 2, 3 или 4 аминокислотам и не влияют на аффинность связывания более чем на 10%, 20% или 30%.

[00120] В определенных вариантах осуществления в данном документе описано рекомбинантное антитело, которое специфически связывает лейкоз-ингибирующий фактор (LIF), содержащее определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3; определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4; определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 7; определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 9; и определяющую комплементарность область 2 легкой цепи (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 11; и определяющую

комплементарность область 3 легкой цепи (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13. Определенные консервативные аминокислотные замены предусмотрены в аминокислотных последовательностях CDR по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления антитело содержит CDR, которые отличаются от аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 3, 4, 7, 9, 11 и 13, по 1, 2, 3 или 4 аминокислотам. В определенных вариантах осуществления антитело содержит CDR, которые отличаются от аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 3, 4, 7, 9, 11 и 13, по 1, 2, 3 или 4 аминокислотам и не влияют на аффинность связывания более чем на 10%, 20% или 30%.

[00121] В определенных вариантах осуществления в данном документе описано антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее гуманизованную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 49-52; и гуманизованную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 53-56. В определенных вариантах осуществления в данном документе описано антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее гуманизованную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 49-52; и гуманизованную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 53-56.

[00122] В определенных вариантах осуществления в данном документе описано антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее гуманизованную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 50; и гуманизованную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентична аминокислотной

последовательности, представленной под SEQ ID NO: 54. В определенных вариантах осуществления в данном документе описано антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее гуманизованную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 50; и гуманизованную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 54.

Эпитопы, связываемые терапевтически применимыми антителами к LIF

[00123] В данном документе описан уникальный эпитоп человеческого LIF, который при его связывании подавляет биологическую активность LIF (например, фосфорилирование STAT3) и подавляет рост опухоли *in vivo*. Описанный в данном документе эпитоп состоит из двух прерывистых участков аминокислот (от остатка 13 до остатка 32 и от остатка 120 до остатка 138 LIF человека), которые присутствуют в двух различных топологических доменах (альфа-спирали А и С) человеческого белка LIF. Данное связывание представляет собой комбинацию слабого (ван-дер-ваальсовы силы), умеренного (водородные связи) и сильного (солевой мостик) взаимодействий. В определенных вариантах осуществления контактный остаток представляет собой остаток на LIF, который образует водородную связь с остатком на антителе к LIF. В определенных вариантах осуществления контактный остаток представляет собой остаток на LIF, который образует солевой мостик с остатком на антителе к LIF. В определенных вариантах осуществления контактный остаток представляет собой остаток на LIF, который взаимодействует посредством ван-дер-ваальсовых сил с остатком на антителе к LIF и находится на расстоянии в пределах по меньшей мере 5, 4 или 3 ангстрем от него.

[00124] В определенных вариантах осуществления способы и композиции, включающие антитело, связывающее LIF, и ингибитор оси PD-1, описанные в данном документе, включают выделенное антитело, которое связывает любые один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать, восемнадцать, девятнадцать или двадцать из следующих остатков: A13, I14, R15, H16, P17, C18, H19, N20, Q25, Q29, Q32, D120, R123, S127, N128, L130, C131, C134, S135, или H138 последовательности под SEQ ID NO: 68. В определенных вариантах осуществления в данном документе описано выделенное антитело, которое связывает все следующие остатки: A13, I14, R15, H16, P17, C18, H19, N20, Q25, Q29, Q32, D120, R123, S127, N128, L130, C131, C134, S135, или H138 последовательности под SEQ ID NO: 68. В определенных вариантах осуществления в данном документе описано выделенное антитело, которое связывает все следующие

остатки: A13, I14, R15, H16, P17, C18, H19, N20, Q25, Q29, Q32, D120, R123, S127, N128, L130, C131, C134, S135, или H138 последовательности под SEQ ID NO: 68. В определенных вариантах осуществления антитело связывает только те остатки, которые участвуют в сильных или умеренных взаимодействиях с антителом. В определенных вариантах осуществления антитело связывает только те остатки, которые участвуют в сильных взаимодействиях с антителом. В определенном варианте осуществления антитело взаимодействует со спиральями А и С в LIF. В определенном варианте осуществления антитело блокирует взаимодействие LIF с gp130.

[00125] В определенных вариантах осуществления в данном документе описано антитело, содержащее CDR с аминокислотной последовательностью, представленной под любым из SEQ ID NO: 1, 4, 6, 9, 11 и 13, которое связывает любые один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать, восемнадцать, девятнадцать или двадцать из следующих остатков: A13, I14, R15, H16, P17, C18, H19, N20, Q25, Q29, Q32, D120, R123, S127, N128, L130, C131, C134, S135, или H138 последовательности под SEQ ID NO: 68. В определенных вариантах осуществления в данном документе описано антитело, содержащее CDR с аминокислотной последовательностью, представленной под любым из SEQ ID NO: 1, 4, 6, 9, 11 и 13, которое связывается со всеми следующими остатками: A13, I14, R15, H16, P17, C18, H19, N20, Q25, Q29, Q32, D120, R123, S127, N128, L130, C131, C134, S135, или H138 последовательности под SEQ ID NO: 68. В определенных вариантах осуществления антитело связывает только те остатки, которые участвуют в сильных или умеренных взаимодействиях с антителом. В определенных вариантах осуществления антитело связывает только те остатки, которые участвуют в сильных взаимодействиях с антителом.

[00126] В определенных вариантах осуществления в данном документе описано антитело, содержащее CDR с аминокислотной последовательностью, представленной под любым из SEQ ID NO: 1, 4, 8, 9, 11 и 13, которое связывает любой один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать, восемнадцать, девятнадцать или двадцать из следующих остатков: A13, I14, R15, H16, P17, C18, H19, N20, Q25, Q29, Q32, D120, R123, S127, N128, L130, C131, C134, S135, или H138 последовательности под SEQ ID NO: 68. В определенных вариантах осуществления в данном документе описано антитело, содержащее CDR с аминокислотной последовательностью, представленной под любым из SEQ ID NO: 1, 4, 8, 9, 11 и 13, которое связывается со всеми следующими остатками: A13,

I14, R15, H16, P17, C18, H19, N20, Q25, Q29, Q32, D120, R123, S127, N128, L130, C131, C134, S135, или H138 последовательности под SEQ ID NO: 68. В определенных вариантах осуществления антитело связывает только те остатки, которые участвуют в сильных или умеренных взаимодействиях с антителом. В определенных вариантах осуществления антитело связывает только те остатки, которые участвуют в сильных взаимодействиях с антителом.

[00127] В определенных вариантах осуществления в данном документе описано антитело, содержащее CDR, которые отличаются от аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 1, 4, 6, 9, 11 и 13 по 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотам, и которое связывает любые один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать, восемнадцать, девятнадцать или двадцать из следующих остатков: A13, I14, R15, H16, P17, C18, H19, N20, Q25, Q29, Q32, D120, R123, S127, N128, L130, C131, C134, S135, или H138 последовательности под SEQ ID NO: 68. В определенных вариантах осуществления в данном документе описано антитело, содержащее CDR, которые отличаются от аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 1, 4, 6, 9, 11 и 13 по 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотам, и которое связывается со всеми следующими остатками: A13, I14, R15, H16, P17, C18, H19, N20, Q25, Q29, Q32, D120, R123, S127, N128, L130, C131, C134, S135, или H138 последовательности под SEQ ID NO: 68. В определенных вариантах осуществления антитело связывает только те остатки, которые участвуют в сильных или умеренных взаимодействиях с антителом. В определенных вариантах осуществления антитело связывает только те остатки, которые участвуют в сильных взаимодействиях с антителом.

[00128] В определенных вариантах осуществления в данном документе описано антитело, содержащее CDR, которые отличаются от аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 1, 4, 8, 9, 11 и 13 по 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотам, и которое связывает любые один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать, восемнадцать, девятнадцать или двадцать из следующих остатков: A13, I14, R15, H16, P17, C18, H19, N20, Q25, Q29, Q32, D120, R123, S127, N128, L130, C131, C134, S135, или H138 последовательности под SEQ ID NO: 68. В определенных вариантах осуществления в данном документе описано антитело, содержащее CDR, которые отличаются от аминокислотной последовательности,

представленной под любым из SEQ ID NO: 1, 4, 8, 9, 11 и 13 по 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотам, и связываются со всеми следующими остатками: A13, I14, R15, H16, P17, C18, H19, N20, Q25, Q29, Q32, D120, R123, S127, N128, L130, C131, C134, S135, или H138 последовательности под SEQ ID NO: 68. В определенных вариантах осуществления антитело связывает только те остатки, которые участвуют в сильных или умеренных взаимодействиях с антителом. В определенных вариантах осуществления антитело связывает только те остатки, которые участвуют в сильных взаимодействиях с антителом.

[00129] В определенных вариантах осуществления в данном документе описано антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее аминокислотную последовательность вариабельной области гуманизированной тяжелой цепи, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO:42; и аминокислотную последовательность вариабельной области гуманизированной легкой цепи, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46, и которое связывает любые один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать, восемнадцать, девятнадцать или двадцать из следующих остатков: A13, I14, R15, H16, P17, C18, H19, N20, Q25, Q29, Q32, D120, R123, S127, N128, L130, C131, C134, S135, или H138 последовательности под SEQ ID NO: 68. В определенных вариантах осуществления в данном документе описано антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее аминокислотную последовательность вариабельной области гуманизированной тяжелой цепи, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO:42; и аминокислотную последовательность вариабельной области гуманизированной легкой цепи, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46, и которое связывает все из следующих остатков: A13, I14, R15, H16, P17, C18, H19, N20, Q25, Q29, Q32, D120, R123, S127, N128, L130, C131, C134, S135, или H138 последовательности под SEQ ID NO: 68. В определенных вариантах

осуществления антитело связывает только те остатки, которые участвуют в сильных или умеренных взаимодействиях с антителом. В определенных вариантах осуществления антитело связывает только те остатки, которые участвуют в сильных взаимодействиях с антителом.

[00130] В определенных вариантах осуществления в данном документе описано антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее аминокислотную последовательность вариабельной области гуманизированной тяжелой цепи, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 66; и аминокислотную последовательность вариабельной области гуманизированной легкой цепи, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46, и которое связывает любые один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать, восемнадцать, девятнадцать или двадцать из следующих остатков: A13, I14, R15, H16, P17, C18, H19, N20, Q25, Q29, Q32, D120, R123, S127, N128, L130, C131, C134, S135, или H138 последовательности под SEQ ID NO: 68. В определенных вариантах осуществления в данном документе описано антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее аминокислотную последовательность вариабельной области гуманизированной тяжелой цепи, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 66; и аминокислотную последовательность вариабельной области гуманизированной легкой цепи, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46, и которое связывает все из следующих остатков: A13, I14, R15, H16, P17, C18, H19, N20, Q25, Q29, Q32, D120, R123, S127, N128, L130, C131, C134, S135, или H138 последовательности под SEQ ID NO: 68. В определенных вариантах осуществления антитело связывает только те остатки, которые участвуют в сильных или умеренных взаимодействиях с антителом. В определенных вариантах осуществления

антитело связывает только те остатки, которые участвуют в сильных взаимодействиях с антителом.

[00131] В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе антитела ингибируют передачу сигналов LIF в клетках. В определенных вариантах осуществления значение IC_{50} для биологического ингибирования антителом в условиях сывороточного голодания в клетках U-251 меньше или равно приблизительно 100, 75, 50, 40, 30, 20, 10, 5, или 1 наномоль. В определенных вариантах осуществления значение IC_{50} для биологического ингибирования антителом в условиях сывороточного голодания в клетках U-251 меньше или равно приблизительно 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, или 100 наномоль.

[00132] В определенных вариантах осуществления раскрытые в данном документе антитела применимы для лечения опухолей и рака, которые экспрессируют LIF. В определенных вариантах осуществления индивидуум, получавший лечение с помощью антител по настоящему изобретению, был выбран для лечения как имеющий LIF-положительную опухоль/LIF-положительный рак. В определенных вариантах осуществления опухоль является LIF-положительной или продуцирует повышенные уровни LIF. В определенных вариантах осуществления LIF-позитивность определяют путем сравнения с референтным значением или набором патологических критериев. В определенных вариантах осуществления LIF-положительная опухоль экспрессирует LIF в количестве, которое в более чем 2 раза, 3 раза, 5 раз, 10 раз, 100 раз или больше превышает количество LIF, которое экспрессирует нетрансформированная клетка, из которой произошла опухоль. В определенных вариантах осуществления опухоль приобрела эктопическую экспрессию LIF. LIF-положительная опухоль может быть определена гистологически с использованием, например, иммуногистохимического анализа с применением антитела к LIF; посредством широко применяемых методик молекулярной биологии, таких как, например, количественное определение мРНК посредством ПЦР в режиме реального времени или секвенирование РНК; или количественное определение белка, например, посредством вестерн-блоттинга, проточной цитометрии, ELISA или гомогенного количественного анализа белка (например, AlphaLISA[®]). В определенных вариантах осуществления антитела можно использовать для лечения пациентов, у которых диагностирован рак. В определенных вариантах осуществления рак включает одну или более раковых стволовых клеток или представляет собой одну или более раковых стволовых клеток.

[00133] В определенных вариантах осуществления раскрытые в данном документе антитела применимы для лечения опухолей при тех видах рака, которые экспрессируют рецептор LIF (CD118). Опухоль, положительная по рецептору LIF, может быть определена посредством гистопатологического анализа или проточной цитометрии и в определенных вариантах осуществления включает клетку, которая связывает антитело к рецептору LIF с более чем 2х, 3х, 4х, 5х, 10х или большей силой по сравнению с изотипическим контролем В определенных вариантах осуществления опухоль приобрела эктопическую экспрессию рецептора LIF. В определенном варианте осуществления рак представляет собой раковую стволовую клетку. В определенном варианте осуществления LIF-положительная опухоль или рак могут быть определены иммуногистохимическим анализом с использованием антитела к LIF антитела к LIF. В определенном варианте осуществления LIF-положительную опухоль определяют посредством иммуногистохимического (ИНС) анализа уровня экспрессии LIF в основных 10%, 20%, 30%, 40% или основных 50% опухолей.

[00134] Описанные в данном документе антитела влияют на множество результатов. В определенном варианте осуществления описанные в данном документе антитела могут уменьшать присутствие макрофагов M2 в опухолях на по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60 %, 70%, 80%, 90% или больше в опухолевой модели по сравнению с контрольным антителом (например, изотипическим контролем). Макрофаги M2 могут быть идентифицированы путем окрашивания на CCL22 и CD206 в иммуногистохимическом (ИНС) анализе срезов или посредством проточной цитометрии опухоль-инфильтрирующих иммунных или миелоидных клеток. В определенном варианте осуществления описанные в данном документе антитела могут уменьшать связывание LIF с gp130 в опухолях на по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60 %, 70%, 80%, 90% или больше по сравнению с контрольным антителом (например, изотипическим контролем). В определенном варианте осуществления описанные в данном документе антитела могут уменьшать передачу сигналов LIF на по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60 %, 70%, 80%, 90% или больше в LIF-чувствительной клеточной линии по сравнению с контрольным антителом (например, изотипическим контролем). С помощью вестерн-блоттинга передача сигналов LIF может быть измерена, например, по фосфорилированию STAT3 (нисходящей мишени в сигнальном пути LIF). Антитела в данном документе также являются высокоспецифичными к LIF по сравнению с другими цитокинами, являющимися представителями семейства IL-6. В определенных вариантах осуществления антитела связывают человеческий LIF с аффинностью, которая в

приблизительно 10х, приблизительно 50х или приблизительно 100х превышает этот показатель у любого другого цитокина семейства IL-6. В определенных вариантах осуществления антитела к LIF не связываются с другими цитокинами семейства IL-6, которые продуцируются в системе млекопитающего. В определенных вариантах осуществления антитела не связываются с онкостатином M, который продуцируется в системе млекопитающего.

[00135] В определенных вариантах осуществления полипептиды, связывающие LIF, и антитела можно вводить любым путем, подходящим для введения фармацевтических композиций, содержащих антитела, таким как, например, подкожный, интраперитонеальный, внутривенный, внутримышечный, интратуморальный или интрацеребральный и т. д. В определенных вариантах осуществления антитела вводят внутривенно. В определенных вариантах осуществления антитела вводят согласно подходящей схеме введения, например, раз в неделю, два раза в неделю, раз в месяц, два раза в месяц и т. д. В определенных вариантах осуществления антитела вводят один раз в три недели. Антитела можно вводить в любом терапевтически эффективном количестве. В определенных вариантах осуществления терапевтически приемлемое количество составляет от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг. В определенных вариантах осуществления терапевтически приемлемое количество составляет от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 40 мг/кг. В определенных вариантах осуществления терапевтически приемлемое количество составляет от приблизительно 5 мг/кг до приблизительно 30 мг/кг. Полипептид, связывающий LIF, или антитело можно вводить в/в в течение периода времени по меньшей мере приблизительно 60 минут; однако этот период может несколько варьироваться в зависимости от условий, относящихся к каждому отдельному введению.

Ингибиторы оси PD-1

[00136] Ось PD-1 представляет собой сигнальный путь, посредством которого PD-1 оказывает ингибирующее действие на T-клеточные ответы, и он включает взаимодействие PD-1 с PDL-1 или PDL-2. Полипептиды, связывающие LIF, и антитела, описанные в данном документе, можно комбинировать с ингибитором оси PD-1 и применять в способе лечения опухоли, рака или другого новообразования. В определенных вариантах осуществления полипептиды, связывающие LIF, и антитела, описанные в данном документе, могут быть объединены с ингибитором оси PD-1 в фармацевтической композиции, применимой для лечения рака, опухоли или другого новообразования. Антитело h5D8, описанное в данном документе, можно комбинировать с ингибитором оси

PD-1 и применять в способе лечения опухоли, рака или другого новообразования. В определенных вариантах осуществления антитело h5D8, описанное в данном документе, можно комбинировать с ингибитором оси PD-1 в фармацевтической композиции, применимой для лечения рака, опухоли или другого новообразования.

[00137] Ингибитор оси PD-1, используемый в композициях и способах в данном документе, может ингибировать передачу сигналов через PD-1 (CD279), PDL-1 (CD274) или PDL-2 (CD273). Ингибитор может представлять собой антитело или фрагмент антитела, растворимую слитую конструкцию лиганд-Fc или низкомолекулярный ингибитор. В определенных вариантах осуществления ингибитор оси PD-1 предусматривает антитело или его фрагмент, связывающий PD-1. В определенных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают PD-1 (CD279), предусматривают пембролизумаб, ниволумаб, AMP-514, спартализумаб, тислелизумаб (BGB-A317), пидилизумаб или их фрагмент, связывающий PD-1 (CD279). В определенных вариантах осуществления ингибитор оси PD-1 представляет собой слитый белок на основе PD-L2 Fc (например, AMP-224). В определенных вариантах осуществления ингибитор оси PD-1 предусматривает антитело или его фрагмент, которые специфически связывают PDL-1 (CD274). В определенных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с PDL-1 (CD274), предусматривают дурвалумаб (MEDI 4376), атезолизумаб, авелумаб, BMS-936559 или FAZ053 или их фрагмент, связывающий PDL-1 (CD274). В определенных вариантах осуществления ингибитор оси PD-1 предусматривает антитело или его фрагмент, связывающий PDL-2, которые специфически связывают PDL-2 (CD273).

[00138] В определенных вариантах осуществления ингибитор оси PD-1 включает один или более низкомолекулярных ингибиторов, таких как N-{2-[(2-метокси-6-[(2-метил[1,1'-бифенил]-3-ил)метокси]пиридин-3-ил)метил]амино}этил}ацетамид (BMS 202); (2-((3-цианобензил)окси)-4-((3-(2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-ил)-2-метилбензил)окси)-5-метилбензил)-D-серина гидрохлорид; (2R,4R)-1-(5-хлор-2-((3-цианобензил)окси)-4-((3-(2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-ил)-2-метилбензил)окси)бензил)-4-гидроксипирролидин-2-карбоновая кислота; 3-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-1-фенилиндол; 3-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-1-фенил-1H-индол; L-α-глутамин, N2, N6-бис(L-серил-L-аспарагинил-L-треонил-L-серил-L-α-глутамил-L-серил-L-фенилаланил)-L-лизил-L-фенилаланил-L-аргинил-L-валил-L-треонил-L-глутаминил-L-лейцил-L-аланил-L-пролил-L-лизил-L-аланил-L-глутаминил-L-изолейцил-L-лизил; (2S)-1-[[2,6-диметокси-4-

[(2-метил[1,1'-бифенил]-3-ил)метокси]фенилметил]-2-пиперидинкарбоновая кислота; глицинамид, N-(2-меркаптоацетил)-L-фенилаланил-N-метил-L-аланил-L-аспарагинил-L-пролил-L-гистидил-L-лейцил-N-метилглицил-L-триптофил-L-серил-L-триптофил-N-метил-L-норлейцил-N-метил-L-норлейцил-L-аргинил-L-цистеинил-, циклический(1→14)-тиоэфир или их производное или аналог.

[00139] В определенных вариантах осуществления ингибиторы оси PD-1 можно вводить любым путем, подходящим для введения низкомолекулярного полипептида или фармацевтической композиции, содержащей антитело, таким как, например, подкожный, интраперитонеальный, внутривенный, внутримышечный, интратуморальный, интрацеребральный или пероральный. В определенных вариантах осуществления антитела, ингибирующие ось PD-1, вводят внутривенно. В определенных вариантах осуществления антитела, ингибирующие ось PD-1, вводят согласно подходящей схеме введения доз, например, один раз в неделю, два раза в неделю, раз в месяц, два раза в месяц и один раз в две недели, один раз в три недели или один раз в четыре недели. Антитела можно вводить в любом терапевтически эффективном количестве. В определенных вариантах осуществления терапевтически приемлемое количество составляет от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг. В определенных вариантах осуществления терапевтически приемлемое количество составляет от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 40 мг/кг. В определенных вариантах осуществления терапевтически приемлемое количество составляет от приблизительно 5 мг/кг до приблизительно 30 мг/кг. В определенных вариантах осуществления терапевтически приемлемое количество составляет от приблизительно 5 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг. В определенных вариантах осуществления терапевтически приемлемое количество составляет от приблизительно 5 мг/кг до приблизительно 15 мг/кг. В определенных вариантах осуществления терапевтически приемлемое количество составляет приблизительно 5 мг/кг, 6 мг/кг, 7 мг/кг, 8 мг/кг, 9 мг/кг, 10 мг/кг, 11 мг/кг, 12 мг/кг, 13 мг/кг, 14 мг/кг, 15 мг/кг, 16 мг/кг, 17 мг/кг, 18 мг/кг, 19 мг/кг или 20 мг/кг. В одном примере дурвалумаб можно вводить в дозе, составляющей приблизительно 10 мг/кг один раз в две недели.

[00140] В определенных вариантах осуществления индивидууму можно вводить ингибиторы оси PD-1 в фиксированной дозе, составляющей от приблизительно 100 миллиграммов до приблизительно 1000 миллиграммов. В определенных вариантах осуществления индивидууму можно вводить ингибиторы оси PD-1 в фиксированной дозе, составляющей от приблизительно 200 миллиграммов до приблизительно 800

миллиграммов, от приблизительно 200 миллиграммов до приблизительно 600 миллиграммов, от приблизительно 200 миллиграммов до приблизительно 500 миллиграммов, от приблизительно 300 миллиграммов до приблизительно 500 миллиграммов. В определенных вариантах осуществления индивидууму можно вводить ингибиторы оси PD-1 в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 или 1000 миллиграммов. В определенных вариантах осуществления индивидууму можно вводить ингибиторы оси PD-1 на уровне, подходящем для монотерапии. Например, ниволумаб можно вводить в дозе, составляющей приблизительно 240 миллиграммов каждые две недели или приблизительно 480 миллиграммов каждые четыре недели. В другом примере пембролизумаб можно вводить в дозе, составляющей приблизительно 200 миллиграммов один раз в три недели.

Дозировки h5D8

[00141] В определенных вариантах осуществления антитело h5D8 можно вводить любым путем, подходящим для введения фармацевтических композиций, содержащих антитела, таким как, например, подкожный, интраперитонеальный, внутривенный, внутримышечный, интратуморальный или интрацеребральный и т. д. В определенных вариантах осуществления h5D8 вводят внутривенно. В определенных вариантах осуществления h5D8 вводят в соответствии с подходящей схемой введения доз, например, раз в неделю, два раза в неделю, раз в месяц, два раза в месяц и т. д. В определенных вариантах осуществления h5D8 вводят один раз в три недели. H5D8 можно вводить в любом терапевтически эффективном количестве. В определенных вариантах осуществления терапевтически приемлемое количество составляет от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг. В определенных вариантах осуществления терапевтически приемлемое количество составляет от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 40 мг/кг. В определенных вариантах осуществления терапевтически приемлемое количество составляет от приблизительно 5 мг/кг до приблизительно 30 мг/кг. Антитело h5D8 можно вводить в фиксированной дозе независимо от веса или массы индивидуума, которому вводят антитело h5D8. Антитело h5D8 можно вводить в фиксированной дозе независимо от веса или массы индивидуума, которому вводят антитело h5D8, при условии, что масса индивидуума составляет по меньшей мере приблизительно 37,5 килограмма. Фиксированная доза h5D8 для введения может составлять от приблизительно 75 до приблизительно 2000 миллиграммов. Фиксированная доза h5D8 для введения может составлять от приблизительно 225 до приблизительно 2000

миллиграммов, от приблизительно 750 до приблизительно 2000 миллиграммов, от приблизительно 1125 до приблизительно 2000 миллиграммов или от приблизительно 1500 до приблизительно 2000 миллиграммов. Фиксированная доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 75 миллиграммов. Фиксированная доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 225 миллиграммов. Фиксированная доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 750 миллиграммов. Фиксированная доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 1125 миллиграммов. Фиксированная доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 1500 миллиграммов. Фиксированная доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 2000 миллиграммов.

[00142] Предполагаются и другие дозировки h5D8. Фиксированная доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 50, 100, 150, 175, 200, 250, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, 775, 800, 825, 850, 875, 900, 925, 950, 975, 1000, 1025, 1050, 1075, 1100, 1150, 1175, 1200, 1225, 1250, 1275, 1300, 1325, 1350, 1375, 1400, 1425, 1450, 1475, 1525, 1550, 1575, 1600, 1625, 1650, 1675, 1700, 1725, 1750, 1775, 1800, 1825, 1850, 1875, 1900, 1925, 1950, 1975, 2025, 2050, 2075, или 2100 миллиграммов. Любую из этих доз можно вводить один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели или один раз в четыре недели.

[00143] Фиксированная доза h5D8 для введения может составлять от приблизительно 75 миллиграммов до приблизительно 2000 миллиграммов один раз в неделю. Фиксированная доза h5D8 для введения может составлять от приблизительно 75 миллиграммов до приблизительно 1500 миллиграммов один раз в неделю. Фиксированная доза h5D8 для введения может составлять от приблизительно 225 миллиграммов до приблизительно 1500 миллиграммов, от приблизительно 750 миллиграммов до приблизительно 1500 миллиграммов, от приблизительно 1125 миллиграммов до приблизительно 1500 один раз в неделю. Фиксированная доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 75 миллиграммов один раз в неделю. Фиксированная доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 225 миллиграммов один раз в неделю. Фиксированная доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 750 миллиграммов один раз в неделю. Фиксированная доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 1125 миллиграммов один раз в неделю. Фиксированная доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 1500 миллиграммов один раз в неделю. Фиксированная доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 2000 миллиграммов один раз в неделю.

Фиксированная доза h5D8 для введения может составлять от приблизительно 75 миллиграммов до приблизительно 1500 миллиграммов один раз в четыре недели. Фиксированная доза h5D8 для введения может составлять от приблизительно 225 миллиграммов до приблизительно 1500 миллиграммов, от приблизительно 750 миллиграммов до приблизительно 1500 миллиграммов, от приблизительно 1125 миллиграммов до приблизительно 1500 один раз в четыре недели. Фиксированная доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 75 миллиграммов один раз в четыре недели. Фиксированная доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 225 миллиграммов один раз в четыре недели. Фиксированная доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 750 миллиграммов один раз в четыре недели. Фиксированная доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 1125 миллиграммов один раз в четыре недели. Фиксированная доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 1500 миллиграммов один раз в четыре недели. Фиксированная доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 2000 миллиграммов один раз в четыре недели.

[00147] Антитело h5D8 можно вводить в дозе исходя из веса или массы тела индивидуума, которому вводят антитело h5D8. Скорректированная по весу тела доза h5D8 для введения может составлять от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 25 мг/кг. Скорректированная по весу тела доза h5D8 для введения может составлять от приблизительно 3 мг/кг до приблизительно 25 мг/кг, от приблизительно 10 мг/кг до приблизительно 25 мг/кг, от приблизительно 15 мг/кг до приблизительно 25 мг/кг или от приблизительно 20 мг/кг до приблизительно 25 мг/кг. Скорректированная по весу тела доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 1 мг/кг. Скорректированная по весу тела доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 3 мг/кг. Скорректированная по весу тела доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 10 мг/кг. Скорректированная по весу тела доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 15 мг/кг. Скорректированная по весу тела доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 20 мг/кг. Скорректированная по весу тела доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 25 мг/кг.

[00148] Скорректированная по весу тела доза h5D8 для введения может составлять от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 25 мг/кг один раз в три недели. Скорректированная по весу тела доза h5D8 для введения может составлять от приблизительно 3 мг/кг до приблизительно 25 мг/кг, от приблизительно 10 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 15 мг/кг до приблизительно 25 мг/кг или от

приблизительно 20 мг/кг до приблизительно 25 мг/кг один раз в неделю, один раз в две, три или четыре недели.

[00149] Также предусматриваются и другие скорректированные по весу тела дозы h5D8. Скорректированная по весу тела доза h5D8 может составлять приблизительно 2 мг/кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг, 6 мг/кг, 7 мг/кг, 8 мг/кг, 9 мг/кг, 11 мг/кг, 12 мг/кг, 13 мг/кг, 14 мг/кг, 16 мг/кг, 17 мг/кг, 18 мг/кг, 19 мг/кг, 21 мг/кг, 22 мг/кг, 23 мг/кг, 24 мг/кг, 26 мг/кг, 27 мг/кг, 28 мг/кг, 29 мг/кг или 30 мг/кг. Любую из этих доз можно вводить один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели или один раз в четыре недели.

[00150] Скорректированная по весу тела доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 1 мг/кг один раз в неделю Скорректированная по весу тела доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 3 мг/кг один раз в неделю Скорректированная по весу тела доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 10 мг/кг один раз в неделю Скорректированная по весу тела доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 15 мг/кг один раз в неделю Скорректированная по весу тела доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 20 мг/кг один раз в неделю Скорректированная по весу тела доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 25 мг/кг один раз в неделю

[00151] Скорректированная по весу тела доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 1 мг/кг один раз в две недели Скорректированная по весу тела доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 3 мг/кг один раз в две недели Скорректированная по весу тела доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 10 мг/кг один раз в две недели Скорректированная по весу тела доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 15 мг/кг один раз в две недели Скорректированная по весу тела доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 20 мг/кг один раз в две недели Скорректированная по весу тела доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 25 мг/кг один раз в две недели

[00152] Скорректированная по весу тела доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 1 мг/кг один раз в три недели Скорректированная по весу тела доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 3 мг/кг один раз в три недели Скорректированная по весу тела доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 10 мг/кг один раз в три недели Скорректированная по весу тела доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 15 мг/кг один раз в три недели Скорректированная по весу тела доза h5D8 для введения может составлять

приблизительно 20 мг/кг один раз в три недели Скорректированная по весу тела доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 25 мг/кг один раз в три недели

[00153] Скорректированная по весу тела доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 1 мг/кг один раз в четыре недели Скорректированная по весу тела доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 3 мг/кг один раз в четыре недели Скорректированная по весу тела доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 10 мг/кг один раз в четыре недели Скорректированная по весу тела доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 15 мг/кг один раз в четыре недели Скорректированная по весу тела доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 20 мг/кг один раз в четыре недели Скорректированная по весу тела доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 25 мг/кг один раз в четыре недели

[00154] Любую из доз, подробно описанных в данном документе, можно вводить в/в в течение периода времени, составляющего по меньшей мере приблизительно 60 минут; однако этот период может несколько варьироваться в зависимости от условий, относящихся к каждому отдельному введению.

Схемы введения комбинированных средств терапии

[00155] Комбинированное лечение, предусматривающее полипептид, связывающий LIF, и ингибитор оси PD-1, можно вводить различными способами. Полипептид, связывающий LIF, и ингибитор оси PD-1 можно вводить одновременно по одной и той же схеме или в разное время и по разным схемам. В случае введения в одно и то же время введение может осуществляться посредством отдельных составов или одного состава, содержащего как полипептид, связывающий LIF, так и ингибитор оси PD-1. Способы введения можно комбинировать, например полипептид, связывающий LIF, можно вводить внутривенно, а ингибитор оси PD-1 вводить перорально или парентерально. В определенных вариантах осуществления полипептид, связывающий LIF, вводят внутривенно, парентерально, подкожно, интратуморально или перорально. В определенных вариантах осуществления ингибитор оси PD-1 вводят внутривенно, парентерально, подкожно, интратуморально или перорально.

[00156] Когда комбинированное лечение назначается индивидууму по одной и той же схеме, полипептид, связывающий LIF, и ингибитор оси PD-1 можно вводить один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели или один раз в четыре недели. Полипептид, связывающий LIF, и ингибитор оси PD-1 можно вводить по отдельности или в одном составе. H5D8 и ингибитор оси PD-1 можно вводить по отдельности или одним составом.

[00157] Если комбинированное лечение назначается индивидууму по разным схемам, введение полипептида, связывающего LIF, и ингибитора оси PD-1 можно чередовать. В определенных вариантах осуществления ингибитор оси PD-1 можно вводить индивидууму один или несколько раз до введения полипептида, связывающего LIF. Полипептид, связывающий LIF, можно вводить в течение 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней или 6 дней после введения ингибитора оси PD-1. Полипептид, связывающий LIF, можно вводить в течение 1, 2, 3 или 4 недель после введения ингибитора оси PD-1. Антитело h5D8 можно вводить в течение 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней или 6 дней после введения ингибитора оси PD-1. Антитело h5D8 можно вводить в течение 1, 2, 3 или 4 недель после введения ингибитора оси PD-1.

[00158] Полипептид, связывающий LIF, можно вводить индивидууму один или несколько раз до введения ингибитора оси PD-1. В определенных вариантах осуществления ингибитор оси PD-1 можно вводить в течение 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней или 6 дней после введения полипептида, связывающего LIF. В определенных вариантах осуществления ингибитор оси PD-1 можно вводить в течение 1 недели, 2 недель, 3 недель или 4 недель после введения полипептида, связывающего LIF. В определенных вариантах осуществления ингибитор оси PD-1 можно вводить в течение 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней или 6 дней после введения антитела h5D8. В определенных вариантах осуществления ингибитор оси PD-1 можно вводить в течение 1 недели, 2 недель, 3 недель или 4 недель после введения антитела h5D8.

[00159] В определенных вариантах осуществления полипептид, связывающий LIF, можно вводить индивидууму один раз в неделю, а ингибитор оси PD1 можно вводить индивидууму раз в неделю, раз в две недели, раз в три недели или раз в четыре недели. В определенных вариантах осуществления полипептид, связывающий LIF, можно вводить индивидууму один раз в две недели, а ингибитор оси PD1 можно вводить индивидууму раз в неделю, раз в две недели, раз в три недели или раз в четыре недели. В определенных вариантах осуществления полипептид, связывающий LIF, можно вводить индивидууму один раз в три недели, а ингибитор оси PD1 можно вводить индивидууму раз в неделю, раз в две недели, раз в три недели или раз в четыре недели. В определенных вариантах осуществления полипептид, связывающий LIF, можно вводить индивидууму один раз в четыре недели, а ингибитор оси PD1 можно вводить индивидууму раз в неделю, раз в две недели, раз в три недели или раз в четыре недели. В определенных вариантах осуществления ингибитор оси PD1 можно вводить индивидууму один раз в неделю, а полипептид, связывающий LIF, можно вводить индивидууму раз в неделю, раз в две

недели, раз в три недели или раз в четыре недели. В определенных вариантах осуществления ингибитор оси PD1 можно вводить индивидууму один раз в две недели, а полипептид, связывающий LIF, можно вводить индивидууму раз в неделю, раз в две недели, раз в три недели или раз в четыре недели. В определенных вариантах осуществления ингибитор оси PD1 можно вводить индивидууму один раз в три недели, а полипептид, связывающий LIF, можно вводить индивидууму раз в неделю, раз в две недели, раз в три недели или раз в четыре недели. В определенных вариантах осуществления ингибитор оси PD1 можно вводить индивидууму один раз в четыре недели, а полипептид, связывающий LIF, можно вводить индивидууму раз в неделю, раз в две недели, раз в три недели или раз в четыре недели. В определенных вариантах осуществления h5D8 можно вводить индивидууму один или несколько раз до введения ингибитора оси PD-1. В определенных вариантах осуществления h5D8 можно вводить индивидууму один раз в неделю, а ингибитор оси PD1 можно вводить индивидууму раз в неделю, раз в две недели, раз в три недели или раз в четыре недели. В определенных вариантах осуществления h5D8 можно вводить индивидууму один раз в две недели, а ингибитор оси PD1 можно вводить индивидууму раз в неделю, раз в две недели, раз в три недели или раз в четыре недели. В определенных вариантах осуществления h5D8 можно вводить индивидууму один раз в три недели, а ингибитор оси PD1 можно вводить индивидууму раз в неделю, раз в две недели, раз в три недели или раз в четыре недели. В определенных вариантах осуществления h5D8 можно вводить индивидууму один раз в четыре недели, а ингибитор оси PD1 можно вводить индивидууму раз в неделю, раз в две недели, раз в три недели или раз в четыре недели.

[00160] Комбинированное лечение согласно настоящему изобретению может предусматривать комбинации, где один или оба активных ингредиента (например, полипептид, связывающий LIF, и ингибитор PD-1) не эффективны по отдельности, но эффективны при введении в качестве части комбинированного лечения. В определенных вариантах осуществления ингибитор PD-1 вводят на уровне, не эффективном в режиме монотерапии, но эффективном в комбинации с полипептидом, связывающим LIF. В определенных вариантах осуществления ингибитор PD-1 вводят на уровне, не эффективном в режиме монотерапии, но эффективном в комбинации с антителом h5D8. В определенных вариантах осуществления полипептид, связывающий LIF, вводят на уровне, не эффективном в режиме монотерапии, но эффективном в комбинации с ингибитором PD-1. В определенных вариантах осуществления h5D8 вводят на уровне, не эффективном в режиме монотерапии, но эффективном в комбинации с ингибитором PD-1. В

определенных вариантах осуществления и полипептид, связывающий LIF, и ингибитор PD-1 вводят на уровне, не эффективном в режиме монотерапии, но эффективном в комбинации. В определенных вариантах осуществления и h5D8, и ингибитор PD-1 вводят на уровне, не эффективном в режиме монотерапии, но эффективном в комбинации.

Показания к применению

[00161] В определенных вариантах осуществления, раскрытых в данном документе, представлены способы и композиции, применимые для лечения рака или опухоли. В определенных вариантах осуществления рак включает опухоли молочной железы, сердца, легкого, тонкой кишки, толстой кишки, селезенки, почки, мочевого пузыря, головы, шеи, яичника, предстательной железы, мозга, поджелудочной железы, кожи, кости, костного мозга, крови, тимуса, матки, яичка и печени. В определенных вариантах осуществления опухоли, которые можно лечить с помощью антител по настоящему изобретению, включают аденому, аденокарциному, ангиосаркому, астроцитому, эпителиальную карциному, герминому, глиобластому, глиому, гемангиоэндотелиому, гемангиосаркому, гематому, гепатобластому, лейкоз, лимфому, медуллобластому, меланому, нейробластому, остеосаркому, ретинобластому, рабдомиосаркому, саркому и/или тератому. В определенных вариантах осуществления опухоль/рак выбраны из группы, состоящей из акральной лентицинозной меланомы, актинического кератоза, аденокарциномы, аденоидно-кистозной карциномы, аденом, аденосаркомы, аденосквamousной карциномы, астроцитарных опухолей, карциномы бартолиновой железы, базальноклеточной карциномы, карциномы бронхиальной железы, капиллярного карциноида, карциномы, карциносаркомы, холангиокарциномы, хондросаркомы, цистаденомы, опухоли эндодермального синуса, гиперплазии эндометрия, саркомы стромы эндометрия, эндометриоидной аденокарциномы, эпендимальной саркомы, саркомы Юинга, очаговой узловой гиперплазии, гастриномы, опухолей из клеток зародышевой линии, глиобластомы, глюкагономы, гемангиобластомы, гемангиоэндотелиомы, гемангиомы, аденомы печени, аденоматоза печени, гепатоцеллюлярной карциномы, инсулинита, интраэпителиального новообразования, интраэпителиального плоскоклеточного новообразования, инвазивной плоскоклеточной карциномы, крупноклеточной карциномы, липосаркомы, карциномы легкого, лимфобластного лейкоза, лимфоцитарного лейкоза, лейомиосаркомы, меланомы, злокачественной меланомы, злокачественной мезотелиальной опухоли, шванномы, медуллобластомы, медуллоэпителиомы, мезотелиомы, мукоэпидермоидной карциномы, миелоидного лейкоза нейробластомы, нейроэпителиальной аденокарциномы, узловой

меланомы, остеосаркомы, карциномы яичника, папиллярной серозной аденокарциномы, опухолей гипофиза, плазмацитомы, псевдосаркомы, карциномы предстательной железы, легочной бластомы, почечно-клеточной карциномы, ретинобластомы, рабдомиосаркомы, саркомы, серозной карциномы, плоскоклеточной карциномы, мелкоклеточной карциномы, карциномы мягких тканей, соматостатин-секретирующей опухоли, плоскоклеточной карциномы, недифференцированной карциномы, увеальной меланомы, веррукозной карциномы, карциномы влагалища/вульвы, опухоли, секретирующей вазоактивный интестинальный полипептид (ВИПомы), и опухоли Вильмса. В определенных вариантах осуществления опухоль/рак, подлежащие лечению с помощью одного или нескольких антител по настоящему изобретению, включают рак головного мозга, рак головы и шеи, колоректальную карциному, острый миелоидный лейкоз, пре-B-клеточный острый лимфобластный лейкоз, рак мочевого пузыря, астроцитому, предпочтительно астроцитому II, III или IV степени, глиобластому, мультиформную глиобластому, мелкоклеточный рак и немелкоклеточный рак, предпочтительно немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого, метастатическую меланому, андроген-независимый метастатический рак предстательной железы, андроген-зависимый метастатический рак предстательной железы, аденокарциному предстательной железы и рак молочной железы, предпочтительно протоковый рак молочной железы и/или карциному молочной железы. В определенных вариантах осуществления рак, подлежащий лечению с помощью антител по настоящему изобретению, включает глиобластому. В определенных вариантах осуществления рак, подлежащий лечению с помощью одного или нескольких антител по настоящему изобретению, включает рак поджелудочной железы. В определенных вариантах осуществления рак, подлежащий лечению с помощью одного или нескольких антител по настоящему изобретению, включает рак яичника. В определенных вариантах осуществления рак, подлежащий лечению с помощью одного или нескольких антител по настоящему изобретению, включает рак легкого. В определенных вариантах осуществления рак, подлежащий лечению с помощью одного или нескольких антител по настоящему изобретению, включает рак предстательной железы. В определенных вариантах осуществления рак, подлежащий лечению с помощью одного или нескольких антител по настоящему изобретению, включает рак толстой кишки. В определенных вариантах осуществления рак, подлежащий лечению, включает глиобластому, рак поджелудочной железы, рак яичника, рак толстой кишки, рак предстательной железы или рак легкого. В определенном варианте осуществления рак является рефрактерным к другому лечению. В определенном варианте осуществления рак, который лечат, является

рецидивирующим. В определенном варианте осуществления рак представляет собой рецидивирующие/рефрактерные глиобластома, рак поджелудочной железы, рак яичника, рак толстой кишки, рак предстательной железы или рак легкого. В определенных вариантах осуществления рак включает распространенную солидную опухоль, глиобластома, рак желудка, рак кожи, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичка, рак щитовидной железы, рак головы и шеи, рак печени, рак почки, рак пищевода, рак яичника, рак толстой кишки, рак легкого, лимфому или рак мягких тканей. В определенных вариантах осуществления рак включает немелкоклеточный рак легкого, эпителиальную карциному яичника или аденокарциному поджелудочной железы. В определенных вариантах осуществления рак включает распространенную солидную опухоль. В определенных вариантах осуществления индивидуум является рефрактерным к предыдущему лечению с помощью антитела, связывающего LIF, в режиме монотерапии. В определенных вариантах осуществления индивидуум является рефрактерным к предыдущему лечению с помощью ингибитора оси PD-1 в режиме монотерапии.

Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, носители и разбавители

[00162] В определенных вариантах осуществления ингибиторы оси PD-1 и полипептиды, связывающие LIF, по настоящему изобретению являются компонентами фармацевтической композиции. В определенных вариантах осуществления ингибиторы оси PD-1 и полипептиды, связывающие LIF, по настоящему изобретению являются компонентами одной фармацевтической композиции. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит физиологически приемлемую концентрацию соли (например, NaCl). В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит от приблизительно 0,6% до 1,2% NaCl. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит от приблизительно 0,7% до 1,1% NaCl. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит от приблизительно 0,8% до 1,0% NaCl. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит приблизительно 5% декстрозы. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит один или несколько из следующих компонентов: буферы, например, ацетатный, цитратный, гистидиновый, сукцинатный, фосфатный, бикарбонатный и гидроксиметиламинометан (трис); поверхностно-активные вещества, например, полисорбат 80 (Твин 80), полисорбат 20 (Твин 20), полисорбат и поллоксамер 188; полиолы/дисахариды/полисахариды, например,

глюкозу, декстрозу, маннозу, маннит, сорбит, сахарозу, трегалозу и декстран 40; аминокислоты, например, гистидин, глицин или аргинин; антиоксиданты, например, аскорбиновую кислоту, метионин; и хелатирующие средства, например ЭДТА или ЭГТК.

[00163] В определенных вариантах осуществления ингибиторы оси PD-1, полипептиды, связывающие LIF, или и ингибиторы оси PD-1, и полипептиды, связывающие LIF, по настоящему изобретению вводят в виде суспензии в стерильном растворе. В определенных вариантах осуществления ингибиторы оси PD-1 и полипептиды, связывающие LIF, вводят в одном растворе. В определенных вариантах осуществления раствор содержит физиологически приемлемую концентрацию соли (например, NaCl). В определенных вариантах осуществления раствор содержит от приблизительно 0,6% до 1,2% NaCl. В определенных вариантах осуществления раствор содержит от приблизительно 0,7% до 1,1% NaCl. В определенных вариантах осуществления раствор содержит от приблизительно 0,8% до 1,0% NaCl. В определенных вариантах осуществления высококонцентрированный исходный раствор антитела можно разбавить в приблизительно 0,9% NaCl. В определенных вариантах осуществления раствор содержит приблизительно 0,9% NaCl. В определенных вариантах осуществления раствор дополнительно содержит один или несколько из следующих компонентов: буферы, например, ацетатный, цитратный, гистидиновый, сукцинатный, фосфатный, бикарбонатный и гидроксиметиламинометан (трис); поверхностно-активные вещества, например, полисорбат 80 (твин 80), полисорбат 20 (твин 20), полисорбат и полоксамер 188; полиолы/дисахариды/полисахариды, например, глюкозу, декстрозу, маннозу, маннит, сорбит, сахарозу, трегалозу и декстран 40 и их комбинации; аминокислоты, например, гистидин, глицин или аргинин; антиоксиданты, например, аскорбиновую кислоту, метионин и их комбинации; и хелатирующие средства, например, ЭДТА или ЭГТК. В определенных вариантах осуществления ингибиторы оси PD-1 и полипептиды, связывающие LIF, по настоящему изобретению транспортируют/хранят в лиофилизированном виде и восстанавливают перед введением. В определенных вариантах осуществления лиофилизированные составы антител содержат объемообразующее средство, такое как маннит, сорбит, сахароза, трегалоза и декстран 40 и их комбинации. В определенном варианте осуществления антитела к LIF по настоящему изобретению можно транспортировать и хранить в виде концентрированного исходного раствора, подлежащего разбавлению в месте использования. В определенных вариантах осуществления исходный раствор содержит приблизительно 25 мМ гистидина, приблизительно 6% сахарозы, приблизительно 0,01% полисорбата и приблизительно 20

мг/мл антитела к LIF. В определенных вариантах осуществления показатель рН раствора составляет приблизительно 6,0. В определенных вариантах осуществления состав, вводимый индивидууму, представляет собой водный раствор, содержащий приблизительно 25 мМ гистидина, приблизительно 6% сахарозы, приблизительно 0,01% полисорбата 80 и приблизительно 20 мг/мл антитела h5D8. В определенных вариантах осуществления показатель рН раствора составляет приблизительно 6,0.

[00164] В определенных вариантах осуществления ингибиторы оси PD-1 и полипептиды, связывающие LIF, по настоящему изобретению вводят в виде суспензии в стерильном растворе. В определенных вариантах осуществления ингибиторы оси PD-1 и полипептиды, связывающие LIF, вводят в одном растворе. В определенных вариантах осуществления ингибиторы оси PD-1 и полипептиды, связывающие LIF, вводят в отдельных растворах. В определенных вариантах осуществления раствор содержит физиологически приемлемую концентрацию соли (например, NaCl). В определенных вариантах осуществления раствор содержит от приблизительно 0,6% до 1,2% NaCl. В определенных вариантах осуществления раствор содержит от приблизительно 0,7% до 1,1% NaCl. В определенных вариантах осуществления раствор содержит от приблизительно 0,8% до 1,0% NaCl. В определенных вариантах осуществления высококонцентрированный исходный раствор антитела можно разбавить в приблизительно 0,9% NaCl. В определенных вариантах осуществления раствор содержит приблизительно 0,9% NaCl. В определенных вариантах осуществления раствор дополнительно содержит один или несколько из следующих компонентов: буферы, например, ацетатный, цитратный, гистидиновый, сукцинатный, фосфатный, бикарбонатный и гидроксиметиламинометан (трис); поверхностно-активные вещества, например, полисорбат 80 (твин 80), полисорбат 20 (твин 20), полисорбат и полоксамер 188; полиолы/дисахариды/полисахариды, например, глюкозу, декстрозу, маннозу, маннит, сорбит, сахарозу, трегалозу и декстран 40 и их комбинации; аминокислоты, например, гистидин, глицин или аргинин; антиоксиданты, например, аскорбиновую кислоту, метионин; и хелатирующие средства, например, ЭДТА или ЭГТК. В определенных вариантах осуществления ингибиторы оси PD-1 и полипептиды, связывающие LIF, по настоящему изобретению транспортируют/хранят в лиофилизированном виде и восстанавливают перед введением. В определенных вариантах осуществления лиофилизированные составы антител содержат объемобразующее средство, такое как маннит, сорбит, сахароза, трегалоза и декстран 40 и их комбинации. В определенном варианте осуществления антитела к LIF по настоящему изобретению можно

транспортировать и хранить в виде концентрированного исходного раствора, подлежащего разбавлению в месте использования. В определенных вариантах осуществления исходный раствор содержит приблизительно 25 мМ гистидина, приблизительно 6% сахарозы, приблизительно 0,01% полисорбата и приблизительно 20 мг/мл антитела к LIF. В определенных вариантах осуществления показатель pH раствора составляет приблизительно 6,0. В определенных вариантах осуществления состав, вводимый индивидууму, представляет собой водный раствор, содержащий приблизительно 25 мМ гистидина, приблизительно 6% сахарозы, приблизительно 0,01% полисорбата 80 и приблизительно 20 мг/мл антитела h5D8. В определенных вариантах осуществления показатель pH раствора составляет приблизительно 6,0.

[00165] Также в данном документе описаны наборы, предназначенные для проведения описанных в данном документе видов комбинированной терапии. В определенных вариантах осуществления набор содержит полипептид, связывающий LIF, и ингибитор оси PD-1. В определенных вариантах осуществления набор содержит h5D8 и ингибитор оси PD-1. Один или оба компонента могут находиться во флаконе из стекла или другом подходящем материале или в лиофилизированной, или в жидкой форме.

[00166] Антитело h5D8, описанное в данном документе, может быть включено в набор, содержащий флакон, заполненный стерильным раствором, содержащим антитело h5D8 в концентрации приблизительно 20 мг/мл, приблизительно 25 мМ гистидина, приблизительно 6% сахарозы и приблизительно 0,01% полисорбата 80. Флакон может представлять собой одноразовый стеклянный флакон. Одноразовый стеклянный флакон может быть заполнен приблизительно 10 миллилитрами антитела h5D8 в концентрации приблизительно 20 мг/мл, приблизительно 25 мМ гистидина, приблизительно 6% сахарозы и приблизительно 0,01% полисорбата 80. В определенных вариантах осуществления показатель pH раствора составляет приблизительно 6,0. Антитело h5D8, описанное в данном документе, может быть включено в набор, содержащий флакон, заполненный лиофилизированной композицией, содержащей антитело h5D8, которое при восстановлении в соответствующем количестве стерильного разбавителя дает концентрацию, составляющую приблизительно 20 мг/мл антитела h5D8, приблизительно 25 мМ гистидина, приблизительно 6% сахарозы и приблизительно 0,01% полисорбата 80. Флакон может представлять собой одноразовый стеклянный флакон.

[00167] Антитела, описанные в данном документе, можно вводить, готовить или разбавлять для введения различными способами в зависимости от уровня дозы, который в конечном итоге должен быть доставлен пациенту. Это можно осуществлять, например,

для оптимизации фармацевтических свойств дозы для пациента, например, для уменьшения количества взвешенных частиц. h5D8 можно приготовить в концентрации приблизительно 8 мг/мл независимо от конечной дозы, доставляемой пациенту. В определенных вариантах осуществления h5D8 можно приготовить в концентрации, составляющей не более приблизительно 10, 9, 8, 7, 6, 5 или 4 мг/мл. В определенных вариантах осуществления h5D8 можно приготовить в концентрации, составляющей более приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 мг/мл.

ПРИМЕРЫ

[00168] Следующие иллюстративные примеры представляют варианты осуществления композиций и способов, описанных в данном документе, и никоим образом не предназначены для ограничения.

Пример 1. Получение крысиных антител, специфических к LIF.

[00169] КДНК, кодирующую аминокислоты 23-202 человеческого LIF, клонировали в экспрессионные плазмиды (Aldevron GmbH, Фрайбург, Германия). Группы лабораторных крыс (Wistar) иммунизировали путем внутрикожного введения частиц золота, покрытых ДНК, с использованием ручного устройства для бомбардировки частицами ("генной пушки"). Экспрессию на клеточной поверхности временно трансфицированных клеток НЕК подтверждали с использованием антител к метке, распознающих метку, присоединенную к N-концу белка LIF. Образцы сыворотки крови собирали после серий иммунизаций и тестировали посредством проточной цитометрии на клетках НЕК, временно трансфицированных вышеупомянутыми экспрессионными плазмидами. Антителопродуцирующие клетки выделяли и подвергали слиянию с клетками миеломы мыши (Ag8) в соответствии со стандартными процедурами. Гибридомы, продуцирующие антитела, специфические к LIF, идентифицировали путем скрининга с помощью проточной цитометрии, как это описано выше. Осадки положительных клеток гибридомы получали с использованием средства для стабилизации и защиты клеточной РНК (RNAlater, № по кат. AM7020, ThermoFisher Scientific) и дополнительно обрабатывали для секвенирования переменных доменов антител.

Пример 2. Получение мышинных антител, специфических к LIF

[00170] КДНК, кодирующую аминокислоты 23-202 человеческого LIF, клонировали в экспрессионные плазмиды (Aldevron GmbH, Фрайбург, Германия). Группы лабораторных мышей (NMRI) иммунизировали путем внутрикожного введения частиц золота, покрытых ДНК, с использованием ручного устройства для бомбардировки частицами ("генной пушки"). Экспрессию на клеточной поверхности временно трансфицированных клеток

НЕК подтверждали с использованием антител к метке, распознающих метку, присоединенную к N-концу белка LIF. Образцы сыворотки крови собирали после серий иммунизаций и тестировали посредством проточной цитометрии на клетках НЕК, временно трансфицированных вышеупомянутыми экспрессионными плазидами. Антителопродуцирующие клетки выделяли и подвергали слиянию с клетками миеломы мыши (Ag8) в соответствии со стандартными процедурами. Гибридомы, продуцирующие антитела, специфические к LIF, идентифицировали путем скрининга с помощью проточной цитометрии, как это описано выше. Осадки положительных клеток гибридомы получали с использованием средства для стабилизации и защиты клеточной РНК (RNAlater, № по кат. AM7020, ThermoFisher Scientific) и дополнительно обрабатывали для секвенирования переменных доменов антител.

Пример 3. Гуманизация крысиных антител, специфических к LIF

[00171] Один клон (5D8), полученный в результате иммунизации крыс, выбрали для последующей гуманизации. Гуманизацию проводили с использованием стандартных методов прививания CDR. Области тяжелой цепи и легкой цепи клонировали из гибридомы 5D8 с использованием стандартных методик молекулярного клонирования и секвенировали по методу Сэнгера. Затем проводили поиск BLAST переменных последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи человека, и 4 последовательности из каждой выбрали в качестве акцепторных каркасов для гуманизации. Эти акцепторные каркасы подвергали деиммунизации для удаления эпитопов Т-клеточного ответа. CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и легкой цепи 5D8 клонировали в 4 разных акцепторных каркаса тяжелой цепи (H1 - H4) и в 4 разных акцепторных каркаса легкой цепи (L1 - L4). Затем все 16 разных антител тестировали на: экспрессию в клетках CHO-S (Selexis); ингибирование LIF-индуцированного фосфорилирования STAT3; и аффинность связывания посредством поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Данные по экспериментам обобщены в **таблице 1**.

Таблица 1. Сводные данные по гуманизации 5D8			
Комбинация тяжелой цепи и легкой цепи	Ингибирование LIF-индуцированного pSTAT3 согласно фиг. 1	Аффинность по SPR, K_{D1} (пМ)	Экспрессия (мкг/мл)
H0L0	+++	133±46	393
H1L1	-	н. п.	627
H1L2	+++	55±23	260
H1L3	+++	54±31	70
H1L4	-	н. п.	560
H2L1	-	н. п.	369
H2L2	+++	52±22	392
H2L3	++	136±19	185
H2L4	-	н. п.	78
H3L1	н. п.	н. п.	Экспрессия отсутствует
H3L2	н. п.	н. п.	Экспрессия отсутствует
H3L3	н. п.	н. п.	Экспрессия отсутствует
H3L4	н. п.	н. п.	Экспрессия отсутствует
H4L1	-	н. п.	259
H4L2	++	913±308	308
H4L3	+		252
H4L4	-	н. п.	186
н. п. = не проверяли; H0L0 = химерное антитело с полными переменными областями тяжелой и легкой цепей крысы			

[00172] Характеристики экспрессии трансфицированных клеток сравнивали в колбах Эрленмейера (посев 3×10^5 клеток/мл, объем культуры 200 мл) в ходе культивирования с подпиткой после 10 дней культивирования клеток. На данном этапе клетки собирали и секреторируемое антитело очищали с использованием колонки с белком А, а затем

определяли количественно. Наблюдали экспрессию всех гуманизированных антител за исключением тех, которые содержали тяжелую цепь H3 (SEQ ID NO: 43). Варибельные области H2 и L2 показали хорошие результаты по сравнению с другими варибельными областями (SEQ ID NO: 42 и SEQ ID NO: 46).

[00173] Ингибирование LIF-индуцированного фосфорилирования STAT3 по тирозину 705 определяли посредством вестерн-блоттинга. Клетки глиомы U251 высевали в 6-луночные планшеты при плотности 100000 клеток/луночка. Клетки культивировали в полной среде в течение 24 часов перед любой обработкой, а после этого клетки подвергали сывороточному голоданию в течение 8 часов. После этого клетки инкубировали в течение ночи с указанными антителами в концентрации 10 мкг/мл. После обработки белки выделяли с использованием буфера для лизиса для анализа радиоиммунопреципитации (RIPA), содержащего ингибиторы фосфатаз и протеаз, количественно определяли (BCA-protein assay, Thermo Fisher Scientific) и использовали в вестерн-блоттинге. Для вестерн-блоттинга мембраны блокировали в течение 1 часа в 5% обезжиренном сухом молоке - TBST и инкубировали с первичным антителом в течение ночи (p-STAT3, № по каталогу 9145, Cell Signaling или STAT3, № по каталогу 9132, Cell Signaling) или 30 минут (β -актин-пероксидаза, № по каталогу A3854, Sigma-Aldrich). Затем мембраны промывали в TBST, инкубировали со вторичным антителом и снова промывали. Белки детектировали по хемиллюминесценции (SuperSignal Substrate, № по каталогу 34076, Thermo Fisher Scientific). Данные результаты показаны на **фиг. 1**. Чем темнее полоса pSTAT3, тем меньше ингибирование. Ингибирование было высоким в дорожках, обозначенных 5D8 (негуманизированное крысиное антитело), A (H0L0), C (H1L2), D (H1L3) и G (H2L2); ингибирование было умеренным в H (H2L3), O (H4L2) и P (H4L3); ингибирование отсутствовало в B (H1L1), E (H1L4), F (H2L1), I (H2L4), N (H4L1) и Q (H4L4).

[00174] Затем антитела, которые показали ингибирование LIF-индуцированного фосфорилирования STAT3, анализировали посредством SPR для определения аффинности связывания. Вкратце, связывание гуманизированных антител A (H0L0), C (H1L2), D (H1L3) и G (H2L2), H (H2L3) и O (H4L2) со связанным по аминокруппе hLIF выявляли в анализе с использованием прибора Biacore™ 2002. Кинетические константы и показатели аффинности определяли путем математической аппроксимации сенсограмм (модель взаимодействия Ленгмюра [$A + B = AB$]) среди всех сенсограмм, полученных на всех поверхностях сенсорного чипа при шести концентрациях лиганда. Для расчета кинетических констант и показателей аффинности использовали кривые наилучшей аппроксимации (минимальное значение χ^2) для каждой концентрации. См. **таблицу 1**.

[00175] Поскольку в экспериментальной модели в качестве аналитов использовали двухвалентные антитела, сенсограммы с наилучшей аппроксимацией также анализировали на основе модели аппроксимации двухвалентного аналита [$A + B = AB$; $AB + B = AB_2$], чтобы получить более подробное представление о механизме связывания мишени гуманизированными антителами. Анализ кинетических сенсограмм с использованием модели аппроксимации двухвалентного аналита [$A + B = AB$; $AB + B = AB_2$] подтвердил ранжирование образцов mAb по относительной аффинности.

[00176] Гуманизированное 5D8, содержащее H2 и L2, выбрали для более детального анализа из-за его высокой аффинности связывания и высокого выхода из периодической культуры.

Пример 4. Гуманизация клона 5D8 улучшает связывание с LIF

[00177] Клон H2L2 (h5D8) выбрали для дальнейшего анализа и посредством SPR сравнивали связывание с исходным крысиным 5D8 (r5D8) и мышинным клоном 1B2. Антитело 1B2 представляет собой ранее описанное мышинное антитело к LIF, депонированное в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen GmbH (DSMZ ACC3054) и включенное в целях сравнения. Рекомбинантный человеческий LIF, выделенный из клеток *E. coli* и HEK-293 соответственно, использовали в качестве лигандов. LIF от человека или из *E. coli* ковалентно связывали с поверхностью оптических сенсорных чипов Biacore с использованием химии иммобилизации по аминокислотной группе, и показатели аффинности связывания рассчитывали на основе кинетических констант.

Материалы и способы

[00178] Человеческий LIF из *E. coli* получили от Millipore, ссылка в каталоге LIF 1010; человеческий LIF из клеток HEK-293 получили от ACRO Biosystems, ссылка в каталоге LIF-H521b. LIF иммобилизовали на сенсорных чипах с использованием набора Biacore Amine Coupling Kit (BR-1000-50; GE-Healthcare, Уппсала, Швеция). Образцы анализировали на приборе Biacore™ 2002 с использованием оптических сенсорных чипов CM5 (BR-1000-12; GE-Healthcare, Уппсала, Швеция). Буфер Biacore HBS-EP использовали в ходе выполнения циклов (BR-1001-88; GE-Healthcare, Уппсала, Швеция). Кинетический анализ сенсограмм связывания проводили с использованием программы BIAevaluation 4.1. Кинетические константы и показатели аффинности определяли путем математической аппроксимации сенсограмм (модель взаимодействия Ленгмюра [$A + B = AB$]) среди всех сенсограмм, полученных на всех поверхностях сенсорного чипа при возрастающих концентрациях аналита. Сенсограммы также анализировали на основе модели аппроксимации сенсограммы двухвалентного аналита [$A + B = AB$; $AB + B = AB_2$],

включая компонентный анализ, чтобы произвести оценку вклада двухвалентного анализата в определенные аффинности антитела к мишени по Ленгмюру (например, вклад в авидность). Для расчета кинетических констант и показателей аффинности использовали кривые наилучшей аппроксимации (минимальное значение χ^2) для каждой концентрации. Краткое изложение данных экспериментов аффинности показано в **таблице 2** (человеческий LIF, полученный в *E. coli*) и **таблице 3** (человеческий LIF, полученный в клетках HEK 293).

Таблица 2. Улучшенное связывание 5D8 после гуманизации	K_D [пМ]	
	Аппроксимация сенсограммы по Ленгмюру 1:1	Аппроксимация двухвалентного анализата
hLIF (<i>E. coli</i>)		
Мышиное антитело 1B2	400±210	1500±200
r5D8 (крысиное)	130±30	780±130
h5D8 (гуманизированное)	26±14	82±25

Таблица 3. Улучшенное связывание 5D8 после гуманизации	K_D [пМ]	
	Аппроксимация сенсограммы по Ленгмюру 1:1	Аппроксимация двухвалентного анализата
hLIF (HEK 293)		
Мышиное антитело 1B2	320±150	3900±900
r5D8 (крысиное)	135±100	410±360
h5D8 (гуманизированное)	13±6	63±30

[00179] Модель аппроксимации сенсограммы Ленгмюра 1:1 из этой серии экспериментов показывает, что гуманизированное антитело 5D8 (h5D8) связывалось с LIF человека с аффинностью, которая в ~10-25 раз больше, чем аффинность у мышиного 1B2 мыши и r5D8.

[00180] Затем антитело h5D8 тестировали с LIF нескольких видов с использованием SPR. Кинетику связывания h5D8 по SPR проверяли для рекомбинантных аналитов LIF, полученных от разных видов и систем экспрессии: человеческий LIF (*E. coli*, клетки HEK293); мышинный LIF (клетки *E. coli*, CHO); крысиный LIF (*E. coli*); LIF макака-крабоведа (дрожжи, клетки HEK293).

Материалы и способы

[00181] Антитело h5D8 иммобилизовали на поверхности сенсорного чипа нековалентным Fc-специфическим захватом. Рекомбинантный Ig(Fc)-специфический белок A/G *S. aureus* использовали в качестве захватывающего средства, обеспечивающего стерически однородную и гибкую презентацию антитела к LIF аналитам LIF. Источники аналитов LIF следующие: человеческий LIF человека (из *E. coli*; ссылка в каталоге Millipore LIF 1050); человеческий LIF (из клеток HEK, ACRO Biosystems LIF-H521); мышинный LIF (*E. coli*; Millipore № по кат. NF-LIF2010); мышинный LIF (из клеток CHO; ReproKine № по каталогу RCP09056); LIF обезьяны (дрожжи Kingfisher Biotech № по каталогу RP1074Y); LIF обезьяны, продуцируемый в клетках HEK-293. В целом h5D8 проявлял связывание с LIF нескольких видов. Краткое изложение данных по эксперименту аффинности показано в таблице 4.

Аналит	Аппроксимация сенсограммы по Ленгмюру 1:1		
	Среднее значение K_a (1/M c) [10^5]	Среднее значение K_d (1/c) [10^{-5}]	Среднее значение K_D [пМ]
Человеческий LIF (<i>E. coli</i>)	8,5 ± 0,7	7,2 ± 0,7	86 ± 9
Человеческий LIF (HEK-293)	5,5 ± 0,02	3,1 ± 0,7	56 ± 13
Мышинный LIF (<i>E. coli</i>)	21,4 ± 3,7	5,7 ± 1,0	27 ± 6
Мышинный LIF (клетки CHO)	6,5 ± 0,7	1,1 ± 0,3	17 ± 4
LIF макака-крабоведа (дрожжи)	6,3 ± 0,8	5,4 ± 0,7	89 ± 10
LIF макака-крабоведа (HEK-293)	2,4 ± 0,2	3,3 ± 0,3	134 ± 6

Пример 5. Гуманизированный клон h5D8 ингибирует LIF-индуцированное фосфорилирование STAT3 in vitro

[00182] Чтобы определить биологическую активность h5D8, гуманизированные и исходные версии тестировали на модели клеточной культуры активации LIF. На **фиг. 2А** показано, что гуманизированный клон демонстрировал повышенное ингибирование фосфорилирования STAT3 (Туг 705), когда клеточную линию глиомы инкубировали с LIF человека. На **фиг. 2В** показан эксперимент с той же моделью, что и на **фиг. 2А**, повторенный с разными разведениями антитела h5D8.

Материалы и способы

[00183] Клетки глиомы U251 высевали в 6-луночные планшеты при плотности 150000 клеток/луночка. Клетки культивировали в полной среде в течение 24 часов перед любой обработкой. После этого клетки обрабатывали в течение ночи путем инкубации с антителом г5D8 к LIF или антителом h5D8 к LIF в концентрации 10 мкг/мл или не обрабатывали (контрольные клетки).

[00184] После обработки белки выделяли с использованием буфера для лизиса для анализа радиоиммунопреципитации (RIPA), содержащего ингибиторы фосфатаз и протеаз, количественно определяли (BCA-protein assay, Thermo Fisher Scientific) и использовали в вестерн-блоттинге. Для вестерн-блоттинга мембраны блокировали в течение 1 часа в 5% обезжиренном молоке - TBST и инкубировали с первичным антителом в течение ночи (p-STAT3, № по каталогу 9145, Cell Signaling или STAT3, № по каталогу 9132, Cell Signaling) или 30 минут (β -актин-пероксидаза, № по каталогу A3854, Sigma-Aldrich). Затем мембраны промывали в TBST, при необходимости инкубировали со вторичным антителом и снова промывали. Белки детектировали по хемилюминесценции (SuperSignal Substrate, № по каталогу 34076, Thermo Fisher Scientific).

Пример 6. Значение IC₅₀ при обработке антителом h5D8 на эндогенные уровни LIF в клетках U-251

[00185] Также определили, что IC₅₀ составляет всего 490 пикомоль (**фиг. 3А**) для биологического ингибирования h5D8 в условиях сывороточного голодания в клетках U-251. См. репрезентативные результаты на **фиг. 3А** и **3В** и в **таблице 5**.

Таблица 5.								
Ткань клеточной линии	Название клеточной линии	Обработка	IC ₅₀ (нМ)				IC ₉₀ (нМ)	Ингибирование JAK (%)
			n=1	n=2	Среднее значение	SD		
		Условие эндогенного LIF						
GBM	U251	h5D8	0,78	0,54	0,66	0,12	4,1	84%
		r5D8	1,6	1,5	1,4	0,15	8,5	86%
			1,2	1,4				

Материалы и способы

[00186] Клетки U-251 высевали из расчета 600000 клеток на 6-сантиметровую чашку (на одно условие). Клетки обрабатывали с использованием h5D8 в соответствующей концентрации (титре) в течение ночи при температуре 37°C в условиях сывороточного голодания (0,1% FBS). В качестве положительного контроля для pSTAT3 использовали рекомбинантный LIF (R&D №7734-LF/CF) для стимуляции клеток при 1,79 нМ в течение 10 минут при 37°C. В качестве отрицательного контроля для pSTAT3 использовали ингибитор JAK I (Calbiochem №420099) при 1 мкМ в течение 30 мин при 37°C. Затем клетки собирали на льду для получения лизатов в соответствии с протоколами наборов Meso Scale Discovery Multi-Spot Assay System Total STAT3 (№ по кат. K150SND-2) и Phospho-STAT3 (Tyr705) (№ по кат. K150SVD-2) для измерения уровней белка, определяемых с помощью MSD Meso Sector S600.

Пример 7. Дополнительные антитела, которые специфически связываются с человеческим LIF человека.

[00187] Идентифицировали другие клоны крысиного антитела (10G7 и 6B5), которые специфически связывают человеческий LIF, и краткое изложение их характеристик связывания приведено ниже в **таблице 6**, клон 1B2 служит для сравнения.

Материалы и способы

[00188] Кинетический анализ связывания в режиме реального времени выполняли для mAb 1B2, 10G7 и 6B5 к LIF, иммобилизованных на поверхности оптических сенсорных чипов CM5, с применением рекомбинантных белков-мишеней LIF [человеческий LIF

(*E. coli*); Millipore № по кат. LIF 1010 и человеческий LIF (клетки HEK293); ACRO Biosystems № по кат. LIF-H521b] в качестве аналитов.

[00189] Кинетические константы и показатели аффинности получали путем математической аппроксимации сенсограммы с использованием модели связывания Ленгмюра 1:1 с применением глобальных алгоритмов (одновременная аппроксимация наборов сенсограмм), а также алгоритмов аппроксимации одной кривой. Достоверность глобальных аппроксимаций оценивали с помощью анализа k_{obs} .

Таблица 6. Измерение аффинности дополнительных антител к LIF		Аппроксимация сенсограммы по Ленгмюру 1:1		
Аналит	Клон	Среднее значение K_a (1/М с)	Среднее значение K_d (1/с)	Среднее значение K_D [нМ]
Человеческий LIF (<i>E. coli</i>)	1B2	$1,1 \pm 0,4E5$	$1,1 \pm 0,3E-3$	$9,7 \pm 1,4$
Человеческий LIF (HEK-293)	1B2	$2,0 \pm 0,04E6$	$1,4 \pm 0,2E-3$	$0,7 \pm 0,03$
Человеческий LIF (<i>E. coli</i>)	10G7	$7,9 \pm 5,8E4$	$6,0 \pm 2,3E-4$	$12,6 \pm 9,5$
Человеческий LIF (HEK-293)	10G7	$3,6 \pm 1,75E5$	$3,1 \pm 0,5E-4$	$1,1 \pm 0,6$
Человеческий LIF (<i>E. coli</i>)	6B5	н. п.	н. п.	н. п.
Человеческий LIF (HEK-293)	6B5	$3,6 \pm 1,7E5$	$3,1 \pm 0,5E-4$	62 ± 6

Пример 8. Дополнительные антитела к LIF ингибируют LIF-индуцированное фосфорилирование STAT3 in vitro.

[00190] Дополнительные клоны тестировали на их способность ингибировать LIF-индуцированное фосфорилирование STAT3 в культуре клеток. Как показано на **фиг. 4**, клоны 10G7 и ранее подробно описанный r5D8 проявляли высокое ингибирование LIF-индуцированного фосфорилирования STAT3 по сравнению с клоном 1B2. Поликлональные антисыворотки к LIF (поз.) включили в качестве положительного контроля. Хотя 6B5 не показывал ингибирования, это можно объяснить возможным отсутствием связывания 6B5 с негликозилированным LIF, который использовали в данном эксперименте.

Материалы и способы

[00191] Полученные от пациента клетки глиомы высевали в 6-луночные планшеты при плотности 150000 клеток/лунка. Клетки культивировали в среде GBM, которая состояла из среды Neurobasal (Life Technologies), дополненной B27 (Life Technologies), пенициллином/стрептомицином и факторами роста (20 нг/мл EGF и 20 нг/мл FGF-2 [PeproTech]) в течение 24 часов перед любой обработкой. На следующий день клетки обрабатывали с использованием рекомбинантного LIF, продуцируемого в *E. coli*, или с использованием смеси рекомбинантного LIF с указанными антителами в течение 15 минут (конечная концентрация 10 мкг/мл для антител и 20 нг/мл рекомбинантного LIF), или не обрабатывали. После обработки белки выделяли с использованием буфера для лизиса для анализа радиоиммунопреципитации (RIPA), содержащего ингибиторы фосфатаз и протеаз, количественно определяли (BCA-protein assay, Thermo Fisher Scientific) и использовали в вестерн-блоттинге. Для вестерн-блоттинга мембраны блокировали в течение 1 часа в 5% обезжиренном молоке - TBST и инкубировали с первичным антителом в течение ночи (p-STAT3, № по каталогу 9145, Cell Signaling) или 30 минут (β -актин-пероксидаза, № по каталогу A3854, Sigma-Aldrich). Затем мембраны промывали в TBST, при необходимости инкубировали со вторичным антителом и снова промывали. Белки детектировали по хемилюминесценции (SuperSignal Substrate, № по каталогу 34076, Thermo Fisher Scientific).

Пример 9. LIF высоко сверхэкспрессируется при нескольких типах опухолей

[00192] Проводили иммуногистохимический анализ нескольких типах опухолей человека для определения степени экспрессии LIF. На **фиг. 5** показано, что LIF высоко экспрессируется при мультиформной глиобластоме (GBM), немелкоклеточном раке легкого (NSCLC), раке яичника, колоректальном раке (CRC) и раке поджелудочной железы.

Пример 10. Гуманизированный клон h5D8 ингибирует рост опухоли в мышинной модели немелкоклеточной карциномы легкого

[00193] Для определения способности гуманизированного клона 5D8 ингибировать LIF-положительный рак *in vivo* данное антитело тестировали в мышинной модели немелкоклеточной карциномы легкого (NSCLC). На **фиг. 6А** показано уменьшение роста опухоли у мышей, обработанных данным антителом, по сравнению с отрицательным контролем в виде среды-носителя. На **фиг. 6В** показаны данные, полученные с использованием версии r5D8.

Материалы и способы

[00194] Клеточную линию немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) KLN205 с высокими уровнями LIF инфицировали лентивирусом для стабильной экспрессии гена люциферазы светлячка с целью для мониторинга биолюминесценции *in vivo*. Для создания мышинной модели 5×10^5 клеток немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) KLN205 ортотопически имплантировали в левое легкое иммунокомпетентным сингенным мышам DBA/2 в возрасте 8 недель посредством межреберной пункции. Мышей обрабатывали контролем в виде среды-носителя или с использованием 15 или 30 мг/кг антитела h5D8 интраперитонеально два раза в неделю, и рост опухоли контролировали посредством биолюминесценции. Для визуализации биолюминесценции мышам интраперитонеально вводили 0,2 мл 15 мг/мл D-люциферина под 1-2% ингаляционным наркозом изофлураном. Сигналы биолюминесценции контролировали с использованием системы IVIS серии 2000 (Xenogen Corp., Аламеда, Калифорния, США), состоящей из высокочувствительной охлаждаемой CCD-камеры. Программное обеспечение Living Image (Xenogen Corp.) использовали для сопоставления данных визуализации и интеграции общих сигналов биолюминесценции в каждой области, отмеченной рамкой. Данные анализировали с использованием общего потока фотонов (фотоны/секунда) в представляющих интерес областях (ROI). Результаты демонстрируют, что лечение с использованием антитела h5D8 способствует регрессии опухоли. Данные представлены в виде среднего значения \pm SEM.

Пример 11. h5D8 ингибирует рост опухоли в мышинной модели мультиформной глиобластомы

[00195] В ортотопической модели опухоли GBM с использованием линии клеток U251 человека, экспрессирующих люциферазу, r5D8 значительно уменьшал объемы опухоли у мышей, которым вводили 300 мкг r5D8 и h5D8 путем интраперитонеальной инъекции два раза в неделю. Результаты данного исследования показаны на **фиг. 7А** (количественное определение на 26 день после обработки). Данный эксперимент также проводили с

использованием мышей, которых обрабатывали с использованием 200 мкг или 300 мкг гуманизированного h5D8, и результаты показали статистически значимое уменьшение опухоли через 7 дней обработки.

Материалы и способы

[00196] Клетки U251, стабильно экспрессирующие люциферазу, собирали, промывали в PBS, центрифугировали при 400g в течение 5 мин, ресуспендировали в PBS и подсчитывали с использованием автоматического цитометра (Countess, Invitrogen). Клетки хранили на льду для поддержания оптимальной жизнеспособности. Мышей анестезировали путем интраперитонеального введения кетамина (Ketolar50®)/ксилацина (Romprín®) (75 мг/кг и 10 мг/кг соответственно). Каждую мышь осторожно помещали в стереотаксическое устройство и иммобилизовали. Волосы с головы удаляли кремом для депиляции, а кожу головы рассекали скальпелем, чтобы обнажить череп. С помощью сверла осторожно сделали небольшой разрез в координатах 1,8 мм латеральнее и 1 мм впереди от места соединения ламбдовидного и стреловидного швов. 5 мкл клеток инокулировали с использованием шприца Hamilton 30G в правое полосатое тело на глубине 2,5 мм. Разрез на голове закрывали тканевым клеем Hystoacryl (Braun) и мышам вводили подкожный анальгетик мелоксикам (Metacam®) (1 мг/кг). Конечное количество клеток, имплантированных каждой мыши, составляло 3×10^5 .

[00197] Мышам два раза в неделю интраперитонеально вводили h5D8. Обработку начинали в день 0 сразу после инокуляции опухолевых клеток. Мыши получили в общей сложности 2 дозы h5D8 или контроля в виде среды-носителя.

[00198] Вес тела и объем опухоли. Вес тела измеряли 2 раза в неделю, а рост опухоли количественно определяли по биолюминесценции в день 7 (Xenogen IVIS Spectrum). Для количественной оценки активности биолюминесценции *in vivo* мышей вводили в наркоз изофлуораном и интраперитонеально вводили субстрат, представляющий собой люциферин (PerkinElmer) (167 мкг/кг).

[00199] Размер опухоли, определяемый по биолюминесценции (Xenogen IVIS Spectrum), оценивали в день 7. Рассчитывали отдельные показатели по опухолям и среднее значение \pm SEM для каждой группы обработки. Статистическую значимость определяли с использованием непарного непараметрического U-критерия Манна-Уитни.

Пример 12. h5D8 ингибирует рост опухоли в мышинной модели рака яичника

[00200] Эффективность r5D8 оценивали в двух других сингенных моделях опухоли. В ортотопической модели опухоли яичника ID8 антитело r5D8 при интраперитонеальном введении 300 мкг два раза в неделю значительно подавляло рост опухоли, что измеряли по

объему брюшной полости (**фиг. 8А** и **8В**). Результаты на **фиг. 8С** показывают, что антитело h5D8 также уменьшало объем опухоли в дозе 200 мкг и выше.

Материалы и способы

[00201] Клетки ID8 культивировали в модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM) (Gibco, Invitrogen), дополненной 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) (Gibco, Invitrogen), 40 ед/мл пенициллина и 40 мкг/мл стрептомицина (PenStrep) (Gibco, Invitrogen) и 0,25 мкг/мл плазмоцина (Invivogen).

[00202] Клетки ID8 собирали, промывали в PBS, центрифугировали при 400g в течение 5 мин и ресуспендировали в PBS. Клетки хранили на льду для поддержания оптимальной жизнеспособности, и 200 мкл клеточной суспензии вводили интраперитонеально с помощью иглы 27G. Конечное количество клеток, имплантированных мышам, составляло 5×10^6 .

[00203] Мышам два раза в неделю интраперитонеально вводили h5D8 в разных дозах, как указано. Вес тела измеряли 2 раза в неделю, а прогрессирование опухоли контролировали путем измерения обхвата живота с использованием штангенциркуля (Fisher Scientific).

Пример 13. r5D8 ингибирует рост опухоли в мышинной модели колоректального рака

[00204] У мышей с подкожными опухолями толстой кишки CT26 антитело r5D8 (вводимое 300 мкг интраперитонеально два раза в неделю) значительно подавляло рост опухоли (**фиг. 9А** и **9В**).

Материалы и способы

[00205] Клетки CT26 культивировали в среде Мемориального института Розуэлла Парка (RPMI [Gibco, Invitrogen]), дополненной 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), 40 ед/мл пенициллина и 40 мкг/мл стрептомицина (PenStrep) и 0,25 мкг/мл плазмоцина.

[00206] Клетки CT26 (8×10^5) трипсинизировали, промывали PBS, центрифугировали при 400g в течение 5 минут и ресуспендировали в 100 мкл PBS. Клетки хранили на льду для избежания гибели клеток. Клетки CT26 вводили мышам путем подкожной инъекции с использованием иглы 27G.

[00207] 300 мкг r5D8 или контроль в виде среды-носителя вводили мышам посредством интраперитонеальной инъекции два раза в неделю, начиная с дня 3 после имплантации клеток CT26.

[00208] Вес тела и объем опухолей измеряли три раза в неделю. Объем опухоли измеряли штангенциркулем (Fisher Scientific).

Пример 14. r5D8 уменьшает воспалительную инфильтрацию в моделях опухолей

[00209] В ортотопической модели GBM U251 экспрессия CCL22, маркера M2-поляризованных макрофагов, была значительно снижена в опухолях, обработанных r5D8, что показано на **фиг. 10А**. Данный результат также подтвердили на физиологически релевантной модели органотипической культуры срезов ткани с использованием r5D8, в которой три образца от пациентов продемонстрировали значительное снижение экспрессии CCL22 и CD206 (MRC1) (также маркера макрофагов M2) после обработки, что показано на **фиг.10В** (сравните MRC1 и CCL22 в верхнем ряду, контрольном, и в нижнем, обработанном). Кроме того, r5D8 также уменьшает количество CCL22⁺ макрофагов M2 в сингенных опухолях ID8 (**фиг. 10С**) и СТ26 (**фиг. 10D**) у иммунокомпетентных мышей. Обработка с использованием h5D8 также программировала макрофаги в направлении иммуностимулирующего фенотипа в сингенной модели опухоли СТ26 (**фиг. 10Е**). Обработка с использованием h5D8 повышала количество макрофагов с фенотипом M1, на что указывало повышение фракции CD206 отрицательные/МНСII положительные, и уменьшала количество макрофагов с фенотипом M2, на что указывало уменьшение фракции CD206 положительные/МНСII отрицательные. На **фиг. 10F** показаны данные по экспрессии генов моноцитов, культивированных в кондиционированной среде клеток U251 с нокдауном по LIF. MRC1, CCL2, CCL1 и CTSK (обозначены треугольниками) – все показали значительное снижение экспрессии.

Пример 15. r5D8 увеличивает количество немиелоидных эффекторных клеток

[00210] Чтобы исследовать дополнительные иммунные механизмы, оценивали влияние r5D8 на Т-клетки и другие немиелоидные эффекторные иммунные клетки в микроокружении опухоли. В сингенной модели ортотопической опухоли ID8 яичника обработка с использованием r5D8 приводила к увеличению количества внутриопухолевых НК-клеток и увеличению общего количества и количества активированных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, что показано на **фиг. 11А**. Аналогично в сингенной модели опухоли СТ26 толстой кишки антитело r5D8 увеличивало количество внутриопухолевых НК-клеток, увеличивало количество CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток и имело тенденцию к снижению количества CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Т-регуляторных клеток, что показано на **фиг. 11В**. Тенденцию к уменьшению количества CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Т-регуляторных клеток также наблюдали в сингенной модели ортотопической опухоли KLN205 после обработки с использованием r5D8, что показано на **фиг. 11С**. В соответствии с требованием наличия Т-клеток для опосредования эффективности истощение CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток в модели СТ26 ингибировало противоопухолевую эффективность r5D8, что показано на **фиг. 12**.

Материалы и способы истощения Т-клеток

[00211] Клетки СТ26 культивировали в культуральной среде RPMI (Gibco, Invitrogen), дополненной 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS [Gibco, Invitrogen]), 40 ед/мл пенициллина и 40 мкг/мл стрептомицина (PenStrep [Gibco, Invitrogen]) и 0,25 мкг/мл плазмоцина (Invivogen). Клетки СТ26 (5×10^5) собирали, промывали PBS, центрифугировали при 400g в течение 5 минут и ресуспендировали в 100 мкл PBS. Клетки хранили на льду для избежания гибели клеток. Клетки СТ26 вводили мышам в оба бока путем подкожной инъекции с использованием шприца 27G. Мышам два раза в неделю вводили r5D8 интраперитонеально, как указано в дизайне исследования. Контроль в виде среды-носителя (PBS), крысиное r5D8 и/или антитело к CD4 и антитело к CD8 вводили мышам посредством интраперитонеальной инъекции два раза в неделю, как указано в дизайне исследования. Все виды обработок антителами использовали одновременно.

Пример 16. Кристаллическая структура h5D8 в комплексе с человеческим LIF

[00212] Кристаллическую структуру h5D8 расшифровали с разрешением 3,1 ангстрем, чтобы определить эпитоп на LIF, с которым связывалось h5D8, и определить остатки h5D8, которые участвуют в связывании. Структура сокристалла показала, что N-концевая петля LIF расположена в центре между переменными областями легкой и тяжелой цепей h5D8 (**фиг. 13А**). Кроме того, h5D8 взаимодействует с остатками спирали А и С LIF, образуя прерывистый конформационный эпитоп. Связывание обусловлено несколькими солевыми мостиками, Н-связями и ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями (**таблица 7, фиг. 13В**). Эпитоп h5D8 на LIF охватывает область взаимодействия с gp130. См. Boulanger, M.J., Bankovich, A.J., Kortemme, T., Baker, D. & Garcia, K.C. Convergent mechanisms for recognition of divergent cytokines by the shared signaling receptor gp130. *Molecular cell* 12, 577-589 (2003). Результаты обобщены ниже в **таблице 7** и изображены на **фиг. 13**.

Таблица 7. Краткие сведения о рентгеновской кристаллической структуре h5D8 в комплексе с человеческим LIF		
Остаток LIF (эпитоп)	Тип взаимодействия	Остаток h5D8 (паратоп, нумерация согласно Кабату)
Ala13	VDW	L-Tyr49, L-Asn53
Ile14-O	HB	L-Ser50-OG
Ile	VDW	L-His30, L-Tyr32, L-Tyr49, L-Ser50
		H-Trp97

Arg15-NE	SB	L-Glu55-OE1, L-Glu55-OE2
Arg15-NH1	SB	L-Glu55-OE1, L-Glu55-OE2
Arg15-NH2	SB	L-Glu55-OE1, L-Glu55-OE2
Arg15-O	HB	L-Asn34-ND2
Arg15	VDW	L-Asn34, L-Leu46, L-Tyr49, L-Glu55, L-Ser56
		H-Glu96, H-Trp97, H-Asp98, H-Leu99, H-Asp101
His16-NE2	SB	H-Asp101-OD2
His16	VDW	L-Tyr32, L-Asn34, L-Met89
		H-Trp95, H-Glu96, H-Trp97, H-Asp101
Pro17	VDW	L-Tyr32, L-Ala91
		H-Trp97
Cys18	VDW	L-Tyr32
		H-Trp33, H-Trp97
His19-NE2	SB	H-Glu96-OE1, H-Glu96-OE2
His19	VDW	H-His31, H-Trp33, H-Glu96
Asn20-OD1	HB	H-Lys52-NZ
Asn20-ND2	HB	H-Asp53-OD1
Asn20	VDW	H-Trp33, H-Lys52, H-Asp53
Gln25-NE2	HB	H-Asp53-OD2
Gln25	VDW	H-His31, H-Ser52C, H-Asp53
Gln29	VDW	H-His31
Gln32	VDW	H-Lys52B
Asp120-OD2	HB	H-Ser30-OG
Asp120	VDW	H-Thr28, H-Ser30
Arg123-NE	HB	H-Thr28-OG
Arg123	VDW	H-Thr28
Gly124	VDW	H-His31
Leu125	VDW	H-His31
Ser127-OG	HB	H-Asp98-OD2
Ser127-O	HB	H-Trp97-NE1

Ser127	VDW	H-His31, H-Trp97, H-Asp98
Asn128-OD1	HB	H-His31-NE2
Asn128	VDW	H-His31
Leu130	VDW	H-Trp97
Cys131	VDW	H-Trp97
Cys134	VDW	H-Trp97
Ser135-O	HB	L-His30-NE2
Ser135	VDW	L-His30
His138	VDW	L-His30
VDW , ван-дер-ваальсовы силы, низкоэнергетическая связь; HB , водородная связь (средняя энергетическая связь); SB , солевой мостик (высокоэнергетическая связь)		

Материалы и способы

[00213] LIF временно экспрессировали в клетках НЕК 293S (Gnt I^{-/-}), и его очищали с использованием аффинной хроматографии Ni-NTA с последующей гель-фильтрационной хроматографией в 20 mM трис, pH 8,0 и 150 mM NaCl. Рекombинантный Fab h5D8 временно экспрессировали в клетках НЕК 293F, и его очищали с использованием аффинной хроматографии CapraSelect с последующей катионообменной хроматографией. Очищенные Fab h5D8 и LIF смешивали при молярном соотношении 1:2,5 и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин перед дегликозилированием с использованием EndoH. Затем для очистки комплекса использовали гель-фильтрационную хроматографию. Комплекс концентрировали до 20 мг/мл и подготавливали для испытаний по кристаллизации с использованием скрининговых тестов с разреженными матрицами. Кристаллы образовались при 4°C в условиях, предусматривающих 19% (объем/объем) изопропанола, 19% (вес/объем) PEG 4000, 5% (объем/объем) глицерина, 0,095 M цитрата натрия, pH 5,6. Кристалл дифрагировал с разрешением 3,1 Å на канале излучения 08ID-1 синхротрона Canadian Light Source (CLS). Данные собирали, обрабатывали и масштабировали с помощью XDS согласно Kabsch et al. *Xds. Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 66, 125-132 (2010). Структуры определяли путем молекулярного замещения с использованием Phaser согласно McCoy et al. *Phaser crystallographic software. J Appl Crystallogr* 40, 658-674 (2007). Выполнили несколько итераций построения и уточнения модели с использованием Coot и phenix.refine до тех

пор, пока структуры не приблизились к приемлемым R_{work} и R_{free} . См. Emsley et al. Features and development of Coot. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 66, 486-501 (2010) и Adams et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 66, 213-221 (2010) соответственно. Фигуры строили в PyMOL (система молекулярной графики PyMOL, версия 2.0, Schrödinger, LLC).

Пример 17. h5D8 характеризуется высокой специфичностью к LIF

[00214] Связывание h5D8 с другими представителями семейства LIF тестировали для определения специфичности связывания. При использовании анализа Octet96 связывание h5D8 с человеческим LIF примерно в 100 раз больше, чем связывание с LIF, представителем семейства IL-6 с наивысшей гомологией, онкостатином M (OSM), когда оба белка продуцируются в *E. coli*. Если оба белка продуцируются в системе млекопитающего, h5D8 не проявляет связывание с OSM. Данные обобщены в **таблице 8**.

Таблица 8. Сводные данные по показателям аффинности h5D8 к цитокинам, определенным с использованием анализа Octet			
	KD [M]	kon [1/M c]	kdis [1/c]
h5D8 + huLIF (E. coli)	4,3E-10 +/- 2,0E-11	3,1E+05 +/- 3,1E+03	1,3E-04 +/- 5,8E-06
h5D8 + huLIF (из системы млекопитающего)	1,3E-09 +/- 7,2E-11	1,2E+05 +/- 1,3E+03	1,5E-04 +/- 8,5E-06
h5D8 + huOSM (E. coli)	3,6E-08 +/- 1,4E-09	8,5E+04 +/- 3,1E+03	3,1E-03 +/- 4,1E-05
h5D8 + huOSM (из системы млекопитающего)	С. о.	С. о.	С. о.
h5D8 + huIL-6 (E. coli)	С. о.	С. о.	С. о.

С. о. = связывание отсутствует

Материалы и способы

[00215] Эксперименты по связыванию с использованием Octet: реагенты использовали и готовили в соответствии с инструкциями производителя. Эксперимент по определению базовых кинетических параметров проводили с использованием программного обеспечения Octet Data Acquisition версии 9.0.0.26 следующим образом: Настройка сенсоров/программы: i) уравнивание (60 секунд); ii) загрузка (15 секунд); iii) исходный уровень (60 секунд); iv) связывание (180 секунд) и v) диссоциация (600 секунд)

[00216] Аффинность h5D8 к цитокинам согласно Octet: эксперимент по определению базовых кинетических параметров проводили с использованием программного обеспечения Octet Data Acquisition версии 9.0.0.26 следующим образом: биосенсоры Amine Reactive 2ndGeneration Biosensors (AR2G) гидратировали в воде в течение не менее 15 минут. Конъюгацию по аминокислоте h5D8 с биосенсорами проводили в соответствии с техническим примечанием ForteBio Technical Note 26 (см. ссылки) с использованием набора Amine Coupling Second Generation Kit. Стадии погружения выполняли при 30°C, 1000 об/мин следующим образом: i) 60 секунд уравнивания в воде; ii) 300 секунд активации в 20 мМ ECD, 10 мМ сульфо-NHS в воде; iii) 600 секунд иммобилизации 10 мкг/мл h5D8 в 10 мМ ацетате натрия, pH 6,0; iv) 300 секунд гашения в 1 М этанолаmine, pH 8,5; v) 120 секунд на исходном уровне в воде. Затем проводили эксперименты по определению кинетических параметров со следующими стадиями погружения и считывания при 30°C, 1000 об/мин: vi) 60 секунд на исходном уровне в 1X кинетическом буфере; vii) 180 секунд связывания соответствующих серийных разведений цитокина в 1X кинетическом буфере; viii) 300 секунд диссоциации в 1X кинетическом буфере; ix) три цикла регенерации/нейтрализации с чередованием 10 мМ глицина, pH 2,0 и 1X кинетического буфера соответственно (5 секунд в каждом для 3 циклов). После регенерации биосенсоры повторно использовали для последующих анализов связывания.

[00217] Рекомбинантный человеческий LIF, продуцируемый в клетках млекопитающих, получили от ACROBiosystems (LIF-H521b); рекомбинантный человеческий OSM, продуцируемый в клетках млекопитающих, получили от R & D (8475-OM/CF); и рекомбинантный человеческий OSM, продуцируемый в клетках *E. coli*, получили от R & D (295-OM-050/CF).

Пример 18. Кристаллическая структура Fab h5D8

[00218] Определили пять кристаллических структур Fab h5D8 в широком спектре химических условий. Высокие разрешения данных структур указывают на то, что конформации остатков CDR связаны с незначительной гибкостью и очень похожи в различных химических средах. Уникальной особенностью данного антитела является

присутствие неканонического цистеина в положении 100 вариабельной области тяжелой цепи. Структурный анализ показывает, что цистеин является непарным и в значительной степени недоступен для растворителя.

[00219] Fab H5D8 получали посредством расщепления его IgG папаином с последующей очисткой с использованием стандартных методик аффинной, ионообменной и эксклюзионной хроматографии. Кристаллы получали с использованием методов диффузии из паровой фазы, и они позволили определить пять кристаллических структур с разрешением от 1,65 до 2,0 Å. Все структуры расшифровали и отнесли к одной и той же кристаллографической пространственной группе и с аналогичными размерами элементарной ячейки (P212121, $a \sim 53,8$ Å, $b \sim 66,5$ Å, $c \sim 143,3$ Å) несмотря на условия кристаллизации в диапазоне пяти различных уровней pH: 5,6, 6,0, 6,5, 7,5 и 8,5. Таким образом, эти кристаллические структуры позволяют сравнивать трехмерное расположение Fab h5D8 без препятствий из-за артефактов упаковки кристаллов и в широком спектре химических условий.

[00220] Электронную плотность выявляли для всех остатков определяющей комплементарности области (CDR), которые впоследствии моделировали. Следует отметить, что LCDR1 и HCDR2 приняли удлиненные конформации, которые вместе с неглубокими областями LCDR3 и HCDR3 образовывали полость связывания в центре паратопа (**фиг. 14А**). Эти пять структур были очень похожи по всем остаткам, со среднеквадратичным отклонением всех атомов в диапазоне от 0,197 до 0,327 Å (**фиг. 14А**). Эти результаты указывают на то, что конформации остатков CDR поддерживаются в различных химических средах, включающих уровни pH от 5,6 до 8,5 и ионную силу от 150 мМ до 1 М. Анализ электростатической поверхности паратопа h5D8 показал, что положительно и отрицательно заряженные области в равной степени способствовали гидрофильным свойствам без преобладающих гидрофобных участков. h5D8 имеет необычную особенность в виде неканонического цистеина в основании HCDR3 (Cys100). Во всех пяти структурах этот свободный цистеин упорядочен и не вызывает перестановку дисульфидных связей. Кроме того, он не модифицируется добавлением Cys (цистеинилированием) или глутатиона (глутатиолированием) и взаимодействует за счет ван-дер-ваальсовых сил (расстояния 3,5-4,3 Å) с атомами основной и боковой цепей Leu4, Phe27, Trp33, Met34, Glu102 и Leu105 тяжелой цепи (**фиг. 14В**). И наконец, Cys100 представляет собой преимущественно скрытый структурный остаток, который, по-видимому, участвует в обеспечении конформации CDR1 и HCDR3. Таким образом, маловероятно, что он будет характеризоваться реактивностью по отношению к другим

цистеинам, как это наблюдается по гомогенному расположению этой области в наших пяти кристаллических структурах.

Материалы и способы

[00221] H5D8-1 IgG получили от Catalent Biologics и составили в 25 мМ гистидина, 6% сахарозы, 0,01% полисорбата 80 при pH 6,0. Производили активную замену буфера составленного IgG на буфер PBS с использованием концентратора MWCO 10K (Millipore) перед расщеплением с использованием 1:100 мкг папаина (Sigma) в течение 1 часа при 37°C в PBS, 1,25 мМ EDTA, 10 мМ цистеина. Расщепленный папином IgG пропускали через колонку с белком A (GE Healthcare) с использованием хроматографической системы АКТА Start (GE Healthcare). Элюат из колонки с белком A, который содержал Fab h5D8, извлекали и осуществляли замену буфера на 20 мМ ацетат натрия, pH 5,6, используя концентратор MWCO 10K (Millipore). Полученный образец загружали в катионообменную колонку Mono S (GE Healthcare) с использованием хроматографической системы АКТА Pure (GE Healthcare). Элюирование градиентом 1 М хлорида калия привело к преобладающему пику Fab h5D8, который извлекли, концентрировали и очищали до однородности по размеру с использованием колонки для гель-фильтрации Superdex 200 Increase (GE Healthcare) в 20 мМ трис-HCl, 150 мМ хлориде натрия при pH 8,0. Высокую чистоту Fab h5D8 подтвердили с помощью SDS-PAGE в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях.

[00222] Очищенный Fab h5D8 концентрировали до 25 мг/мл, используя концентратор 10K MWCO (Millipore). Дозатор Орух 4 (Douglas Instruments) использовали для модели экспериментов по кристаллизации с диффузией в паровой фазе с коммерческими скрининговыми тестами с разреженными матрицами с 96 условиями JCSG TOP96 (реагенты Rigaku) и MCSG-1 (Anatrace) при температуре 20°C. Кристаллы получали и собирали через четыре дня в следующих пяти условиях кристаллизации: 1) 0,085 М цитрата натрия, 25,5% (вес/объем) PEG 4000, 0,17 М ацетата аммония, 15% (объем/объем) глицерина, pH 5,6; 2) 0,1 М MES, 20% (вес/объем) PEG 6000, 1 М хлорида лития, pH 6,0; 3) 0,1 М MES, 20% (вес/объем) PEG 4000, 0,6 М хлорида натрия, pH 6,5; 4) 0,085 М HEPES натрия, 17% (вес/объем) PEG 4000, 8,5% (объем/объем) 2-пропанола, 15% (объем/объем) глицерина, pH 7,5; и 5) 0,08 М трис, 24% (вес/объем) PEG 4000, 0,16 М хлорида магния, 20% (объем/объем) глицерина, pH 8,5. Перед мгновенным замораживанием в жидком азоте к маточным растворам, содержащим кристаллы, добавляли 5-15% (объем/объем) глицерина или 10% (объем/объем) этиленгликоля при необходимости. Кристаллы подвергались рентгеновскому синхротронному излучению на канале 23-ID-D синхротрона

Advanced Photon Source (Чикаго, Иллинойс, США) и дифрактограммы регистрировали на детекторе Pilatus3 6M. Данные обрабатывали с использованием XDS, а структуры определяли путем молекулярного замещения с использованием Phaser. Уточнение проводили в PHENIX с итеративным построением модели в Coot. Фигуры строили в PyMOL. Все программное обеспечение было доступно в SGrid.

Пример 19. Мутации цистеина 100 в h5D8 сохраняют связывание

[00223] Анализ h5D8 выявил свободный остаток цистеина в положении 100 (C100) в варибельной области тяжелой цепи. Варианты H5D8 получали путем замены C100 каждой природной аминокислотой для определения характеристик связывания с и аффинности к человеческим и мышинным LIF. Связывание характеризовали посредством ELISA и анализа Octet. Результаты обобщены в **таблице 9**. Кривые EC50 для ELISA показаны на **фиг. 15** (**фиг. 15A**, человеческий LIF, и **фиг. 15B**, мышинный LIF).

Таблица 9. Сводные данные по показателям аффинности, определенным посредством анализа Octet, и показателям EC50, определенным посредством ELISA				
Мутация	Аффинность/k_D (M)		EC50 связывания (нМ)	
	Человеческий LIF	Мышиный LIF	Человеческий LIF	Мышиный LIF
C100	<1,0E-12 ± 2,252E-11	9,946E-11 ± 8,272E-12	0,09878	0,1605
C100S	8,311E-10 ± 5,886E-11	2,793E-09 ± 5,925E-11	н.д.	н.д.
C100Q	3,87E-09 ± 1,55E-10	2,84E-09 ± 4,85E-11	10,18	26,33
C100N	5,59E-09 ± 1,01E-10	6,68E-09 ± 9,8E-11	13,18	45,87
C100E	2,67E-09 ± 4,64E-11	4,1E-09 ± 7,56E-11	7,179	25,3
C100D	2,02E-09 ± 8,08E-11	6,49E-09 ± 7,16E-11	11,89	22,88
C100T	4,36E-10 ± 2,1E-11	1,02E-09 ± 1,77E-11	5,575	8,753
C100G	2,49E-09 ± 4,2E-11	3,33E-09 ± 5,42E-11	21,94	40,17
C100P	2,74E-10 ± 2,97E-10	<1,0E-12 ± 7,64E-10	34,44	101,9
C100A	<1,0E-12 ± 2,713E-11	<1,0E-12 ± 1,512E-11	0,6705	0,9532
C100V	<1,0E-12 ± 1,805E-11	<1,0E-12 ± 8,086E-12	0,2785	0,3647
C100L	<1,0E-12 ± 1,963E-11	1,998E-10 ± 1,055E-11	0,454	0,547
C100I	<1,0E-12 ± 1,424E-11	3,361E-11 ± 7,545E-	0,299	0,3916

		12		
C100M	1,155E-09 ± 3,400E-11	2,676E-09 ± 2,449E-11	0,7852	1,563
C100F	4,376E-09 ± 1,127E-10	1,147E-08 ± 9,099E-11	8,932	21,53
C100Y	1,444E-08 ± 1,159E-09	2,514E-08 ± 2,047E-09	н.д.	н.д.
C100W	2,508E-08 ± 7,036E-09	4,819E-08 ± 4,388E-09	н.д.	н.д.
C100H	1,304E-10 ± 1,416E-10	4,284E-09 ± 1,231E-10	8,254	н.д.
C100K	7,477E-08 ± 1,581E-09	6,053E-08 ± 2,589E-09	н.д.	н.д.
C100R	1,455E-07 ± 6,964E-09	5,142E-08 ± 3,247E-09	н.д.	н.д.

Материалы и способы

ELISA: связывание вариантов C100 h5D8 с человеческим и мышинным LIF определяли посредством ELISA. Рекомбинантный человеческий или мышинный белок LIF вносили в 384-луночные планшеты Maxisorp в концентрации 1 мкг/мл и оставляли на ночь при 4°C. Планшеты блокировали с использованием 1х блокирующего буфера в течение 2 часов при комнатной температуре. Добавляли титры каждого варианта h5D8 C100 и давали возможность связаться в течение 1 часа при комнатной температуре. Планшеты трижды промывали с использованием PBS+0,05% Tween-20. Добавляли конъюгированные с HRP антитела к IgG человека и давали возможность связываться в течение 30 минут при комнатной температуре. Планшеты трижды промывали с использованием PBS+0,05% Tween-20 и проявляли с использованием 1х субстрата ТМВ. Реакцию останавливали с помощью 1 М HCl и измеряли оптическую плотность при 450 нм. Построение фигур и нелинейный регрессионный анализ выполняли с помощью Graphpad Prism.

[00224] Octet RED96: аффинность вариантов C100 h5D8 к человеческому и мышинному LIF определяли по BLI с использованием системы Octet RED96. Варианты C100 h5D8 загружали на биосенсоры к Fc человека в концентрации 7,5 мкг/мл после 30-секундного выдерживания на исходном уровне в 1х кинетическом буфере. Титры человеческого или мышинного белка LIF связывали с загруженными биосенсорами в течение 90 секунд и

давали им возможность диссоциировать в 1х кинетическом буфере в течение 300 секунд. KD рассчитывали с помощью программного обеспечения для анализа данных с использованием глобальной модели аппроксимации 1:1.

Пример 20. h5D8 блокирует связывание LIF с gp130 in vitro

[00225] Чтобы определить, предотвращает ли h5D8 связывание LIF с LIFR, провели анализ молекулярного связывания с использованием платформы Octet RED 96. H5D8 загружали на биосенсоры АНС путем захвата антителом к Fc человека. Затем биосенсоры погружали в LIF и, как и предполагали, наблюдали связывание (**фиг. 16А**, средняя треть). Впоследствии биосенсоры погружали в различные концентрации LIFR. Наблюдали дозозависимое связывание (**фиг. 16А**, правая треть). Контрольный эксперимент продемонстрировал, что данное связывание было LIF-специфичным (не показано) и не было следствием неспецифического взаимодействия LIFR с h5D8 или с биосенсорами.

[00226] Чтобы дополнительно охарактеризовать связывание h5D8 и LIF, провели серию экспериментов по связыванию с помощью ELISA. H5D8 и LIF предварительно инкубировали и затем вносили в планшеты, покрытые либо рекомбинантным человеческим (hLIFR), либо gp130. Отсутствие связывания между комплексом h5D8/LIF и покрывающим субстратом может указывать на то, что h5D8 каким-то образом нарушает связывание LIF с рецептором. Кроме того, также использовали контрольные антитела, которые либо не связывают LIF (изотипический контроль, обозначен (-)), либо связывают LIF в известных сайтах связывания (B09 не конкурирует ни с gp130, ни с LIFR за связывание LIF; r5D8 является крысиной исходной версией h5D8). Результаты ELISA продемонстрировали, что комплекс h5D8/LIF был способен связывать hLIFR (как и комплекс r5D8/LIF), указывая на то, что эти антитела не препятствовали связыванию LIF/LIFR (**фиг. 16А**). И наоборот, комплекс h5D8/LIF (и комплекс r5D8/LIF) не был способен связывать рекомбинантный gp130 человека (**фиг. 16В**). Это указывает на то, что сайт связывания gp130 на LIF затрагивается, если LIF связан с h5D8.

Пример 21. Экспрессия LIF и LIFR в тканях человека

[00227] Проводили количественную ПЦР в режиме реального времени со множеством разных типов тканей человека, чтобы определить уровни экспрессии LIF и LIFR. Средние уровни экспрессии, показанные на **фиг. 17А** и **17В**, представлены в копиях на 100 нг общего количества РНК. Большинство тканей экспрессировали не менее 100 копий на 100 нг общего количества РНК. Экспрессия мРНК LIF наиболее самой высокой в жировой ткани человека (брыжейке подвздошной кишки [1]), ткани кровеносных сосудов (хороидном сплетении [6] и брыжеечных сосудах [8]) и ткани пуповины [68]; и наиболее

низкой в тканях головного мозга (коре [20] и черной субстанции [28]). Экспрессия мРНК LIFR была наиболее высокой в жировой ткани человека (брыжейке подвздошной кишки [1]), ткани кровеносных сосудов (легочных сосудах [9]), ткани мозга [11-28] и ткани щитовидной железы [66]; и наиболее низкой в РВМС [31]. Уровни экспрессии мРНК LIF и LIFR в тканях макака-крабоведа были подобны уровням, наблюдаемым в тканях человека, где экспрессия LIF была высокой в жировой ткани, и экспрессия LIFR была высокой в жировой ткани и низкой в РВМС (данные не показаны).

[00228] Нумерация тканей на **фиг. 17А** и **фиг. 17В** следующая: 1 – жировая ткань (брыжейка подвздошной кишки); 2 - надпочечник; 3 - мочевого пузыря; 4 - мочевого пузыря (треугольник мочевого пузыря); 5 - кровеносный сосуд (мозговой: средняя мозговая артерия); 6 – кровеносный сосуд (хориоидное сплетение); 7 – кровеносный сосуд (коронарная артерия); 8 – кровеносный сосуд (брыжеечный (толстая кишка)); 9 – кровеносный сосуд (легочный); 10 – кровеносный сосуд (почечный); 11 – головной мозг (миндалины); 12 - головной мозг (хвостатое ядро); 13 - головной мозг (мозжечок); 14 головной мозг - (кора: передняя поясная извилина); 15 - головной мозг (кора: задняя поясная извилина); 16 - головной мозг (кора: латеральная лобная область); 17 - головной мозг (кора: медиальная лобная область); 18 - головной мозг (кора: затылочная область); 19 - головной мозг (кора: теменная область); 20 – головной мозг (кора: височная область); 21 - мозг (дорсальное ядро шва); 22 - головной мозг (гиппокамп); 23 - головной мозг (гипоталамус: передний); 24 - головной мозг (гипоталамус: задний); 25 - головной мозг (голубое пятно); 26 - головной мозг (продолговатый мозг); 27 – головной мозг (прилежащее ядро); 28 - головной мозг (черная субстанция); 29 - молочная железа; 30 - слепая кишка; 31 - мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС); 32 - ободочная кишка; 33 – ганглии задних корешков (DRG); 34 - двенадцатиперстная кишка; 35 – маточная труба; 36 - желчный пузырь; 37 – сердце (левое предсердие); 38 - сердце (левый желудочек); 39 - подвздошная кишка; 40 - тощая кишка; 41 – почка (кора); 42 - почка (мозговое вещество); 43 - почка (лоханка); 44 - печень (паренхима); 45 - печень (бронх: первичный); 46 - печень (бронх: третичный); 47 - легкое (паренхима); 48 – лимфатический узел (миндалины); 49 - мышца (скелетная); 50 - пищевод; 51 - яичник; 52 - поджелудочная железа; 53 - шишковидная железа; 54 – гипофиз; 55 - плацента; 56 - предстательная железа; 57 - прямая кишка; 58 - кожа (крайняя плоть); 59 – спинной мозг; 60 - селезенка (паренхима); 61 - желудок (антральный отдел); 62 - желудок (тело); 63 - желудок (дно); 64 - желудок (пилорический канал); 65 - яичко; 66 – щитовидная железа; 67

- трахея; 68 – пуповина; 69 - мочеточник; 70 – матка (шейка); 71 - матка (миометрий); 72 – семявыводящий проток.

Пример 22. h5D8 и антитело к PD-1 ингибируют рост опухоли в мышинной модели колоректального рака

[00229] Эффективность h5D8 оценивали в комбинации с ингибитором PD-1 в сингенных моделях CT26 и MC38. У мышей, которых обрабатывали комбинацией ингибитора PD-1 и h5D8, наблюдали уменьшение роста опухоли CT26 по сравнению с мышами, которых обрабатывали по отдельности ингибитором PD-1 или h5D8, что показано на **фиг. 18А** и **18В**. Хотя устойчивого преимущества в выживаемости при монотерапии с использованием h5D8 не наблюдали (**фиг. 18С**) и крайне редко наблюдали при терапии с использованием антитела к PD1 (**фиг. 18С**), применение комбинации h5D8 и антитела к PD1 давало долгосрочное преимущество в выживаемости у примерно 40% и 30% обработанных мышей с опухолью CT26 и MC38 соответственно (**фиг. 18С**). Важно отметить, что мыши с долгосрочной выживаемостью без опухоли CT26 были устойчивы к повторной имплантации опухоли, что согласуется с приобретением длительного адаптивного иммунитета (**фиг. 18D**).

[00230] Чтобы исследовать дополнительные иммунные механизмы, посредством которых комбинация h5D8 и ингибитора PD-1 оказывала влияние на рост опухоли, оценивали влияние комбинации на функциональность инфильтрирующих CD8 Т-клеток, что показано на **фиг. 19А** и **19В**. При монотерапии с использованием h5D8 в опухолях CT26 и MC38 либо не наблюдали вообще никакого эффекта, либо наблюдали номинальное увеличение CD8 TIL соответственно. Хотя монотерапия с использованием антитела к PD1 слабо влияла на CD8 TIL, комбинация с h5D8 приводила к значительному увеличению CD8 TIL как в опухолях CT26, так и в опухолях MC38, что позволяет предположить, что повышенная эффективность, наблюдаемая с комбинацией, потенциально обусловлена увеличением количества CD8 TIL (**фиг. 19С** и **19D**).

[00231] По сравнению с контрольной группой и группой монотерапии, опухоли, полученные от мышей, которых обрабатывали с использованием комбинации h5D8 и антитела к PD1, показали не только увеличение количества CD8 TIL, но также увеличение количества цитолитических, пролиферативных и антиген-экспрессирующих субпопуляций, идентифицированных по GZMB, Ki67 и CD44 соответственно. Опухоли, обработанные с использованием комбинации, также показали повышенные соотношения CD8/Treg, M1/M2 и CD8/CD11b, демонстрируя сильную модуляцию микроокружения опухоли, способствующую противоопухолевому иммунитету. Эти данные подтверждают,

что LIF вызывает подавление микроокружения опухоли, по крайней мере частично, за счет подавляющей поляризации макрофагов, которые впоследствии ослабляют противоопухолевый иммунитет хозяина. Ингибирование LIF с помощью h5D8 обращает данный эффект, и в сочетании со средствами терапии, стимулирующими Т-клетки, как, например, терапия с использованием антител к PD1, стимулирует сильный противоопухолевый иммунитет, чтобы обеспечить устойчивое преимущество в выживаемости в мышинных моделях рака.

[00232] Чтобы проверить, были ли CD8 TIL функционально отличающимися на клеточном уровне в опухолях, полученных от мышей, которых обрабатывали либо антителом к PD1 в режиме монотерапии, либо комбинацией h5D8 и антитела к PD1, исследовали способность CD8 TIL продуцировать IFN γ в ответ на опухолеспецифические антигены. CD8 TIL, выделенный из опухолей CT26, обработанных с использованием антитела к PD1 или комбинации h5D8 и антитела к PD1, не показал различий в функции при стимуляции *ex vivo* пептидом AN1 (gp70; 423-431 а.к.), который включает иммунодоминантный антиген отторжения CT26 (**фиг. 19С**). Аналогично CD8 TIL, выделенный из опухолей MC38, обработанных с использованием антитела к PD1 или комбинации h5D8 и антитела к PD1, также не показал различий в функции при стимуляции *ex vivo* иммунодоминантными пептидами опухолевого антигена (p15e; 604-611 а.к.), что позволяет предположить, что повышение эффективности комбинации обусловлено общим увеличением частоты появления CD8 TIL, а не увеличением функциональности TIL CD8 в каждой отдельной клетке.

Материалы и способы

[00233] h5D8 и ингибитор PD-1, клон антитела RMP1-14 (BioXCell), вводили два раза в неделю в дозах 15 мг/кг и 10 мг/кг соответственно, а объем опухоли контролировали посредством измерений с помощью штангенциркуля.

Пример 23. Корреляция между LIF, TAM и Treg

[00234] Влияние LIF на противораковую иммунную систему определяли путем измерения относительной численности опухолеассоциированных макрофагов (TAM) и регуляторных Т-клеток (Treg) в 28 типах солидных опухолей из Атласа ракового генома (TCGA). Значимую корреляцию между LIF, TAM и Treg наблюдали в нескольких типах опухолей (**фиг. 20А и 20В**). Глиобластома (GBM), аденокарцинома предстательной железы, рак щитовидной железы и рак яичника представляли собой 4 типа опухолей, демонстрирующих наиболее высокую корреляцию между LIF, TAM и Treg, демонстрируя при этом высокую экспрессию LIF во всех образцах (**фиг. 20А и 20В**). Широкий диапазон

экспрессии LIF наблюдали в опухолях GBM, где он экспрессировался в опухолевых клетках и в инфильтратах иммунных клеток (**фиг. 24**).

[00235] Значительно положительную корреляцию между LIF и CCL2, CD163 и CD206 наблюдали как при анализе наборов данных TCGA для GBM человека, так и для рака яичника (OV) (**фиг. 28**). Корреляции между LIF и CXCL9 не наблюдали (данные не показаны), но относительно низкие уровни мРНК CXCL9 выявили в опухолях. Данные результаты подтвердили на уровне белка путем анализа когорты из 20 пациентов с GBM и проведения иммуногистохимического анализа опухолей на LIF, CXCL9, CCL2, CD163 и CD206. Наблюдали сильную положительную корреляцию между LIF и CCL2, CD163 и CD206 (**фиг. 21E**). CXCL9 экспрессировался в изолированных кластерах клеток, что объясняет низкие уровни мРНК CXCL9, присутствующие в опухолях. Следует отметить, что CXCL9 показал обратную корреляцию с LIF в GBM человека (**фиг. 21E**).

[00236] Примеры, описанные в данном документе, дополнительно иллюстрируют, что LIF играет ключевую роль в исключении CD8⁺ Т-клеток, обеспечивая одновременно присутствие проопухолевых TAM. Выявили, что блокирование LIF в опухолях, экспрессирующих высокие уровни LIF, снижает CD206, CD163 и CCL2 и индуцирует экспрессию CXCL9 в TAM. Блокирование LIF вызывает эпигенетический сайленсинг CXCL9, запускающий инфильтрацию опухоли CD8⁺ Т-лимфоцитами. Комбинация антител, нейтрализующих LIF, с ингибированием контрольной точки иммунного ответа PD1 способствовала регрессии опухоли и увеличению общей выживаемости.

Материалы и способы

[00237] Данные по секвенированию РНК для 9403 пациентов, страдающих от 28 различных солидных опухолей, загрузили из Атласа ракового генома (TCGA) с сервера Firebrowse (firebrowse.org, версия 2016_01_28). Данные по экспрессии (RSEM) подвергли log₂ преобразованию для всех последующих анализов. Затем получали генные сигнатуры четырех иммунных популяций, представляющих интерес: TAM, Treg, CD4⁺ Т-клеток и CD8⁺ Т-клеток. Затем вычисляли корреляцию между экспрессией LIF и генными сигнатурами четырех иммунных популяций и корреляцию между LIF и набором генов, представляющих интерес.

Пример 24. Подавление функции LIF в моделях GL261N, RCAS и ID8

[00238] Потенциальную иммуномодулирующую роль LIF при раке изучали в иммунокомпетентных мышинных моделях GBM и рака яичника (типы опухолей, в которых LIF сильно коррелирует с TAM и Treg). Клеточную линию GBM, GL261N (полученную из клеточной линии GL261), трансгенную модель *GFAP-tv-a* RCAS-PDGFA, shp53, shNF1

(RCAS) и клеточную линию рака яичника ID8, которые вызывали опухоли в головном мозге (GL261N и RCAS) и брюшине (ID8) у мышей, идентифицировали как экспрессирующие высокие уровни LIF (фиг. 25).

[00239] Функцию LIF в моделях GL261N, RCAS и ID8 подавляли с использованием нейтрализующих антител. В данных моделях наблюдали уменьшение роста опухоли и повышение выживаемости (фиг. 20C, 20G, 20H, 20K, 20P). Блокирование LIF в модели опухоли GL261, опухоли, не экспрессирующей LIF, не подавляло рост опухоли (фиг. 25E). Нейтрализующие антитела к LIF вызывали заметное снижение уровней p-STAT3, показывая, что в данных моделях животных (выбранных на основе высокой экспрессии LIF) LIF являлся основным цитокином, индуцирующим путь JAK-STAT3 (фиг. 20D и 20L). Более того, хотя значительного уменьшения числа Ki67-положительных клеток не наблюдали, выявили увеличение расщепленной каспазы 3 (CC3), что указывает на то, что блокирование LIF индуцировало гибель опухолевых клеток (фиг. 20D и 20L).

Материалы и способы

[00240] Все эксперименты на животных были одобрены и проводили в соответствии с правилами Институционального комитета по уходу за животными Исследовательского института Валь де Брона, Барселона, Испания, в соответствии с директивами Европейского союза и национальными директивами. Самки C57BL/6 и NOD SCID приобрели у Janvier. Для моделей опухолей головного мозга 3×10^5 клеток GL261N, GL261 или RCAS, все с экспрессией люциферазы, стереотаксически инокулировали в полосатое тело правого полушария мозга (на 1 мм спереди и 1,8 мм латеральнее ламбдовидного и стреловидного швов; 2,5 мм вглубь паренхимы) мышам C57BL/6 в 8-недельного возраста. В случае модели опухоли яичника 5×10^6 клеток рака яичника ID8 вводили интраперитонеально мышам C57BL/6 в 8-недельного возраста. Дозу 300 мкг (ID8) или 600 мкг (GL261N, GL261 и RCAS) антитела к LIF или контрольного IgG вводили интраперитонеально два раза в неделю. Дополнительно дозу 200 мкг крысиного антитела к PD1 мыши (anti-PD1, BioXCell), антитела к CCL2 мыши/человека/крысы (MCP-1, BioXcell) или 3 мкг антитела к CXCL9 мыши (R&D) вводили интраперитонеально два раза в неделю. Прогрессирование опухоли контролировали по весу тела и обхвату живота (ID8) или по измерениям биолюминесценции с использованием Xenogen IVIS® Spectrum (GL261N, GL261 и RCAS). Мышей умерщвляли, если у них проявлялись клинические признаки заболевания или дистресса (например, кахексия, анорексия или учащенное дыхание) или когда опухоли препятствовали нормальному функционированию организма.

Пример 25. Обработка опухолей GL261N с использованием антитела к LIF

[00241] Роль иммунной системы в ответе на обработку с использованием антитела к LIF оценивали с использованием иммунодефицитных животных. Обработка опухолей GL261N с использованием антитела к LIF у мышей RAG^{-/-} или NOD SCID (у обеих линий мышей отсутствует адаптивный иммунный ответ) не показала значительного воздействия на рост опухоли (**фиг. 25F**). Результаты показали, что противоопухолевый ответ на блокирование LIF в основном опосредован адаптивным иммунным ответом.

Материалы и способы

[00242] Использовали способы из примера 24 за исключением того, что использованные мыши представляли собой мышей линий RAG^{-/-}, CCL2^{-/-} и CXCL9^{-/-} от Jackson Laboratories и NOD SCID gamma (NSG) от Charles River.

Пример 26. Обработка с использованием антитела к LIF снижает количество проопухолевых TAM и повышает инфильтрацию опухоли CD8⁺ Т-клетками.

[00243] Молекулярные механизмы, участвующие в иммунном ответе на обработку с использованием антитела к LIF, дополнительно исследовали путем наблюдения за уменьшением количества проопухолевых TAM (CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C⁻ CD206⁺ CD163⁺ MHCII^{low}) (**фиг. 20E, 20I, 20M**) и, что важно, за сопутствующим повышением инфильтрации опухоли CD8⁺ Т-клетками после обработки с использованием антитела к LIF (**фиг. 20D, 20F, 20J, 20L, 20N**). Количество Treg и NK-клеток уменьшалось и повышалось соответственно после обработки с использованием антитела к LIF (**фиг. 25G - 25J**). Инфильтрирующие CD8⁺ Т-клетки экспрессировали GZMA, что позволяет предположить, что они опосредуют цитотоксический эффект (**фиг. 26A**). Более того, компартмент CD8⁺ Т-клеток экспрессировал PD1 (**фиг. 26B, 26C**). Количество TAM, полученных из рекрутированных моноцитов (CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C⁻ CD49d⁺)¹², уменьшилось в ответ на антитело к LIF (**фиг. 26D**), и при этом не наблюдали значительного воздействия на популяцию дендритных клеток (CD11b⁺, CD11c⁺, MHCII⁺) (**фиг. 26E**) ни на уровнях IL-10, ни на уровнях IL-12 в ткани (**фиг. 26F**).

Материалы и способы

[00244] Мышей умерщвляли и извлекали опухоли. Опухоли GL261N и RCAS ферментативно расщепляли с использованием набора Brain Tumor Dissociation kit, а миелин удаляли с использованием гранул Myelin Removal Beads II (все от Miltenyi Biotec). Опухоли ID8 обрабатывали с использованием набора Mouse Tumor Dissociation kit (Miltenyi Biotec) и собирали асцитические жидкости. Образцы GBM человека из органотипической модели и полученные от пациента ксенотрансплантаты ферментативно расщепляли с использованием набора Human Tumor Dissociation kit (Miltenyi Biotec).

[00245] Из клеточной суспензии GL261N выделение клеток CD11b⁺ выполняли с использованием микрогранул с антителом к Ly6C-APC и к APC и микрогранул с антителом к Ly6G для истощения популяций Ly6G⁺ и Ly6C⁺, а затем с использованием магнитных гранул для CD11b. Выделение клеток CD45⁺ выполняли с использованием магнитных гранул с антителом к CD45 мыши. Из суспензии клеток ID8 клетки CD11b⁺ выделяли с использованием магнитных гранул с антителом к CD11b. И наконец, из органотипических срезов выделение клеток CD45⁺ выполняли с использованием магнитных гранул с антителом к CD45 человека. Все процедуры выделения выполняли с использованием сепаратора MultiMACS Cell24 Separator Plus в соответствии с инструкциями производителя, а магнитные гранулы были приобретены у Miltenyi Biotec.

[00246] Мышиные антитела к CD3, CD4, CD335, CD163, МНС класса II, CXCR3- (eBioscience), CD45, CD8, F4/80, CD11b, CD11c, CD206, CD49d (BD Bioscience), LIFR (Novus Biologicals) Ly6G, Ly6C, CCR2 и PD1 (Biolegend) использовали для проточной цитометрии. Внутриклеточное окрашивание FoxP3, Granzyme A (GZMA), CXCL9 (eBioscience) и CCL2 (Biolegend) проводили с использованием специального набора для окрашивания (eBioscience). Для исследований методом проточной цитометрии на людях использовали антитела к CD11b, CD14 (BD Bioscience), CD45, CD3, CXCR3 (Biolegend) и CD8 (BD Pharmingen). В некоторых случаях образцы предварительно инкубировали с набором для определения жизнеспособности клеток LIVE/DEAD™ Fixable Yellow Dead Cell Stain Kit (Thermo Fisher Scientific). В качестве положительного контроля органотипических ксенотрансплантатов GBM человека и ксенотрансплантатов, полученных от пациентов 10⁶ PBMC (именуемых "добавленные PBMC") добавляли к контрольным образцам для определения популяций лейкоцитов.

[00247] Образцы получали с помощью анализатора BD LSRFortessa™ cell analyzer или Navios (Beckman Coulter), и данные анализировали с помощью программного обеспечения Flow Jo.

Пример 27. Инфильтрация CD8⁺ Т-лимфоцитами не является результатом противоопухолевого ответа на блокирование LIF

[00248] Являлась ли LIF-опосредованная регуляция опухолевых иммунных инфильтратов причиной или следствием противоопухолевого ответа, оценивали путем проведения эксперимента по кратковременной обработке, в котором мышью обрабатывали с использованием антитела к LIF в течение 4 дней после приживления опухоли. 4-дневная обработка не влияла на рост опухоли (**фиг. 26G**), но была достаточной для того, чтобы вызвать инфильтрацию опухоли CD8⁺ Т-клетками (**фиг. 26H**). Это показывает, что

инфильтрация CD8⁺ Т-лимфоцитами не являлась результатом противоопухолевого ответа на блокаду LIF.

Пример 28. Подтверждение генного ответа

[00249] Гены, относящиеся к онкогенному фенотипу, экспрессия которых была подавлена, определяли путем выделения клеток CD11b⁺ из мышинной модели ID8, обработки клеток с использованием антител к LIF и выполнения транскриптомного анализа. Идентифицированные гены представляли собой CCL2, CCL3, CCL7, PF4, CTSK, CD206 и CD163. При этом, что интересно, экспрессия CXCL9 была повышена (**фиг. 21А**). Вышеупомянутые генные ответы подтверждали с использованием qRT-PCR на моделях ID8 и GL261N (**фиг. 21В**).

[00250] CXCL9 и CCL2 являлись хемокинами, критически важными для инфильтрации опухоли CD8⁺ Т-клетками и привлечения TAM и Treg соответственно. Подтвердили регуляцию CXCL9 и CCL2 по нейтрализации LIF в TAM (CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C⁻) (**фиг. 21С**). Иммуноокрашивание и выделение TAM показало, что CXCL9, CCL2, CD206 и CD163 в основном экспрессировались в TAM (**фиг. 21D**), и обработка с использованием антитела к LIF регулировала их экспрессию (**фиг. 21С, 21D**). CXCR3 (рецептор CXCL9), CCR2 (рецептор CCL2) и LIFR экспрессировались в TAM и CD8⁺ Т-клетках (**фиг. 27А**). Анализ qRT-PCR количественно определил присутствие мРНК CD11b и CXCL9 в CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C⁻ и CD11b⁻ Ly6G⁻ Ly6C⁻ клетках, отсортированных из опухолей GL261N (**фиг. 27В**).

Материалы и способы

[00251] Клетки лизировали для экстрагирования мРНК (RNeasy Mini или Micro Kit, Qiagen), выполняли ретротранскрипцию (iScript Reverse Supermix от BioRad для мРНК) и выполняли qRT-PCR с использованием зондов Taqman от Applied Biosystems в соответствии с рекомендациями производителя. В случае залитых парафином срезов РНК получали с использованием набора для выделения РНК High Pure FFPE RNA isolation kit (Roche) и следуя инструкциям производителя. Реакции проводили в системе CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), а результаты выражали в виде кратности изменения, вычисленного по методу Ct, по сравнению с контрольным образцом. *ACTB* мыши или человека или *GAPDH* использовали в качестве внутренних контролей для нормализации.

[00252] РНК анализировали на платформе Affymetrix microarray platform с использованием Mouse Gene 2.1 ST. Затем ее нормализовали на основе Robust-Microarray Average (RMA). Гены, дифференциально экспрессируемые у мышей, которых обрабатывали с

использованием антитела к LIF, идентифицировали с помощью байесовской линейной регрессии с учетом парных образцов с использованием пакета limma Bioconductor.

Пример 29. Ответ на ингибирование LIF у мышей с нокаутом по CXCL9 и мышей с нокаутом по CCL2

[00253] Мышиные модели с нокаутом по CXCL9 и CCL2 (CXCL9^{-/-}, CCL2^{-/-}) использовали для тестирования значимости регуляции CXCL9 и CCL2 в онкогенной функции LIF. Опухоли в этих мышиных моделях обрабатывали с использованием блокирующих антител к CXCL9 и CCL2. Интересно то, что противоопухолевый ответ на ингибирование LIF был ослаблен у CXCL9^{-/-} мышей, но не у мышей CCL2^{-/-} (**фиг. 21F**). Аналогично нейтрализующее антитело к CXCL9 нарушало противораковый ответ на ингибирование LIF, но не антитело к CCL2 (**фиг. 21F**). Эти результаты показывают, что основным медиатором ответа на ингибирование LIF был CXCL9. Как и ожидалось, блокирование CXCL9 уменьшало инфильтрацию опухоли CD8⁺ Т-клетками в ответ на ингибирование LIF (**фиг. 21G**).

Материалы и способы

[00254] Микропрепараты депарафинизировали и гидратировали. Извлечение антигена выполняли с использованием раствора Citrate Antigen Retrieval Solution (DAKO) с pH 6 или 9 в течение 10 мин, 10% пероксидазы (H₂O₂) и блокирующего раствора (2% BSA) в течение 1 ч при комнатной температуре. В качестве системы обнаружения использовали EnVision FLEX + (DAKO) в соответствии с инструкциями производителя с последующим контрастным окрашиванием гематоксилином, дегидратацией и заливкой средой (DPX). Количественную оценку окрашивания по LIF, CCL2, CD163, CD206 и CXCL9 в опухолях GBM от пациентов выражали как H-балл (3 × процент сильного окрашивания + 2 × процент умеренного окрашивания + процент слабого окрашивания) в диапазоне от 0 до 300. Количественную оценку p-STAT3, Ki67, CC3 и CD8 проводили с помощью ImageJ, подсчитывая общее количество клеток в трех разных полях на мыш, пять мышей на группу, и вычисляя процент положительных клеток. Данные на графиках представлены в виде среднего значения ± SEM.

[00255] Антитела для иммуногистохимического анализа: LIF человека (Atlas; 1:200), LIF мыши (AbCam; 1:200), p-STAT3 мыши (Cell Signaling; 1:50), Ki67 мыши (AbCam; 1:200), расщепленная-каспаза 3 мыши (CC3) (Cell Signaling; 1:500), CD8 мыши (Bioss; 1:200), CCL2 человека/мыши (Novus Biologicals, 1:200), CXCL9 человека (Thermo Fischer Scientific; 1:100) и CD163 человека (Leica Novacastar; 1:200).

[00256] Ядра контрастно окрашивали с использованием DAPI, и изображения получали с использованием конфокального лазерного сканирующего микроскопа NIKON Eclipse Ti. Количественную оценку иммунофлуоресценции проводили с помощью ImageJ, подсчитывая все или до 100 клеток, положительных по CD11b, Iba1 или CD3, в 2-3 разных полях для каждой мыши, 3-5 мышей/группа, и вычисляли процентную долю клеток, положительных по CCL2, CD206 и CD163 в составе популяций, положительных по Iba1 (для модели GL261N) или CD68/CD11b (для модели ID8). Для CXCL9 рассчитывали процентную долю клеток, окруженных сигналом данного цитокина, в общей популяции клеток. В случае органотипических срезов количественно оценивали 3-4 поля каждого пациента (n = 3). Для иммунофлуоресценции органотипической ткани пять различных изображений по оси Z для каждого условия обрабатывали с помощью программного обеспечения Fiji-Image J. Для CD8⁺ Т-клеток вычисляли процентную долю CD8⁺ Т-клеток во всей популяции. Данные на графиках представлены в виде среднего значения ± SEM.

[00257] Антитела для иммунофлуоресцентного анализа: CCL2 человека/мыши (Novus Biologicals; 1:200), CD11b человека/мыши (AbCam; 1:2000), Iba1 человека/мыши (Wako; 1:1000), CD68 мыши (AbCam; 1:200), CD206 человека/мыши (Abcam; 1:500), CD163 мыши (Abcam; 1:200), CXCL9 (мыши: Novus Biologicals, 1:200; человека: Thermo Fischer Scientific; 1:200) и CD8 человека (DAKO; 1:200).

Пример 30. Влияние LIF на первичные культуры мышинных макрофагов из костного мозга (BMDDM)

[00258] Влияние LIF на первичные культуры BMDDM мышей исследовали для изучения молекулярных механизмов, участвующих в регуляции CXCL9 и CCL2 с помощью LIF в макрофагах. LIF регулировал экспрессию нескольких M1-подобных и M2-подобных маркеров, индуцированных IFN γ или IL4 в BMDDM (**фиг. 22A**). Экспрессию CXCL9 не выявили за исключением случаев, когда BMDDM обрабатывали с использованием IFN γ . Рекombинантный LIF подавлял индуцирование CXCL9 с помощью IFN γ как на уровне мРНК, так и на уровне белка (**фиг. 22B** и **22C**). CXCL9 также регулировался с помощью IFN γ и LIF в полученных от пациента TAM (CD11b⁺ CD14⁺) из свежих опухолей GBM человека (**фиг. 22D** и **29A**). Эти результаты дополнительно подтвердили после выявления того, что рекombинантный LIF подавляет индуцирование CXCL9 с помощью LPS как на уровне мРНК, так и на уровне белка (**фиг. 29B**). Таким образом, LIF действует как репрессор индуцирования CXCL9. Связывание промотора CXCL9 p-STAT3 после обработки LIF не наблюдали (данные не показаны). В соответствии с этим выявили, что обработка с использованием LIF повышает уровни H3 с триметилированным лизином 27

(H3K27me3), снижает уровни ацетилированного H4 (H4ac) и увеличивает связывание EZH2 с промоторным участком CXCL9, демонстрируя, что LIF регулирует экспрессию CXCL9 посредством эпигенетического сайленсинга (фиг. 22E).

Материалы и способы

[00259] Макрофаги из костного мозга (BMDM) получали от мышей C57BL/6 6-10-недельного возраста. Вкратце, предшественники костного мозга культивировали в DMEM (Life Technologies), дополненной 20% инактивированной нагреванием FBS и 30% кондиционированной L-клетками среды (cm) в качестве источника макрофагального колониестимулирующего фактора. Дифференцированные макрофаги получали после 6 дней культивирования. Кондиционированную L-клетками среду получали из клеток L929, выращенных в среде DMEM, дополненной 10% инактивированной нагреванием FBS (Life Technologies). Макрофаги человека выделили из образцов GBM человека. Вкратце, опухолевую ткань ферментативно расщепляли с использованием набора Tumor Dissociation kit, и клетки CD11b⁺ выделяли с использованием магнитных гранул для CD11b и сепаратора MultiMACS Cell24 separator Plus (все от Miltenyi Biotec). Полученные CD11b⁺ клетки культивировали в среде RPMI, дополненной 10% инактивированной нагреванием FBS (Life Technologies). Рекомбинантные LIF, IFN γ , LPS и IL4 приобрели у Millipore, R&D Systems, Sigma и Creative BioMart соответственно.

[00260] Иммунопреципитацию хроматина проводили согласно стандартному протоколу Upstate (Millipore). Вкратце, $1,2 \times 10^7$ BMDM фиксировали с использованием 1% формальдегида в течение 10 мин при температуре 37°C, собирали и подвергали воздействию ультразвука для получения фрагментов хроматина размером 200–500 п.о. Затем 20 мкг хроматина, деградированного в результате гидродинамического сдвига, подвергали иммунопреципитации в течение ночи с 2 мкг антитела к p-STAT3 (Tyr705), антитела к триметил-гистону H3 (Lys27) (Cell Signaling), антитела к ацетил-H4 (Millipore) или антитела к EZH2 (Millipore). Иммунокомплексы извлекали с использованием 20 мкл магнитных гранул с белком G, промывали и элюировали. Осуществляли обращение перекрестного сшивания при температуре 65°C в течение 4 часов, и иммунопреципитированную ДНК извлекали с использованием набора PCR purification kit от Qiagen. Геномные области, представляющие интерес, идентифицировали с помощью количественной ПЦР в режиме реального времени (qPCR) с использованием SYBR Green Master Mix (Invitrogen).

Пример 3. LIF-опосредованная регуляция инфильтрации опухоли иммунными клетками у пациентов

[00261] Чтобы подтвердить, что LIF регулирует инфильтрацию опухоли иммунными клетками посредством репрессии CXCL9 в опухолях от настоящих онкологических пациентов, из образцов GBM, недавно полученных от пациентов, создавали органотипические культуры тканей. Эти органотипические модели позволяют кратковременно культивировать срезы опухолей, которые сохраняют строение ткани и строму (включая иммунные клетки) опухоли пациента. Органотипические культуры тканей от 3 пациентов, опухолевые клетки которых экспрессировали высокие уровни LIF (**фиг. 22H**). Во всех 3 культурах присутствовали крупные инфильтраты TAM, выявленные по маркеру Iba1, и большинство TAM экспрессировали CCL2, CD163 и CD206. Примечательно, что 3-дневная обработка органотипической культуры с использованием нейтрализующего антитела к LIF способствовала снижению экспрессии CCL2, CD163 и CD206 и повышению экспрессии CXCL9 (**фиг. 22H**).

Материалы и способы

[00262] Образцы GBM человека получили из университетской больницы и клинической больницы Валь де Брона. Клинический протокол был одобрен Институциональным наблюдательным советом и клинической больницей Валь де Брона (CEIC) с информированного согласия, полученного от всех субъектов.

[00263] Нейросферы GBM получали так, как описано ниже. Вкратце, образцы опухолей обрабатывали в течение 30 минут после хирургической резекции. Измельченные части образцов GBM человека обрабатывали с использованием 200 ед/мл коллагеназы I (Sigma) и 500 ед/мл ДНКазы I (Sigma) в PBS в течение 1 ч при температуре 37°C при постоянном энергичном перемешивании. Суспензию отдельных клеток фильтровали через клеточный фильтр 70 мкм (BD Falcon) и промывали с использованием PBS. И наконец, клетки ресуспендировали и затем культивировали в среде GBM, которая состояла из среды Neurobasal, дополненной B27, пенициллином/стрептомицином (все от Life Technologies) и факторами роста (20 нг/мл EGF и 20 нг/мл FGF-2 (PeproTech)).

[00264] Органотипические культуры срезов GBM получали следующим образом. После резекции хирургические образцы разрезали скальпелем на прямоугольные блоки длиной 5-10 мм и шириной 1-2 мм и по отдельности переносили в мембранные вставки для культивирования 0,4 мкм (Millipore) в 6-луночных планшетах. Перед помещением вставок в 6-луночные планшеты в каждую лунку добавляли 1,2 мл среды Neurobasal (Life Technologies), дополненной B27 (Life Technologies), пенициллином/стрептомицином (Life Technologies) и факторами роста (20 нг/мл EGF и 20 нг/мл FGF-2) (PeproTech). Культуры хранили при температуре 37°C, постоянной влажности, 95% воздуха и 5% CO². Через

один день срезы обрабатывали с использованием крысиного блокирующего антитела к LIF или с использованием его соответствующего нормального IgG (10 мкг/мл) в течение 3 дней. Для исследований блокирования CXCL9 в культуру добавляли нейтрализующее мышинное моноклональное антитело к CXCL9 человека (R&D Systems) в концентрации 1,5 мкг/мл. В некоторых случаях добавляли 0,1 нг/мл rIFN γ человека (R&D Systems) на 24 часа. Параллельно с этим мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) получали из цельной крови того же пациента путем разделения по градиенту плотности на центрифуге с использованием Lymphosep (Biotest). PBMC подвергали криоконсервации в среде RPMI, дополненной 10% инактивированной FBS и 10% DMSO перед использованием. Для анализов инфильтрации иммунными клетками контрольные срезы или срезы с ингибированием LIF погружали в Matrigel (Corning) с последующим добавлением 1×10^6 PBMC в 24-луночный планшет в полной среде RPMI. Кроме того, собирали супернатанты, извлекали органотипические срезы из Matrigel, а затем обрабатывали для иммунофлуоресцентного (IF) анализа и проточной цитометрии. В некоторых условиях PBMC ресуспендировали в PBS при концентрации 10^6 клеток/мл и инкубировали в течение 20 мин с 5 мкМ Cell Trace CFSE (Invitrogen). После инкубации клетки промывали с использованием RPMI и добавляли в срезы, погруженные в Matrigel. Через 24 часа инвазию флуоресцентных PBMC в Matrigel оценивали под микроскопом путем подсчета мигрирующих клеток в пяти различных областях для каждого условия.

Пример 32. Обработка с использованием антитела к LIF повышала экспрессию CXCL9 и снижала экспрессию CCL2 в опухолях, экспрессирующих высокие уровни LIF

[00265] Оценивали влияние LIF на инфильтрацию опухоли иммунными клетками. После обработки с использованием антитела к LIF органотипические срезы от 3 пациентов с опухолями, экспрессирующими высокие уровни LIF, инкубировали с мононуклеарными клетками периферической крови (PBMC) того же пациента (**фиг. 23А**). Обработка антителом к LIF повышала экспрессию CXCL9 и снижала экспрессию CCL2 (**фиг. 23В**) и индуцировала инфильтрацию иммунными клетками матригеля, окружающего образец опухоли (**фиг. 23В**). Следует отметить, что CD8⁺ Т-клетки рекрутировались в опухолевую ткань после блокирования LIF (**фиг. 23В, 23С**), и данный эффект зависел от CXCL9, поскольку нейтрализация CXCL9 предотвращала инфильтрацию CD⁺ Т-клетками (**фиг. 23D**).

[00266] Аналогичные результаты были подтверждены в контексте модели *in vivo*. Фрагменты опухоли от 4 пациентов, опухоли которых экспрессировали высокие уровни LIF, инокулировали мышам NSG, и этим мышам вводили нейтрализующее антитело к LIF

в течение 5 дней. Затем мышам инокулировали РВМС от каждого пациента. Примечательно, что мыши, которых обрабатывали антителом к LIF, показали повышение инфильтрации опухоли CD8⁺ Т-клетками, и большая часть инфильтрирующих CD8⁺ Т-клеток экспрессировала рецептор CXCL9, CXCR3 (фиг. 23Е).

Пример 33. Увеличение противоопухолевого ответа посредством блокирования PD1

[00267] Мышиные модели с выраженными опухолями обрабатывали антителами к LIF и PD1, и выявили, что комбинация блокирования LIF и PD1 дополнительно уменьшает рост опухоли по сравнению с каждым отдельным видом обработки в опухолях GL261N, RCAS и ID8 (фиг.30). Более того, что важно, комбинированная обработка антителом к LIF и антителом к PD1 повышала общую выживаемость и индуцировала регрессию опухоли (фиг. 23F и 23G).

[00268] Мышей, демонстрирующих полную регрессию опухоли, отбирали и им повторно имплантировали 3×10^5 опухолевых клеток. У этих мышей опухоли не появлялись, в то время как у не обработанных мышей, которым имплантировали параллельно такое же количество клеток, опухоли быстро росли (фиг. 23H). Результат данного эксперимента с повторной имплантацией показал, что комбинированная обработка антителом к LIF и антителом к PD1 обеспечивала индуцирование иммунологической памяти.

Варианты осуществления заявляемого изобретения

[00269] Ниже описаны конкретные варианты осуществления настоящего изобретения, описанного в данном документе.

1. Применение полипептида, связывающего лейкоз-ингибирующий фактор (LIF), в комбинации с ингибитором передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 для лечения рака у индивидуума.
2. Применение согласно варианту осуществления 1, где полипептид, связывающий LIF, и ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводятся индивидууму в отдельных составах.
3. Применение согласно варианту осуществления 1, где полипептид, связывающий LIF, и ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводятся индивидууму в одном и том же составе.
4. Применение согласно варианту осуществления 1 или 2, где полипептид, связывающий LIF, вводится индивидууму до введения индивидууму ингибитора передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2.

5. Применение согласно варианту осуществления 1 или 2, где ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводится индивидууму до введения индивидууму полипептида, связывающего LIF.
6. Применение согласно варианту осуществления 1 или 2, где ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводится индивидууму одновременно с введением индивидууму полипептида, связывающего LIF.
7. Применение согласно любому из вариантов осуществления 1-6, где полипептид, связывающий LIF, содержит фрагмент вариабельной области иммуноглобулина или константной области тяжелой цепи иммуноглобулина.
8. Применение согласно любому из вариантов осуществления 1-7, где полипептид, связывающий LIF, предусматривает антитело, которое специфически связывается с LIF.
9. Применение согласно варианту осуществления 8, где антитело, которое специфически связывается с LIF, содержит по меньшей мере одну каркасную область, полученную из каркасной области человеческого антитела.
10. Применение согласно варианту осуществления 8, где антитело, которое специфически связывается с LIF, является гуманизированным.
11. Применение согласно варианту осуществления 8, где антитело, которое специфически связывается с LIF, является деиммунизированным.
12. Применение согласно варианту осуществления 8, где антитело, которое специфически связывается с LIF, содержит две тяжелые цепи иммуноглобулина и две легкие цепи иммуноглобулина.
13. Применение согласно варианту осуществления 8, где антитело, которое специфически связывается с LIF, представляет собой антитело IgG.
14. Применение согласно варианту осуществления 8, где антитело, которое специфически связывается с LIF, представляет собой Fab, F(ab)₂, однодоменное антитело, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) или наноантитело.
15. Применение согласно любому из вариантов осуществления 8-14, где антитело, которое специфически связывается с LIF, содержит:
 - a) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 1-3;
 - b) определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 4 или 5;

- c) определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 6-8;
- d) определяющую комплементарность область 1 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 9 или 10;
- e) определяющую комплементарность область 2 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 11 или 12; и
- f) определяющую комплементарность область 3 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13.

16. Применение согласно любому из вариантов осуществления 8-15, где антитело, которое специфически связывается с LIF, содержит:

- a) последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 41, 42, 44 или 66; и
- b) последовательность вариабельной области легкой цепи (VL) иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 45-48.

17. Применение согласно варианту осуществления 16, где последовательность VH на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 42; и последовательность VL на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46.

18. Применение согласно варианту осуществления 17, где последовательность VH идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 42; и последовательность VL идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46.

19. Применение согласно любому из вариантов осуществления 8-15, где антитело, которое специфически связывается с LIF, содержит:

- а) последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 57-60 или 67; и
- б) последовательность легкой цепи иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 61-64.

20. Применение согласно любому из вариантов осуществления 8-19, где антитело, которое специфически связывается с LIF, связывается с K_D , составляющей менее приблизительно 200 пикомоль.

21. Применение согласно любому из вариантов осуществления 8-19, где антитело, которое специфически связывается с LIF, связывается с K_D , составляющей менее приблизительно 100 пикомоль.

22. Применение согласно любому из вариантов осуществления 8-21, где ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 предусматривает антитело или его фрагмент, связывающий PD-1, PDL-1 или PDL-2.

23. Применение согласно варианту осуществления 22, где антитело специфически связывает PD-1.

24. Применение согласно варианту осуществления 22, где антитело предусматривает пембролизумаб, ниволумаб, AMP-514, тислелизумаб, спартализумаб или их фрагмент, связывающий PD-1.

25. Применение согласно варианту осуществления 22, где антитело специфически связывает PDL-1 или PDL-2.

26. Применение согласно варианту осуществления 25, где антитело предусматривает дурвалумаб, атезолизумаб, авелумаб, BMS-936559 или FAZ053 или их фрагмент, связывающий PDL-1 или PDL-2.

27. Применение согласно любому из вариантов осуществления 8-16, где ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 предусматривает Fc-слитый белок, который связывает PD-1, PDL-1 или PDL-2.

28. Применение согласно варианту осуществления 27, где Fc-слитый белок предусматривает AMP-224 или его фрагмент, связывающий PD-1.

29. Применение согласно любому из вариантов осуществления 1-28, где ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 предусматривает низкомолекулярный ингибитор PD-1, PDL-1 или PDL-2.

30. Применение согласно варианту осуществления 29, где низкомолекулярный ингибитор передачи сигналов посредством PD-1, PDL-1 или PDL-2 предусматривает: N-{2-[(2-метокси-6-[(2-метил[1,1'-бифенил]-3-ил)метокси]пиридин-3-ил)метил)амино]этил}ацетамид (BMS 202); (2-((3-цианобензил)окси)-4-((3-(2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-ил)-2-метилбензил)окси)-5-метилбензил)-D-серина гидрохлорид; (2R,4R)-1-(5-хлор-2-((3-цианобензил)окси)-4-((3-(2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-ил)-2-метилбензил)окси)бензил)-4-гидроксипирролидин-2-карбоновую кислоту; 3-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-1-фенилиндол; 3-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-1-фенил-1H-индол; L- α -глутамин, N2, N6-бис(L-серил-L-аспарагинил-L-треонил-L-серил-L- α -глутамил-L-серил-L-фенилаланил)-L-лизил-L-фенилаланил-L-аргинил-L-валил-L-треонил-L-глутаминил-L-лейцил-L-аланил-L-пролил-L-лизил-L-аланил-L-глутаминил-L-изолейцил-L-лизил; (2S)-1-[[2,6-диметокси-4-[(2-метил[1,1'-бифенил]-3-ил)метокси]фенил]метил]-2-пиперидинкарбоновую кислоту; глицинамид, N-(2-меркаптоацетил)-L-фенилаланил-N-метил-L-аланил-L-аспарагинил-L-пролил-L-гистидил-L-лейцил-N-метилглицил-L-триптофил-L-серил-L-триптофил-N-метил-L-норлейцил-N-метил-L-норлейцил-L-аргинил-L-цистеинил-, циклический(1 \rightarrow 14)-тиозфир или их производное или аналог.

31. Применение согласно любому из вариантов осуществления 1-30, где рак включает распространенную солидную опухоль, глиобластому, рак желудка, рак кожи, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичка, рак щитовидной железы, рак головы и шеи, рак печени, рак почки, рак пищевода, рак яичника, рак толстой кишки, рак легкого, лимфому, рак мягких тканей или любую их комбинацию.

32. Применение в соответствии вариантом осуществления 31, где рак включает немелкоклеточный рак легкого, эпителиальную карциному яичника или протоковую аденокарциному поджелудочной железы.

33. Применение согласно любому из вариантов осуществления 1-32, где рак является рефрактерным к лечению терапевтическим количеством полипептида, связывающего LIF, или ингибитора передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2, вводимых в режиме монотерапии.

34. Способ лечения индивидуума, страдающего от рака, предусматривающий введение индивидууму, страдающему от рака, эффективного количества комбинации:
- а) полипептида, который специфически связывает лейкоз-ингибирующий фактор (LIF); и
 - б) ингибитора передачи сигналов PD-1 (CD279), PDL-1 (CD274) или PDL-2 (CD273).
35. Способ согласно варианту осуществления 34, где полипептид, связывающий LIF, и ингибитор передачи сигналов PD-1 (CD279), PDL-1 (CD274) или PDL-2 (CD273) вводят по отдельности.
36. Способ согласно варианту осуществления 34, предусматривающий введение эффективного количества полипептида, связывающего LIF, индивидууму, страдающему от рака.
37. Способ согласно варианту осуществления 34, предусматривающий введение эффективного количества ингибитора PD-1 индивидууму, страдающему от рака.
38. Способ согласно любому из вариантов осуществления 34-37, где полипептид, связывающий LIF, предусматривает фрагмент вариабельной области иммуноглобулина или константной области тяжелой цепи иммуноглобулина.
39. Способ согласно любому из вариантов осуществления 34-37, где полипептид, связывающий LIF, предусматривает антитело, которое специфически связывается с LIF.
40. Способ согласно варианту осуществления 39, где антитело, которое специфически связывается с LIF, предусматривает по меньшей мере одну каркасную область, полученную из каркасной области человеческого антитела.
41. Способ согласно варианту осуществления 39, где антитело, которое специфически связывается с LIF, является гуманизированным.
42. Способ согласно варианту осуществления 39, где антитело, которое специфически связывается с LIF, является деиммунизированным.
43. Способ согласно варианту осуществления 39, где антитело, которое специфически связывается с LIF, содержит две тяжелые цепи иммуноглобулина и две легкие цепи иммуноглобулина.
44. Способ согласно варианту осуществления 39, где антитело, которое специфически связывается с LIF, представляет собой антитело IgG.
45. Способ согласно варианту осуществления 39, где антитело, которое специфически связывается с LIF, представляет собой Fab, F(ab)₂, однодоменное антитело, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) или наноантитело.

46. Способ согласно любому из вариантов осуществления 39-45, где антитело, которое специфически связывается с LIF, содержит:

- a) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 1-3;
- b) определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 4 или 5;
- c) определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 6-8;
- d) определяющую комплементарность область 1 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 9 или 10;
- e) определяющую комплементарность область 2 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 11 или 12; и
- f) определяющую комплементарность область 3 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13.

47. Способ согласно любому из вариантов осуществления 39-46, где антитело, которое специфически связывается с LIF, содержит:

- a) последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 41, 42, 44 или 66; и
- b) последовательность вариабельной области легкой цепи (VL) иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 45-48.

48. Способ согласно варианту осуществления 47, где последовательность VH на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентична

аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 42; и последовательность VL на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46.

49. Способ согласно варианту осуществления 48, где последовательность VH идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 42; и последовательность VL идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46.

50. Способ согласно любому из вариантов осуществления 39-46, где антитело, которое специфически связывается с LIF, содержит:

- a) последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 57-60 или 67; и
- b) последовательность легкой цепи иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 61-64.

51. Способ согласно любому из вариантов осуществления 39-50, где антитело, которое специфически связывается с LIF, связывается с K_D , составляющей менее приблизительно 200 пикомоль.

52. Способ согласно любому из вариантов осуществления 39-50, где антитело, которое специфически связывается с LIF, связывается с K_D , составляющей менее приблизительно 100 пикомоль.

53. Способ согласно любому из вариантов осуществления 34-52, где ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 предусматривает антитело или его фрагмент, связывающий PD-1, PDL-1 или PDL-2.

54. Способ согласно варианту осуществления 53, где антитело специфически связывает PD-1.

55. Способ согласно варианту осуществления 54, где антитело предусматривает пембролизумаб, ниволумаб, AMP-514, тислелизумаб, спартализумаб или их фрагмент, связывающий PD-1.

56. Способ согласно варианту осуществления 53, где антитело специфически связывает PDL-1 или PDL-2.

57. Способ согласно варианту осуществления 56, где антитело предусматривает дурвалумаб, атезолизумаб, авелумаб, BMS-936559 или FAZ053 или их фрагмент, связывающий PDL-1 или PDL-2.

58. Способ согласно любому из вариантов осуществления 34-52, где ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 предусматривает Fc-слитый белок, который связывает PD-1, PDL-1 или PDL-2.

59. Способ согласно варианту осуществления 58, где Fc-слитый белок предусматривает AMP-224 или его фрагмент, связывающий PD-1.

60. Способ согласно любому из вариантов осуществления 34-52, где ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 предусматривает низкомолекулярный ингибитор PD-1, PDL-1 или PDL-2.

61. Способ согласно варианту осуществления 60, где низкомолекулярный ингибитор передачи сигналов посредством PD-1, PDL-1 или PDL-2 предусматривает одно или несколько из: N-{2-[(2-метокси-6-[(2-метил[1,1'-бифенил]-3-ил)метокси]пиридин-3-ил)метил]амино}этил}ацетамида (BMS 202); (2-((3-цианобензил)окси)-4-((3-(2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-ил)-2-метилбензил)окси)-5-метилбензил)-D-серина гидрохлорида; (2R,4R)-1-(5-хлор-2-((3-цианобензил)окси)-4-((3-(2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-ил)-2-метилбензил)окси)бензил)-4-гидроксипирролидин-2-карбоновой кислоты; 3-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-1-фенилиндола; 3-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-1-фенил-1H-индола; L- α -глутамин,N2,N6-бис(L-серил-L-аспарагинил-L-треонил-L-серил-L- α -глутамил-L-серил-L-фенилаланил)-L-лизил-L-фенилаланил-L-аргинил-L-валил-L-треонил-L-глутаминил-L-лейцил-L-аланил-L-пролил-L-лизил-L-аланил-L-глутаминил-L-изолейцил-L-лизила; (2S)-1-[[2,6-диметокси-4-[(2-метил[1,1'-бифенил]-3-ил)метокси]фенил]метил]-2-пиперидинкарбоновой кислоты; глицинамид,N-(2-меркаптоацетил)-L-фенилаланил-N-метил-L-аланил-L-аспарагинил-L-пролил-L-гистидил-L-лейцил-N-метилглицил-L-триптофил-L-серил-L-триптофил-N-метил-L-норлейцил-N-метил-L-норлейцил-L-аргинил-L-цистеинил-,циклического(1 \rightarrow 14)-тиоэфира или их производного или аналога.

62. Способ согласно любому из вариантов осуществления 34-61, где рак включает распространенную солидную опухоль, глиобластому, рак желудка, рак кожи, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичка, рак щитовидной железы, рак головы и шеи, рак печени, рак почки, рак пищевода, рак яичника, рак толстой кишки, рак легкого, лимфому, рак мягких тканей или их комбинацию.

63. Способ в соответствии вариантом осуществления 62, где рак включает немелкоклеточный рак легкого, эпителиальную карциному яичника или аденокарциному поджелудочной железы.
64. Способ согласно любому из вариантов осуществления 34-63, где рак является рефрактерным к лечению терапевтическим количеством ингибитора полипептида, связывающего LIF.
65. Способ согласно любому из вариантов осуществления 34-63, где рак является рефрактерным к лечению терапевтическим количеством ингибитора передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2.
66. Способ согласно любому из вариантов осуществления 34-65, где полипептид, связывающий лейкоз-ингибирующий фактор (LIF), и ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводят по отдельности.
67. Способ согласно любому из вариантов осуществления 34-65, где полипептид, связывающий LIF, и ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводят одновременно.
68. Способ согласно любому из вариантов осуществления 34-65, где полипептид, связывающий LIF, и ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводят в одной композиции.
69. Применение антитела, которое специфически связывает лейкоз-ингибирующий фактор (LIF), в комбинации с антителом, связывающим PD-1 или PDL-1, для лечения рака у индивидуума, где антитело, связывающее LIF, содержит:
- определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 1-3;
 - определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 4 или 5;
 - определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 6-8;
 - определяющую комплементарность область 1 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 9 или 10;

- e) определяющую комплементарность область 2 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 11 или 12; и
- f) определяющую комплементарность область 3 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13.

70. Способ лечения индивидуума, страдающего от рака, предусматривающий введение индивидууму, страдающему от рака, эффективного количества комбинации:

- a) антитела, которое специфически связывает лейкоз-ингибирующий фактор (LIF), содержащего:
 - i. определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 1-3;
 - ii. определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 4 или 5;
 - iii. определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 6-8;
 - iv. определяющую комплементарность область 1 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 9 или 10;
 - v. определяющую комплементарность область 2 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 11 или 12; и
 - vi. определяющую комплементарность область 3 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13; и
- b) антитела, связывающего PD-1 или PDL-1.

71. Способ согласно варианту осуществления 70, предусматривающий введение эффективного количества антитела, которое специфически связывает LIF, индивидууму, страдающему от рака.

72. Способ согласно варианту осуществления 70, предусматривающий введение эффективного количества антитела, которое специфически связывает PD-1 или PDL-1, индивидууму, страдающему от рака.

73. Способ согласно любому из вариантов осуществления 70-72, где антитело, которое специфически связывает LIF, и антитело, связывающее PD-1 или PDL-1, вводят по отдельности.

74. Способ согласно любому из вариантов осуществления 70-73, где рак представляет собой мультиформную глиобластому (GBM), NSCLC (немелкоклеточную карциному легкого), рак яичника, колоректальный рак, рак щитовидной железы, рак поджелудочной железы или их комбинации.

75. Способ уменьшения количества проопухолевых макрофагов, ассоциированных с опухолью (TAM), в опухоли у индивидуума, страдающего от рака, предусматривающий введение индивидууму, страдающему от рака, эффективного количества комбинации:

а) антитела, которое специфически связывает лейкоз-ингибирующий фактор (LIF), содержащего:

- i. определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 1-3;
- ii. определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 4 или 5;
- iii. определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 6-8;
- iv. определяющую комплементарность область 1 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 9 или 10;
- v. определяющую комплементарность область 2 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 11 или 12; и

vi. определяющую комплементарность область 3 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13; и

b) антитела, связывающего PD-1 или PDL-1.

76. Способ согласно варианту осуществления 75, предусматривающий введение эффективного количества антитела, которое специфически связывает LIF, индивидууму, страдающему от рака.

77. Способ согласно варианту осуществления 75, предусматривающий введение эффективного количества антитела, которое специфически связывает PD-1 или PDL-1, индивидууму, страдающему от рака.

78. Способ согласно любому из вариантов осуществления 75-77, где антитело, которое специфически связывает LIF, и антитело, связывающее PD-1 или PDL-1, вводят по отдельности.

79. Способ согласно любому из вариантов осуществления 75-78, где ТАМ демонстрирует экспрессию на клеточной поверхности любых 1, 2 или 3 молекул, выбранных из списка, состоящего из CD11b, CD206 и CD163.

80. Способ согласно любому из вариантов осуществления 75-78, где опухоль включает опухоль легкого, опухоль головного мозга, опухоль поджелудочной железы, опухоль молочной железы, опухоль почки, колоректальную опухоль, опухоль яичника или их комбинацию.

81. Способ индуцирования иммунологической памяти у индивидуума, страдающего от рака, предусматривающий введение индивидууму, страдающему раком, эффективного количества комбинации:

a) антитела, которое специфически связывает лейкоз-ингибирующий фактор (LIF), содержащего:

i. определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 1-3;

ii. определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 4 или 5;

iii. определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 6-8;

- iv. определяющую комплементарность область 1 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 9 или 10;
- v. определяющую комплементарность область 2 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 11 или 12; и
- vi. определяющую комплементарность область 3 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13; и

b) антитела, связывающего PD-1 или PDL-1.

82. Способ согласно варианту осуществления 81, предусматривающий введение эффективного количества антитела, которое специфически связывает LIF, индивидууму, страдающему от рака.

83. Способ согласно варианту осуществления 81, предусматривающий введение эффективного количества антитела, связывающего PD-1 или PDL-1, индивидууму, страдающему от рака.

84. Способ согласно любому из вариантов осуществления 81-83, где антитело, которое специфически связывает LIF, и антитело, связывающее PD-1 или PDL-1, вводят по отдельности.

85. Способ согласно любому из вариантов осуществления 81-84, где иммунологическая память опосредована CD8⁺ Т-клетками.

86. Способ согласно любому из вариантов осуществления 81-84, где иммунологическая память опосредована CD4⁺ Т-клетками.

87. Способ увеличения количества Т-лимфоцитов в опухоли у индивидуума, предусматривающий введение индивидууму, страдающему от опухоли, эффективного количества комбинации:

a) антитела, которое специфически связывает лейкоз-ингибирующий фактор (LIF), содержащего:

- i. определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 1-3;

- ii. определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 4 или 5;
- iii. определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 6-8;
- iv. определяющую комплементарность область 1 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 9 или 10;
- v. определяющую комплементарность область 2 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 11 или 12; и
- vi. определяющую комплементарность область 3 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13; и

b) антитела, связывающего PD-1 или PDL-1.

88. Способ согласно варианту осуществления 87, предусматривающий введение эффективного количества антитела, которое специфически связывает LIF, индивидууму, страдающему от рака.

89. Способ согласно варианту осуществления 87, предусматривающий введение эффективного количества антитела, которое специфически связывает PD-1 или PDL-1, индивидууму, страдающему от рака.

90. Способ согласно варианту осуществления 87, где антитело, которое специфически связывает LIF, и антитело, связывающее PD-1 или PDL-1, вводят по отдельности.

91. Способ согласно любому из вариантов осуществления 87-90, где Т-лимфоциты включают CD8+ Т-клетки.

92. Способ согласно любому из вариантов осуществления 87-90, где Т-лимфоциты включают CD4+ Т-клетки.

93. Способ согласно любому из вариантов осуществления 87-90, где опухоль включает опухоль легкого, опухоль головного мозга, опухоль поджелудочной железы, опухоль молочной железы, опухоль почки, колоректальную опухоль, опухоль яичника или их комбинацию.

[00270] Хотя в данном документе были показаны и описаны предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, специалистам в данной области техники будет очевидно, что такие варианты осуществления приведены лишь в качестве примера. Многочисленные варианты, изменения и замены будут очевидны специалистам в данной области техники без отклонения от настоящего изобретения. Следует понимать, что различные альтернативы вариантам осуществления настоящего изобретения, описанные в данном документе, можно использовать при практической реализации настоящего изобретения.

[00271] Все публикации, заявки на патенты, выданные патенты и другие документы, упоминаемые в настоящем описании, включены в данный документ посредством ссылки в том же объеме, как если бы каждая отдельная публикация, заявка на патент, выданный патент или другой документ были конкретно и отдельно указаны как включенные в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Определения, которые содержатся в тексте, включенном посредством ссылки, исключаются в том же объеме, в котором они противоречат определениям в настоящем изобретении.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

SEQ ID NO	Последовательность
1	GFTFSHAWMH
2	GFTFSHAW
3	HAWMH
4	QIKAKSDDYATYYAESVKG
5	IKAKSDDYAT
6	TCWEWDLDF
7	WEWDLDF
8	TSWEWDLDF
9	RSSQSLLDSDGHTYLN
10	QSLLDSDGHTY
11	SVSNLES
12	SVS
13	MQATHAPPYT

14	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAAS
15	QVQLQESGGGLVKPGGSLRLSAAAS
16	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSAAAS
17	EVQLMESGGGLVKPGGSLRLSCATS
18	WVRQAPGKGLEWVA
19	WVRQAPGKGLEWVG
20	RFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYC
21	RFSISRDNANKNSLYLQMNSLRVEDTVVYYC
22	RFTISRDDSKSTLFLQMNNLKTEDTAVYYC
23	WGQGTLVTVSS
24	WGQGMVTVSS
25	WGQGTTVTVSS
26	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC
27	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISC
28	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC
29	DVVMTQSPLSQPVTLGQPASISC
30	WFQQRPGQSPRRLIY
31	WLQQRPGQPPRLLIY
32	WLLQKPGQPPQLLIY
33	WLQQRPGQSPRRLIY
34	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGLYYC
35	GVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
36	GVPNRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGLYYC
37	GVPDRFNGSGSGTDFTLSISRVEAEDVGVYYC
38	FGQGTKLEIK
39	FGGGTKVEIK
40	FGQGTKVEIK
41	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSHAWMHWRQAPGKGLEWVAQ IKAKSDDYATYYAESVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTCW EWDLDFWGQGTLVTVSS
42	QVQLQESGGGLVKPGGSLRLSAAASGFTFSHAWMHWRQAPGKGLEWVG QIKAKSDDYATYYAESVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTC WEWDLDFWGQGMVTVSS

43	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSHAWMHWRQAPGKGLEWVAQ IKAKSDDYATYYAESVKGRFSISRDNANKNSLYLQMNSLRVEDTVVYYCTCW EWDLDFWGQGTTVTVSS
44	EVQLMESGGGLVKPGGSLRLSCATSGFTFSHAWMHWRQAPGKGLEWVGQ IKAKSDDYATYYAESVKGRFTISRDDSKSTLFLQMNNLKTEDTAVYYCTCW EWDLDFWGQGTTLVTVSS
45	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLDSGDHTYLNWFQQRPGQSPRRLI YSVSNLESGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGLYYCMQATHAPPYTFGQGTKLEIK
46	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLLDSGDHTYLNWLQQRPGQPPRLIY SVSNLESGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQATHAPPYTFGQ GTKLEIK
47	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLLDSGDHTYLNWLLQKPGQPPQLLIY SVSNLESGVPNRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGLYYCMQATHAPPYTFGG GTKVEIK
48	DVVMTQSPLSQPVTLGQPASISCRSSQSLLDSGDHTYLNWLQQRPGQSPRRLI YSVSNLESGVPDRFNNGSGSGTDFTLISRVEAEDVGVYYCMQATHAPPYTFG QGTKVEIK
49	MGWTLVFLFLLSVTAGVHSEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSHA WMHWVRQAPGKGLEWVAQIKAKSDDYATYYAESVKGRFTISRDDSKNTLY LQMNSLKTEDTAVYYCTCW EWDLDFWGQGTTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
50	MGWTLVFLFLLSVTAGVHSQVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSHA WMHWVRQAPGKGLEWVGQIKAKSDDYATYYAESVKGRFTISRDDSKNTLY LQMNSLKTEDTAVYYCTCW EWDLDFWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLG

	<p>GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQKSLS LSPGK</p>
51	<p>MGWTLVFLFLLSVTAGVHSEVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSHA WMHWVRQAPGKGLEWVAQIKAKSDDYATYYAESVKGRFSISRDNANKNSLY LQMNSLRVEDTVVYYCTCWEWDLDFWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQKSLS LSPGK</p>
52	<p>MGWTLVFLFLLSVTAGVHSEVQLMESGGGLVKPGGSLRLSCATSGFTFSHA WMHWVRQAPGKGLEWVGQIKAKSDDYATYYAESVKGRFTISRDDSKSTLF LQMNNLKTEDTAVYYCTCWEWDLDFWGQGTTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQKSLS LSPGK</p>
53	<p>MVSSAQFLGLLLLCFQGTRCDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLDSD GHTYLNWFQQRPGQSPRRLIYSVSNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGLYYCMQATHAPPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
54	<p>MVSSAQFLGLLLLCFQGTRCDIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLLDSDG HTYLNWLQQRPGQPPRLLIYSVSNLESGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAED VGVYYCMQATHAPPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV</p>

	CLLNNFYBPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
55	MVSSAQFLGLLLLCFQGTRCDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLLDSDG HTYLNWLLQKPGQPPQLLIYSVSNLESGVFNRFSGSGSGTDFTLKISRVEAED VGLYYCMQATHAPPYTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYBPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
56	MVSSAQFLGLLLLCFQGTRCDVVMTQSPLSQPVTLGQPASISCRSSQSLLDSD GHTYLNWLQQRPGQSPRRLIYSVSNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLISRVEAE DVGYYCMQATHAPPYTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYBPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLKA ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
57	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSHAWMHWRQAPGKGLEWVAQ IKAKSDDYATYYAESVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTCW EWDLDFWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK
58	QVQLQESGGGLVKPGGSLRLS AASGFTFSHAWMHWRQAPGKGLEWVG QIKAKSDDYATYYAESVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTC WEWDLDFWGQGLTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK
59	EVQLVESGGGVVQGRSLRLS AASGFTFSHAWMHWRQAPGKGLEWVAQ IKAKSDDYATYYAESVKGRFSISRDNANKNSLYLQMNSLRVEDTVVYYCTCW EWDLDFWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE

	<p>PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
60	<p>EVQLMESGGGLVKPGGSLRLSCATSGFTFSHAWMHWRQAPGKGLEWVGQ IKAKSDDYATYYAESVKGRFTISRDDSKSTLFLQMNNLKTEDTAVYYCTCW EWDLDFWGGQTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
61	<p>DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLDSDGHTYLNWFQQRPGQSPRRLI YSVSNLESGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGLYYCMQATHAPPYTFG QGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC</p>
62	<p>DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLLDSDGHTYLNWLQQRPGQPPRLLIY SVSNLESGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQATHAPPYTFGQ GTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC</p>
63	<p>DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLLDSDGHTYLNWLLQKPGQPPQLLIY SVSNLESGVPNRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGLYYCMQATHAPPYTFGG GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC</p>
64	<p>DVVMTQSPLSQPVTLGQPASISCRSSQSLLDSDGHTYLNWLQQRPGQSPRRLI YSVSNLESGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQATHAPPYTFG QGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD</p>

	NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC
65	Пропуск
66	QVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSHAWMHWRQAPGKGLEWVG QIKAKSDDYATYYAESVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCT <u>S</u> WEWDLDFWGQGTMTVSS
67	QVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSHAWMHWRQAPGKGLEWVG QIKAKSDDYATYYAESVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCT <u>S</u> WEWDLDFWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
68	SPLPITPVNATCAIRHPCHNNLMNQIRSQLAQLNGSANALFILYYTAQGEFPF NNLDKLCGPNVTDFFPFHANGTEKAKLVELYRIVVYLGTSLGNITRDQKILNP SALSLSKLNATADILRGLLSNVLCRLCSKYHVGHVVDVYGPDTSGKDVVFQ KKKLGKQLLGKQIIAVLAQAF

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**Заявляется:**

1. Применение антитела, связывающего лейкоз-ингибирующий фактор (LIF), в комбинации с ингибитором передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 для лечения рака у индивидуума, где антитело, связывающее LIF, содержит:

- a) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 1-3;
- b) определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 4 или 5;
- c) определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 6-8;
- d) определяющую комплементарность область 1 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 9 или 10;
- e) определяющую комплементарность область 2 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 11 или 12; и
- f) определяющую комплементарность область 3 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13.

2. Применение по п. 1, где антитело, связывающее LIF, содержит:

- a) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 1;
- b) определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4;

- c) определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 6;
 - d) определяющую комплементарность область 1 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 9;
 - e) определяющую комплементарность область 2 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 11; и
 - f) определяющую комплементарность область 3 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13.
3. Применение по п. 1, где антитело, связывающее LIF, содержит:
- a) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3;
 - b) определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 5;
 - c) определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 7;
 - d) определяющую комплементарность область 1 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 10;
 - e) определяющую комплементарность область 2 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 12; и
 - f) определяющую комплементарность область 3 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13.
4. Применение по любому из пп. 1-3, где антитело, связывающее LIF, и ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводятся индивидууму в отдельных составах.

5. Применение по любому из пп. 1-3, где антитело, связывающее LIF, и ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводятся индивидууму в одном и том же составе.
6. Применение по любому из пп. 1-4, где антитело, связывающее LIF, вводится индивидууму до введения индивидууму ингибитора передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2.
7. Применение по любому из пп. 1-4, где ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводится индивидууму до введения индивидууму антитела, связывающего LIF.
8. Применение по любому из пп. 1-4, где ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводится индивидууму одновременно с введением индивидууму антитела, связывающего LIF.
9. Применение по любому из пп. 1-8, где антитело, связывающее LIF, является гуманизированным.
10. Применение по любому из пп. 1-9, где антитело, связывающее LIF, содержит переменную область тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 90% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 42; и переменную область легкой цепи (VL) иммуноглобулина, которая на по меньшей мере приблизительно 90% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46.
11. Применение по п. 10, где последовательность VH идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 42; и последовательность VL идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46.
12. Применение по любому из пп. 1-11, где рак включает распространенную солидную опухоль, глиобластому, рак желудка, рак кожи, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, протоковую аденокарциному поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичка, рак щитовидной железы, рак головы и шеи, рак печени, рак почки, рак пищевода, рак яичника, рак толстой кишки, рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, лимфому, рак мягких тканей или любую их комбинацию.
13. Применение по п. 12, где рак включает немелкоклеточный рак легкого.
14. Применение по п. 12, где рак включает протоковую аденокарциному поджелудочной железы.
15. Применение по любому из пп. 1-14, где ранее проведенное лечение рака с помощью ингибитора контрольных точек иммунного ответа было неэффективным.

16. Применение по любому из пп. 1-15, где ранее проведенное лечение рака с помощью антитела, связывающего LIF, было неэффективным.
17. Применение по п. 15 или п. 16, где ингибитор контрольных точек иммунного ответа представляет собой ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2.
18. Применение по любому из пп. 1-17, где ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 представляет собой антитело или его фрагмент, которые связываются с PD-1.
19. Применение антитела, связывающего лейкоз-ингибирующий фактор (LIF), в комбинации с ингибитором передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 для лечения рака у индивидуума, где антитело, связывающее LIF, содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 90% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 42; и вариабельную область легкой цепи (VL) иммуноглобулина, которая на по меньшей мере приблизительно 90% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46.
20. Применение по п. 19, где антитело, связывающее LIF, и ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводятся индивидууму в отдельных составах.
21. Применение по п. 19, где антитело, связывающее LIF, и ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводятся индивидууму в одном и том же составе.
22. Применение по п. 19 или п. 20, где антитело, связывающее LIF, вводится индивидууму до введения индивидууму ингибитора передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2.
23. Применение по п. 19 или п. 20, где ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводится индивидууму до введения индивидууму антитела, связывающего LIF.
24. Применение по любому из пп. 19-21, где ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводится индивидууму одновременно с введением индивидууму антитела, связывающего LIF.
25. Применение по любому из пп. 19-24, где антитело, связывающее LIF, является гуманизированным.
26. Применение по любому из пп. 19-25, где последовательность VH идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 42; и последовательность VL идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46.
27. Применение по любому из пп. 19-26, где рак включает распространенную солидную опухоль, глиобластому, рак желудка, рак кожи, рак предстательной железы, рак

поджелудочной железы, протоковую аденокарциному поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичка, рак щитовидной железы, рак головы и шеи, рак печени, рак почки, рак пищевода, рак яичника, рак толстой кишки, рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, лимфому, рак мягких тканей или любую их комбинацию.

28. Применение по п. 27, где рак включает немелкоклеточный рак легкого.

29. Применение по п. 27, где рак включает протоковую аденокарциному поджелудочной железы.

30. Применение по любому из пп. 19-29, где ранее проведенное лечение рака с помощью ингибитора контрольных точек иммунного ответа было неэффективным.

31. Применение по любому из пп. 19-30, где ранее проведенное лечение рака с помощью антитела, связывающего LIF, было неэффективным.

32. Применение по п. 30 или п. 31, где ингибитор контрольных точек иммунного ответа представляет собой ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2.

33. Применение по любому из пп. 19-32, где ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 представляет собой антитело или его фрагмент, которые связываются с PD-1.

34. Способ лечения индивидуума, страдающего от рака, предусматривающий введение индивидууму, страдающему от рака, эффективного количества комбинации:

а) антитела, которое специфически связывает лейкоз-ингибирующий фактор (LIF), содержащего:

- i. определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 1-3;
- ii. определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 4 или 5;
- iii. определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 6-8;
- iv. определяющую комплементарность область 1 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 9 или 10;
- v. определяющую комплементарность область 2 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR2), содержащую аминокислотную

последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 11 или 12; и

vi. определяющую комплементарность область 3 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13; и

b) ингибитора передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2.

35. Способ по п. 34, где антитело, связывающее LIF, содержит:

a) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 1;

b) определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4;

c) определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 6;

d) определяющую комплементарность область 1 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 9;

e) определяющую комплементарность область 2 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 11; и

f) определяющую комплементарность область 3 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13.

36. Способ по п. 34, где антитело, связывающее LIF, содержит:

a) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3;

b) определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 5;

- c) определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 7;
- d) определяющую комплементарность область 1 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 10;
- e) определяющую комплементарность область 2 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 12; и
- f) определяющую комплементарность область 3 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13.

37. Способ по любому из пп. 34-36, где антитело, связывающее LIF, и ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводят индивидууму в отдельных составах.

38. Способ по любому из пп. 34-36, где антитело, связывающее LIF, и ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводят индивидууму в одном и том же составе.

39. Способ по любому из пп. 34-37, где антитело, связывающее LIF, вводят индивидууму до введения индивидууму ингибитора передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2.

40. Способ по любому из пп. 34-37, где ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводят индивидууму до введения индивидууму антитела, связывающего LIF.

41. Способ по любому из пп. 34-37, где ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводят индивидууму одновременно с введением индивидууму антитела, связывающего LIF.

42. Способ по любому из пп. 34-41, где антитело, связывающее LIF, является гуманизированным.

43. Способ по любому из пп. 34-42, где антитело, связывающее LIF, содержит переменную область тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 90% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 42; и переменную область легкой цепи (VL) иммуноглобулина, которая на по меньшей мере приблизительно 90% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46.

44. Способ по п. 43, где последовательность VH идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 42; и последовательность VL идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46.
45. Способ по любому из пп. 34-44, где рак включает распространенную солидную опухоль, глиобластому, рак желудка, рак кожи, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, протоковую аденокарциному поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичка, рак щитовидной железы, рак головы и шеи, рак печени, рак почки, рак пищевода, рак яичника, рак толстой кишки, рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, лимфому, рак мягких тканей или любую их комбинацию.
46. Способ по п. 45, где рак включает немелкоклеточный рак легкого.
47. Способ по п. 45, где рак включает протоковую аденокарциному поджелудочной железы.
48. Способ по любому из пп. 34-45, где ранее проведенное лечение рака с помощью ингибитора контрольных точек иммунного ответа было неэффективным.
49. Способ по любому из пп. 34-45, где ранее проведенное лечение рака с помощью антитела, связывающего LIF, было неэффективным.
50. Способ по п. 48 или п. 49, где ингибитор контрольных точек иммунного ответа представляет собой ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2.
51. Способ по любому из пп. 34-50, где ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 представляет собой антитело или его фрагмент, которые связываются с PD-1.
52. Способ по п. 51, где антитело предусматривает пембролизумаб, ниволумаб, AMP-514, тислелизумаб, спартализумаб или их фрагмент, связывающий PD-1.
53. Способ по п. 51, где антитело специфически связывает PDL-1 или PDL-2.
54. Способ по п. 53, где антитело предусматривает дурвалумаб, атезолизумаб, авелумаб, BMS-936559 или FAZ053 или их фрагмент, связывающий PDL-1 или PDL-2.
55. Способ по любому из пп. 34-50, где ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 предусматривает Fc-слитый белок, который связывает PD-1, PDL-1 или PDL-2.
56. Способ по п. 55, где Fc-слитый белок предусматривает AMP-224 или его фрагмент, связывающий PD-1.
57. Способ по любому из пп. 34-50, где ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 предусматривает низкомолекулярный ингибитор PD-1, PDL-1 или PDL-2.
58. Способ по п. 57, где низкомолекулярный ингибитор передачи сигналов посредством PD-1, PDL-1 или PDL-2 предусматривает одно или несколько из: N-{2-[(2-метокси-6-[(2-метил[1,1'-бифенил]-3-ил)метокси]пиридин-3-

ил}метил)амино]этил}ацетамида (BMS 202); (2-((3-цианобензил)окси)-4-((3-(2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-ил)-2-метилбензил)окси)-5-метилбензил)-D-серина гидрохлорида; (2R,4R)-1-(5-хлор-2-((3-цианобензил)окси)-4-((3-(2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-ил)-2-метилбензил)окси)бензил)-4-гидроксипирролидин-2-карбоновой кислоты; 3-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-1-фенилиндола; 3-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-1-фенил-1H-индола; L- α -глутамин, N2, N6-бис(L-серил-L-аспарагинил-L-треонил-L-серил-L- α -глутамил-L-серил-L-фенилаланил)-L-лизил-L-фенилаланил-L-аргинил-L-валил-L-треонил-L-глутаминил-L-лейцил-L-аланил-L-пролил-L-лизил-L-аланил-L-глутаминил-L-изолейцил-L-лизила; (2S)-1-[[2,6-диметокси-4-[(2-метил[1,1'-бифенил]-3-ил)метокси]фенил]метил]-2-пиперидинкарбоновой кислоты; глицинамид, N-(2-меркаптоацетил)-L-фенилаланил-N-метил-L-аланил-L-аспарагинил-L-пролил-L-гистидил-L-лейцил-N-метилглицил-L-триптофил-L-серил-L-триптофил-N-метил-L-норлейцил-N-метил-L-норлейцил-L-аргинил-L-цистеинил-, циклического(1 \rightarrow 14)-тиоэфира или их производного или аналога.

59. Способ лечения индивидуума, страдающего от рака, предусматривающий введение индивидууму, страдающему от рака, эффективного количества комбинации:

- a) антитела, которое специфически связывает лейкоз-ингибирующий фактор (LIF), содержащего:
 - i. вариабельную область тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 42; и
 - ii. вариабельную область легкой цепи (VL) иммуноглобулина, на по меньшей мере приблизительно 90% идентичную аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46; и
- b) ингибитора передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2.

60. Способ по п. 59, где последовательность VH идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 42; и последовательность VL идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46.

61. Способ по п. 59 или п. 60, где антитело, связывающее LIF, и ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводят индивидууму в отдельных составах.

62. Способ по п. 59 или п. 60, где антитело, связывающее LIF, и ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводят индивидууму в одном и том же составе.

63. Способ по любому из пп. 59-61, где антитело, связывающее LIF, вводят индивидууму до введения индивидууму ингибитора передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2.
64. Способ по любому из пп. 59-61, где ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводят индивидууму до введения индивидууму антитела, связывающего LIF.
65. Способ по любому из пп. 59-61, где ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 вводят индивидууму одновременно с введением индивидууму антитела, связывающего LIF.
66. Способ по любому из пп. 59-65, где антитело, связывающее LIF, является гуманизированным.
67. Способ по любому из пп. 59-66, где рак включает распространенную солидную опухоль, глиобластому, рак желудка, рак кожи, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, протоковую аденокарциному поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичка, рак щитовидной железы, рак головы и шеи, рак печени, рак почки, рак пищевода, рак яичника, рак толстой кишки, рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, лимфому, рак мягких тканей или любую их комбинацию.
68. Способ по п. 67, где рак включает немелкоклеточный рак легкого.
69. Способ по п. 67, где рак включает протоковую аденокарциному поджелудочной железы.
70. Способ по любому из пп. 59-69, где ранее проведенное лечение рака с помощью ингибитора контрольных точек иммунного ответа было неэффективным.
71. Способ по любому из пп. 59-69, где ранее проведенное лечение рака с помощью антитела, связывающего LIF, было неэффективным.
72. Способ по п. 70 или п. 71, где ингибитор контрольных точек иммунного ответа представляет собой ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2.
73. Способ по любому из пп. 59-72, где ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 представляет собой антитело или его фрагмент, которые связываются с PD-1.
74. Способ по п. 73, где антитело предусматривает пембролизумаб, ниволумаб, AMP-514, тислелизумаб, спартализумаб или их фрагмент, связывающий PD-1.
75. Способ по п. 73, где антитело специфически связывает PDL-1 или PDL-2.
76. Способ по п. 75, где антитело предусматривает дурвалумаб, атезолизумаб, авелумаб, BMS-936559 или FAZ053 или их фрагмент, связывающий PDL-1 или PDL-2.
77. Способ по любому из пп. 59-72, где ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 предусматривает Fc-слитый белок, который связывает PD-1, PDL-1 или PDL-2.

78. Способ по п. 77, где Fc-слитый белок предусматривает AMP-224 или его фрагмент, связывающий PD-1.
79. Способ по любому из пп. 59-72, где ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 предусматривает низкомолекулярный ингибитор PD-1, PDL-1 или PDL-2.
80. Способ по п. 79, где низкомолекулярный ингибитор передачи сигналов посредством PD-1, PDL-1 или PDL-2 предусматривает одно или несколько из: N-{2-[(2-метокси-6-[(2-метил[1,1'-бифенил]-3-ил)метокси]пиридин-3-ил)метил]амино}этил}ацетамида (BMS 202); (2-((3-цианобензил)окси)-4-((3-(2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-ил)-2-метилбензил)окси)-5-метилбензил)-D-серина гидрохлорида; (2R,4R)-1-(5-хлор-2-((3-цианобензил)окси)-4-((3-(2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-ил)-2-метилбензил)окси)бензил)-4-гидроксипирролидин-2-карбоновой кислоты; 3-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-1-фенилиндола; 3-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-1-фенил-1H-индола; L- α -глутамин,N2,N6-бис(L-серил-L-аспарагинил-L-треонил-L-серил-L- α -глутамил-L-серил-L-фенилаланил)-L-лизил-L-фенилаланил-L-аргинил-L-валил-L-треонил-L-глутаминил-L-лейцил-L-аланил-L-пролил-L-лизил-L-аланил-L-глутаминил-L-изолейцил-L-лизила; (2S)-1-[[2,6-диметокси-4-[(2-метил[1,1'-бифенил]-3-ил)метокси]фенил]метил]-2-пиперидинкарбоновой кислоты; глицинамид,N-(2-меркаптоацетил)-L-фенилаланил-N-метил-L-аланил-L-аспарагинил-L-пролил-L-гистидил-L-лейцил-N-метилглицил-L-триптофил-L-серил-L-триптофил-N-метил-L-норлейцил-N-метил-L-норлейцил-L-аргинил-L-цистеинил-,циклического(1 \rightarrow 14)-тиоэфира или их производного или аналога.
81. Применение по п. 18, где антитело предусматривает пембролизумаб, ниволумаб, AMP-514, тислелизумаб, спартализумаб или их фрагмент, связывающий PD-1.
82. Применение по п. 18, где антитело специфически связывает PDL-1 или PDL-2.
83. Применение по п. 82, где антитело предусматривает дурвалумаб, атезолизумаб, авелумаб, BMS-936559 или FAZ053 или их фрагмент, связывающий PDL-1 или PDL-2.
84. Применение по любому из пп. 1-17, где ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 предусматривает Fc-слитый белок, который связывает PD-1, PDL-1 или PDL-2.
85. Применение по п. 84, где Fc-слитый белок предусматривает AMP-224 или его фрагмент, связывающий PD-1.
86. Применение по любому из пп. 1-17, где ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 предусматривает низкомолекулярный ингибитор PD-1, PDL-1 или PDL-2.
87. Применение по п. 86, где низкомолекулярный ингибитор передачи сигналов посредством PD-1, PDL-1 или PDL-2 предусматривает одно или несколько из: N-{2-[(2-

метокси-6-[(2-метил[1,1'-бифенил]-3-ил)метокси]пиридин-3-ил}метил)амино]этил}ацетамида (BMS 202); (2-((3-цианобензил)окси)-4-((3-(2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-ил)-2-метилбензил)окси)-5-метилбензил)-D-серина гидрохлорида; (2R,4R)-1-(5-хлор-2-((3-цианобензил)окси)-4-((3-(2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-ил)-2-метилбензил)окси)бензил)-4-гидроксипирролидин-2-карбоновой кислоты; 3-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-1-фенилиндола; 3-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-1-фенил-1H-индола; L- α -глутамин,N2,N6-бис(L-серил-L-аспарагинил-L-треонил-L-серил-L- α -глутамил-L-серил-L-фенилаланил)-L-лизил-L-фенилаланил-L-аргинил-L-валил-L-треонил-L-глутаминил-L-лейцил-L-аланил-L-пролил-L-лизил-L-аланил-L-глутаминил-L-изолейцил-L-лизила; (2S)-1-[[2,6-диметокси-4-[(2-метил[1,1'-бифенил]-3-ил)метокси]фенил]метил]-2-пиперидинкарбоновой кислоты; глицинамид,N-(2-меркаптоацетил)-L-фенилаланил-N-метил-L-аланил-L-аспарагинил-L-пролил-L-гистидил-L-лейцил-N-метилглицил-L-триптофил-L-серил-L-триптофил-N-метил-L-норлейцил-N-метил-L-норлейцил-L-аргинил-L-цистеинил-,циклического(1 \rightarrow 14)-тиоэфира или их производного или аналога.

88. Применение по п. 33, где антитело предусматривает пембролизумаб, ниволумаб, AMP-514, тислелизумаб, спартализумаб или их фрагмент, связывающий PD-1.

89. Применение по п. 33, где антитело специфически связывает PDL-1 или PDL-2.

90. Применение по п. 89, где антитело предусматривает дурвалумаб, атезолизумаб, авелумаб, BMS-936559 или FAZ053 или их фрагмент, связывающий PDL-1 или PDL-2.

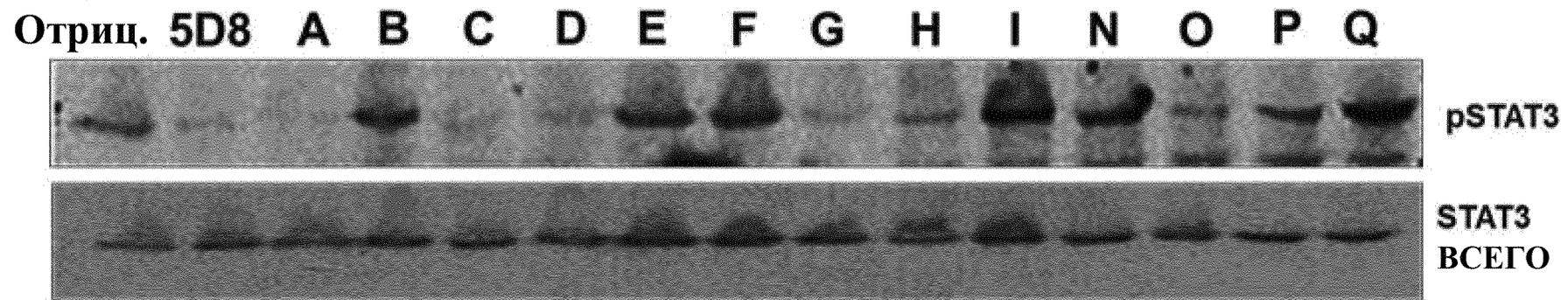
91. Применение по любому из пп. 19-32, где ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 предусматривает Fc-слитый белок, который связывает PD-1, PDL-1 или PDL-2.

92. Применение по п. 91, где Fc-слитый белок предусматривает AMP-224 или его фрагмент, связывающий PD-1.

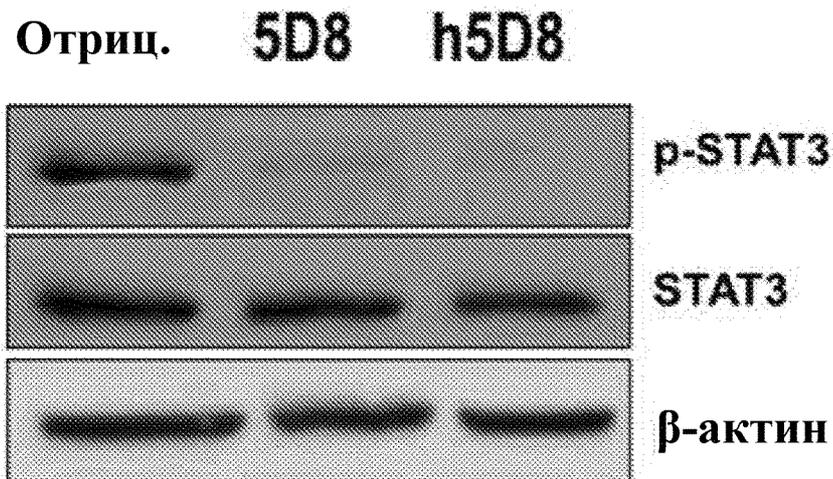
93. Применение по любому из пп. 19-32, где ингибитор передачи сигналов PD-1, PDL-1 или PDL-2 предусматривает низкомолекулярный ингибитор PD-1, PDL-1 или PDL-2.

94. Применение по п. 93, где низкомолекулярный ингибитор передачи сигналов посредством PD-1, PDL-1 или PDL-2 предусматривает одно или несколько из: N-{2-[(2-метокси-6-[(2-метил[1,1'-бифенил]-3-ил)метокси]пиридин-3-ил}метил)амино]этил}ацетамида (BMS 202); (2-((3-цианобензил)окси)-4-((3-(2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-ил)-2-метилбензил)окси)-5-метилбензил)-D-серина гидрохлорида; (2R,4R)-1-(5-хлор-2-((3-цианобензил)окси)-4-((3-(2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-ил)-2-метилбензил)окси)бензил)-4-гидроксипирролидин-

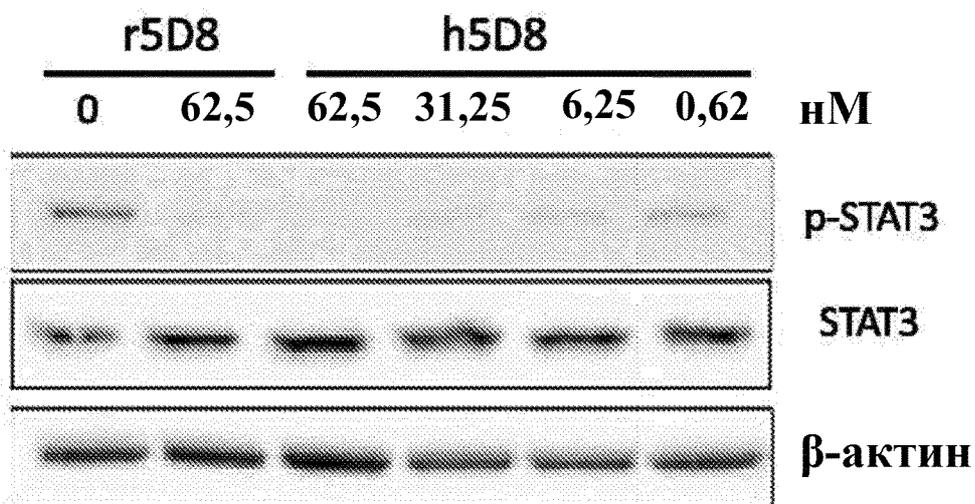
2-карбоновой кислоты; 3-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-1-фенилиндола; 3-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-1-фенил-1H-индола; L- α -глутамин, N2, N6-бис(L-серил-L-аспарагинил-L-треонил-L-серил-L- α -глутамил-L-серил-L-фенилаланил)-L-лизил-L-фенилаланил-L-аргинил-L-валил-L-треонил-L-глутаминил-L-лейцил-L-аланил-L-пролил-L-лизил-L-аланил-L-глутаминил-L-изолейцил-L-лизила; (2S)-1-[[[2,6-диметокси-4-[(2-метил[1,1'-бифенил]-3-ил)метокси]фенил]метил]-2-пиперидинкарбоновой кислоты; глицинамид, N-(2-меркаптоацетил)-L-фенилаланил-N-метил-L-аланил-L-аспарагинил-L-пролил-L-гистидил-L-лейцил-N-метилглицил-L-триптофил-L-серил-L-триптофил-N-метил-L-норлейцил-N-метил-L-норлейцил-L-аргинил-L-цистеинил-, циклического(1 \rightarrow 14)-тиоэфира или их производного или аналога.



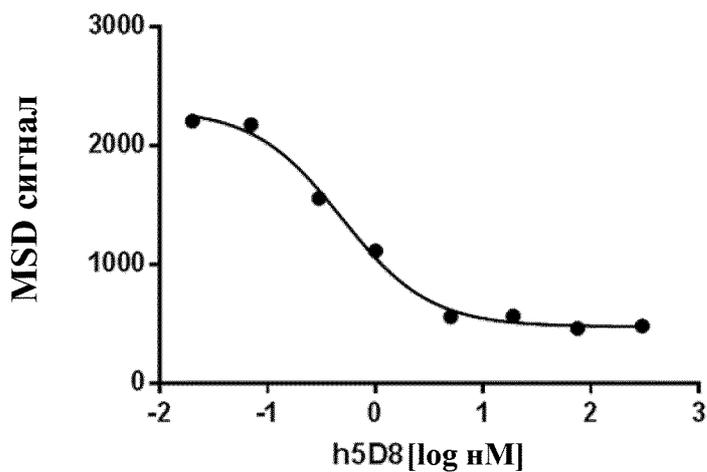
Фиг. 1



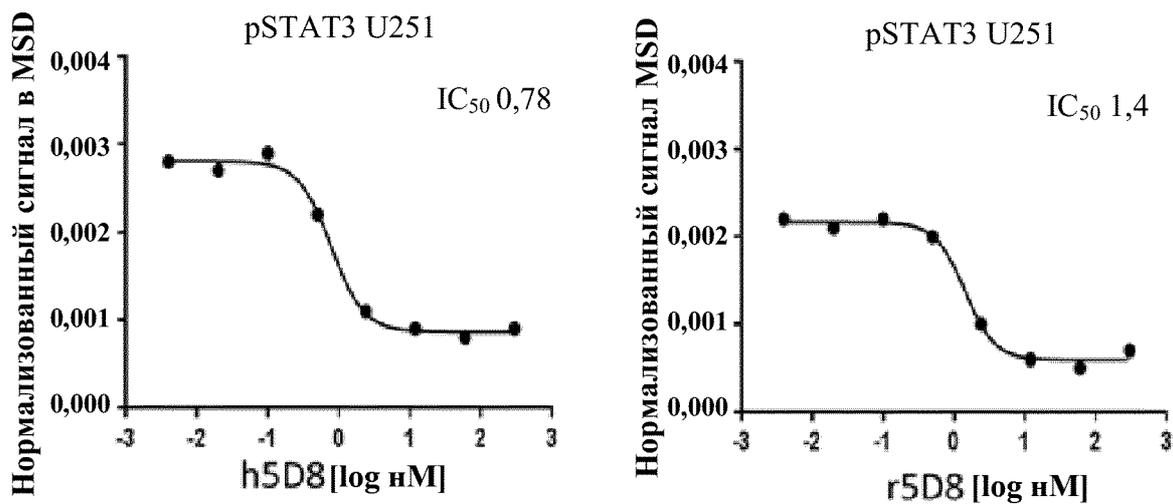
Фиг. 2А



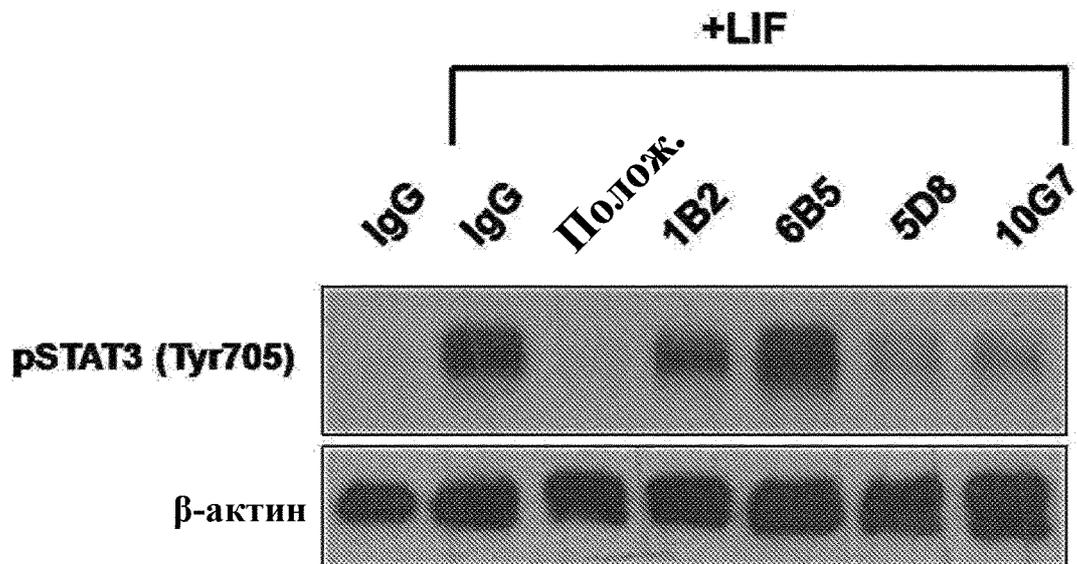
Фиг. 2В



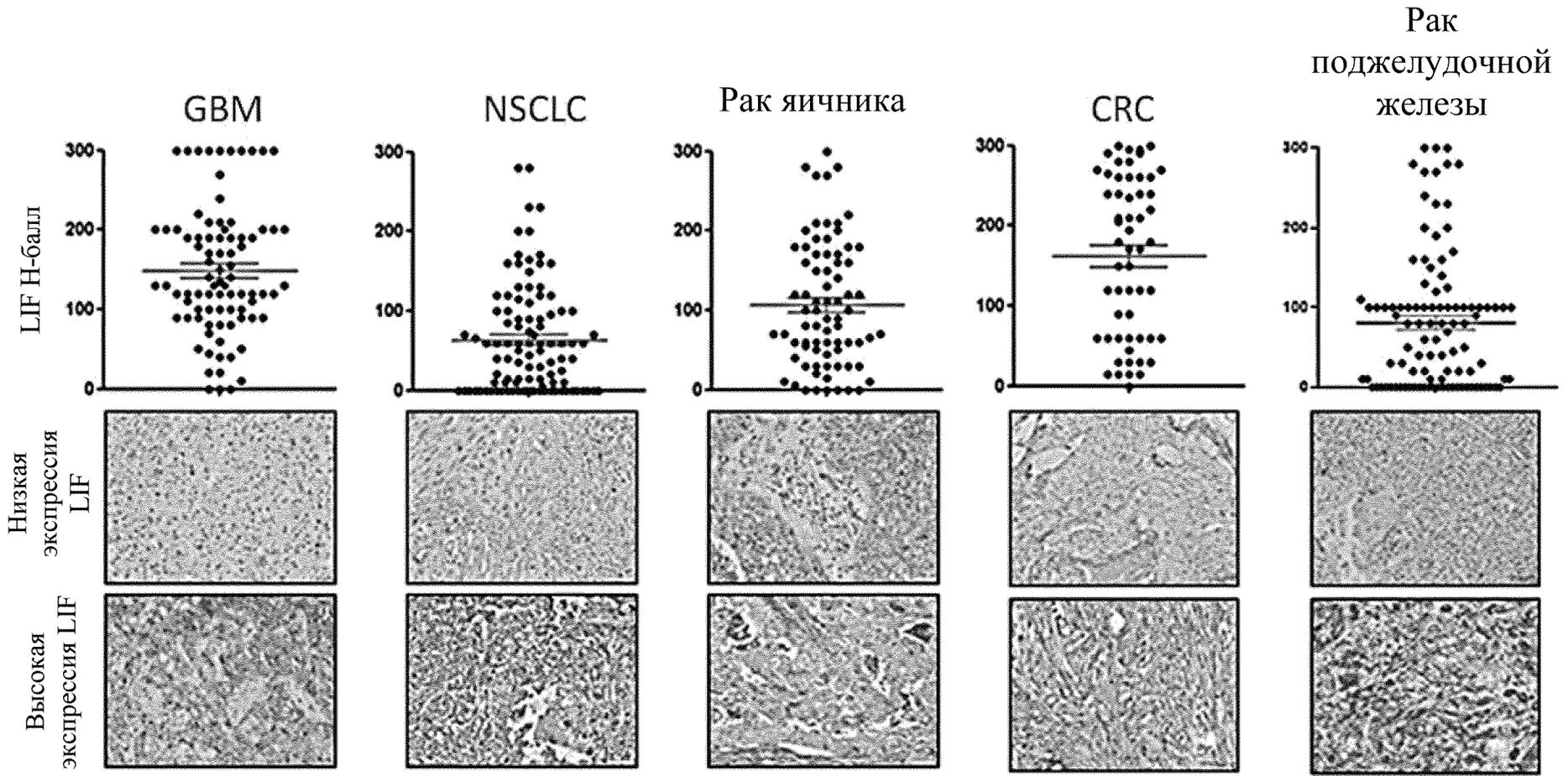
Фиг. 3А



Фиг. 3В

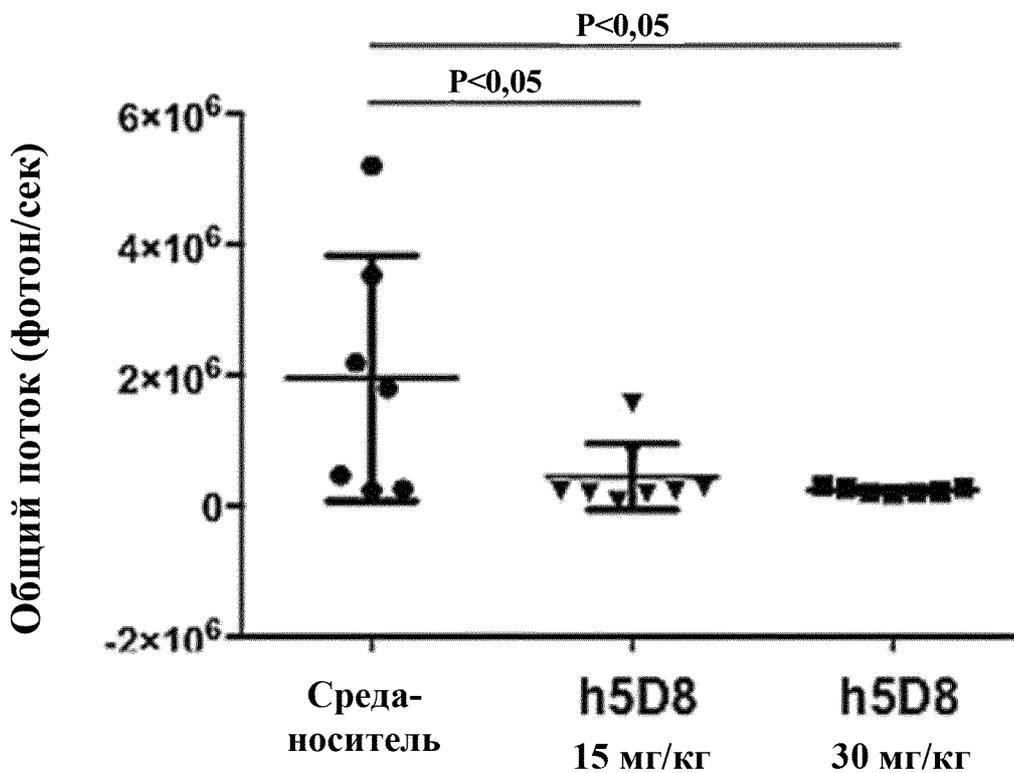


Фиг. 4

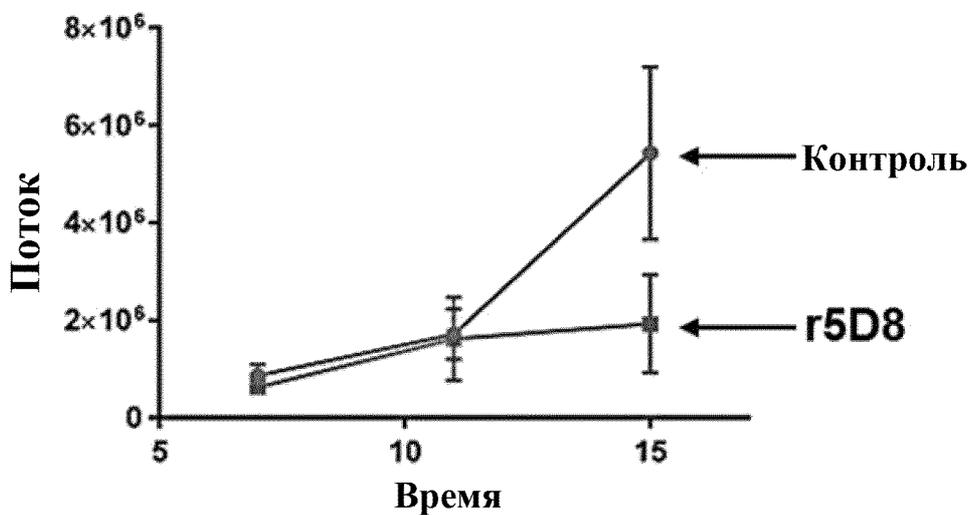


Фиг. 5

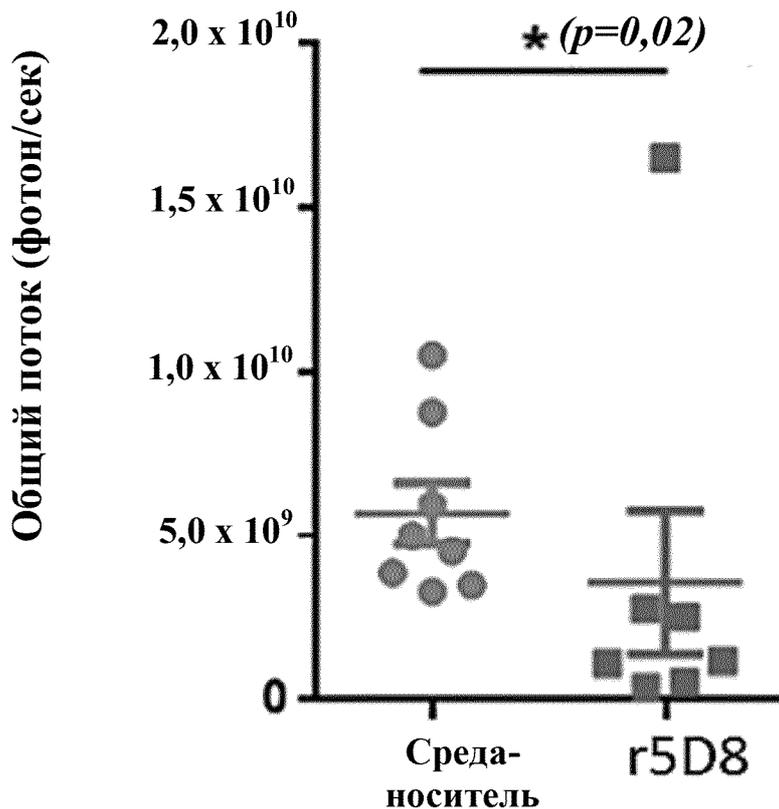
**Объем опухоли
(30 дней после хирургического вмешательства)**



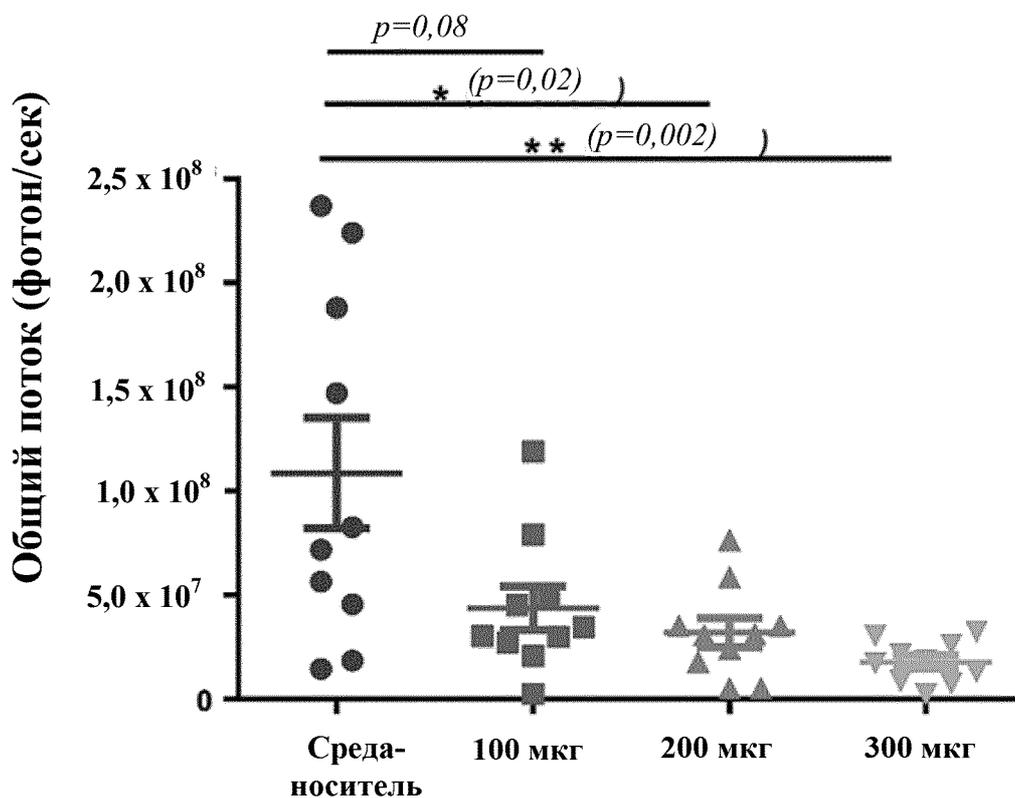
Фиг. 6А



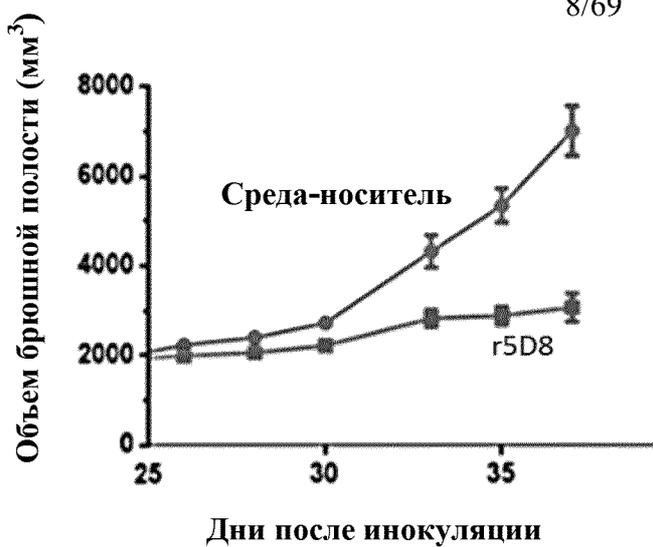
Фиг. 6В



Фиг. 7А

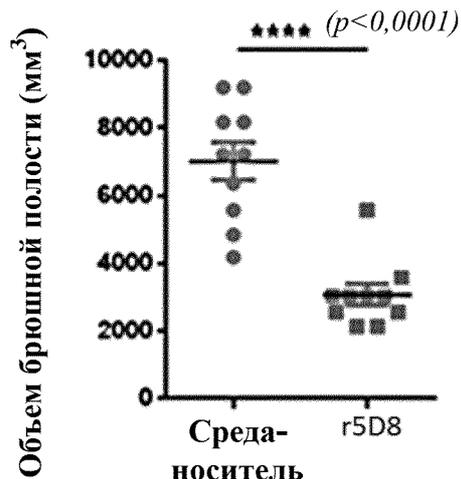


Фиг. 7В

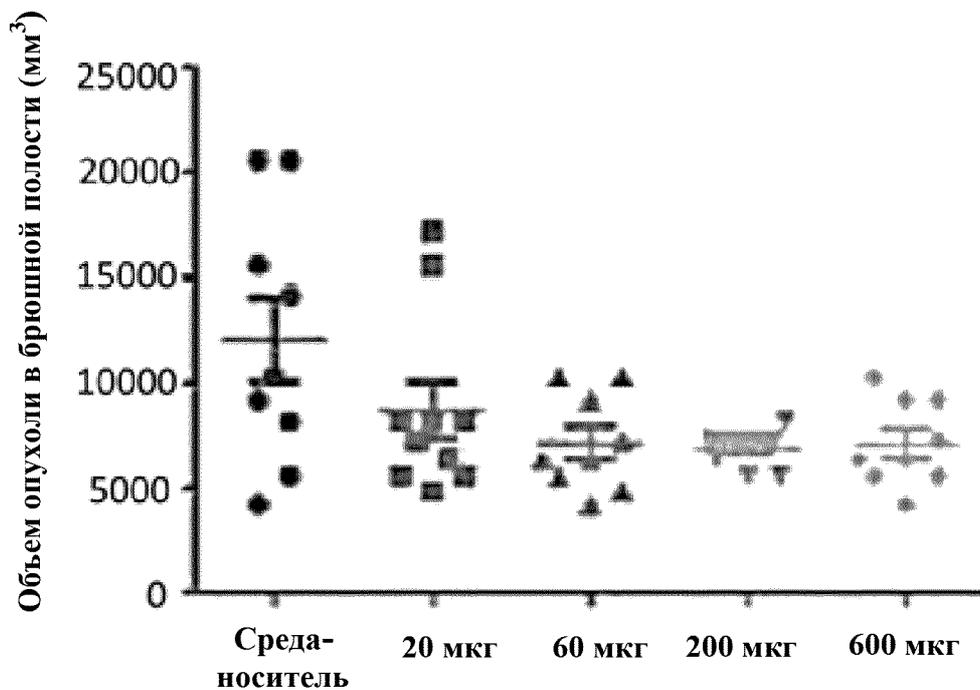


Дни после инокуляции

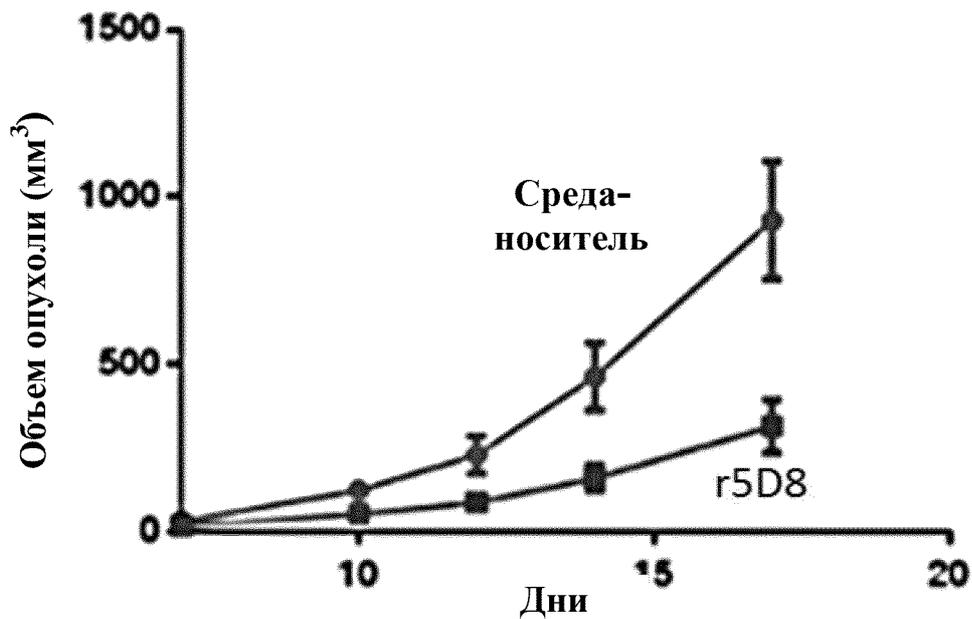
Фиг. 8А



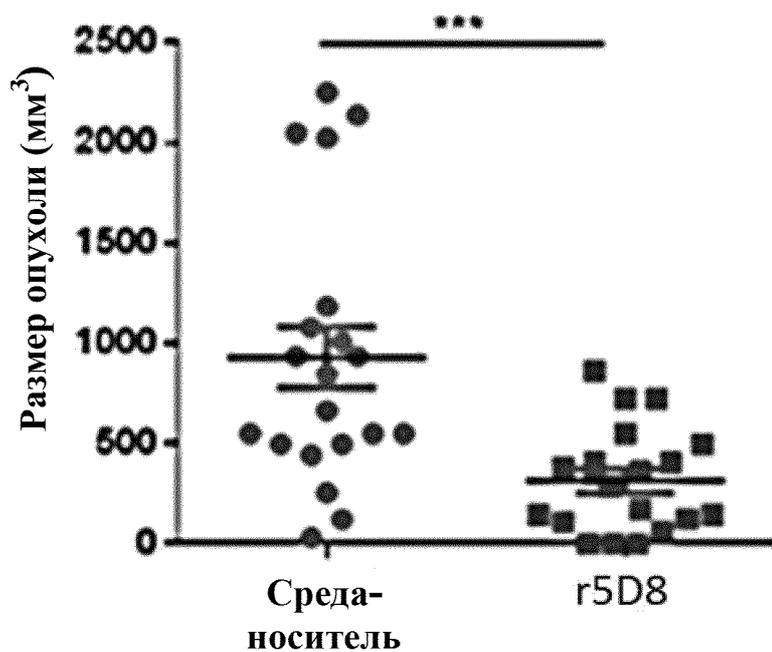
Фиг. 8В



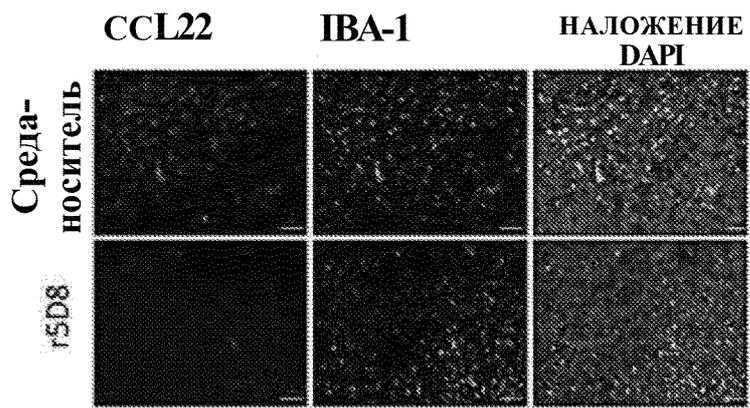
Фиг. 8С



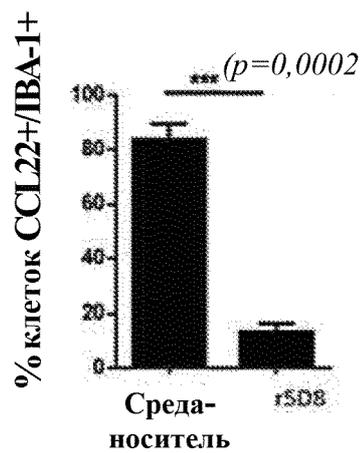
Фиг. 9А

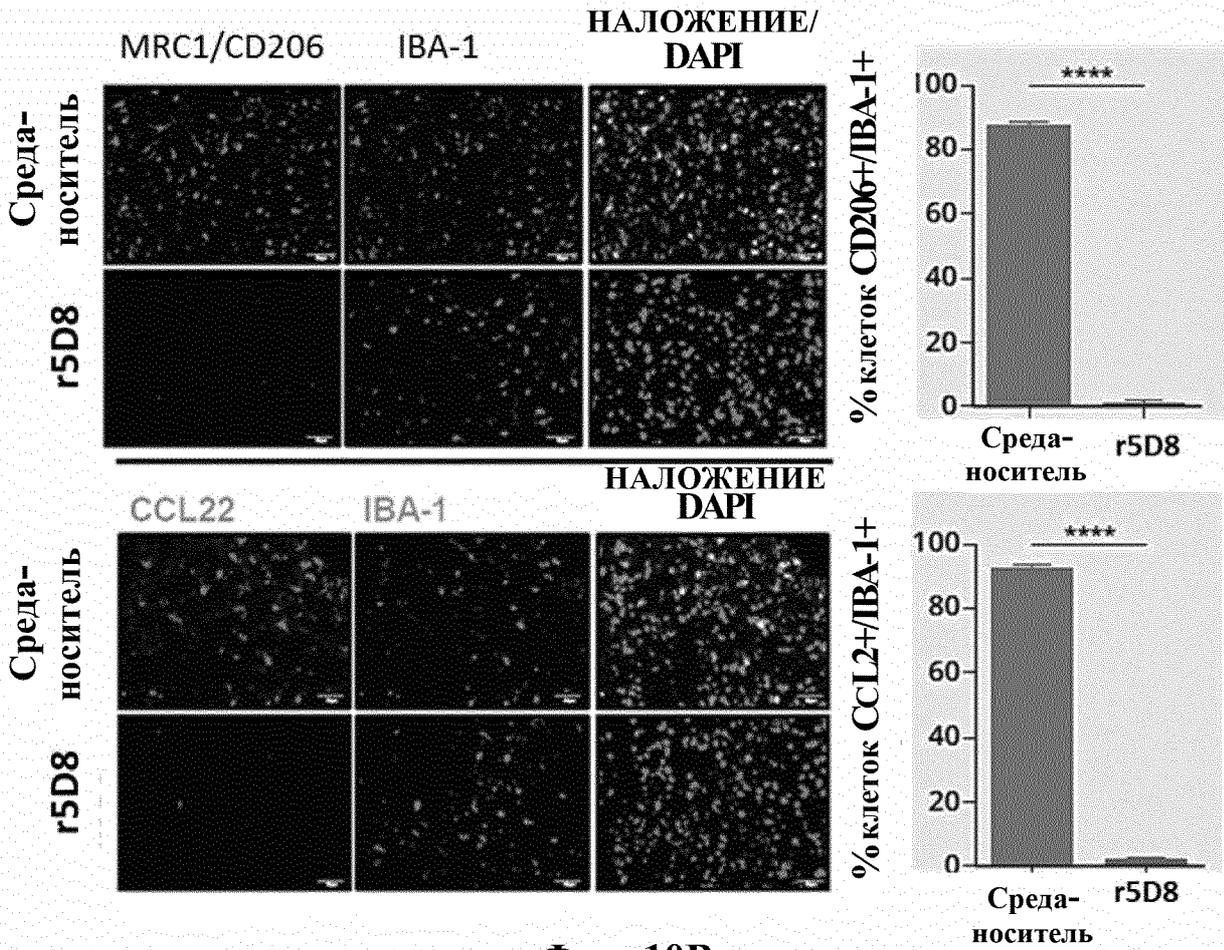


Фиг. 9В

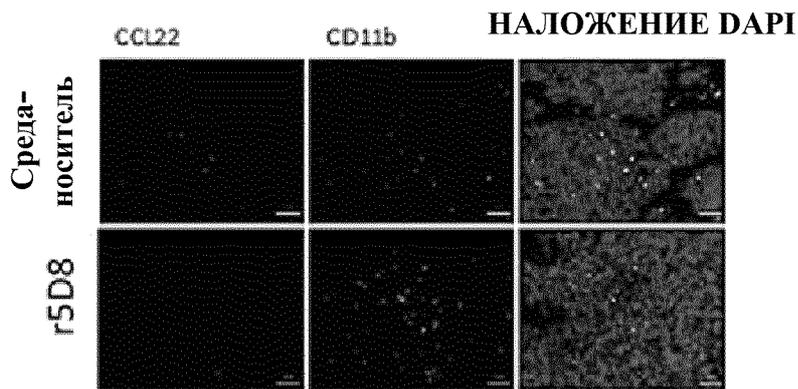


Фиг. 10А

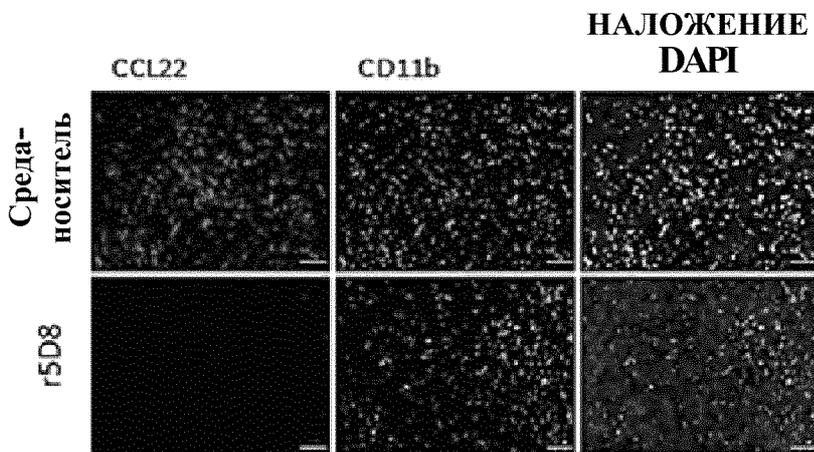
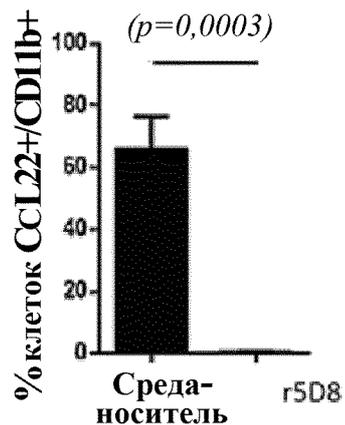




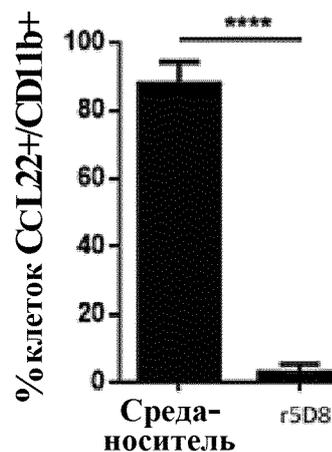
Фиг. 10В

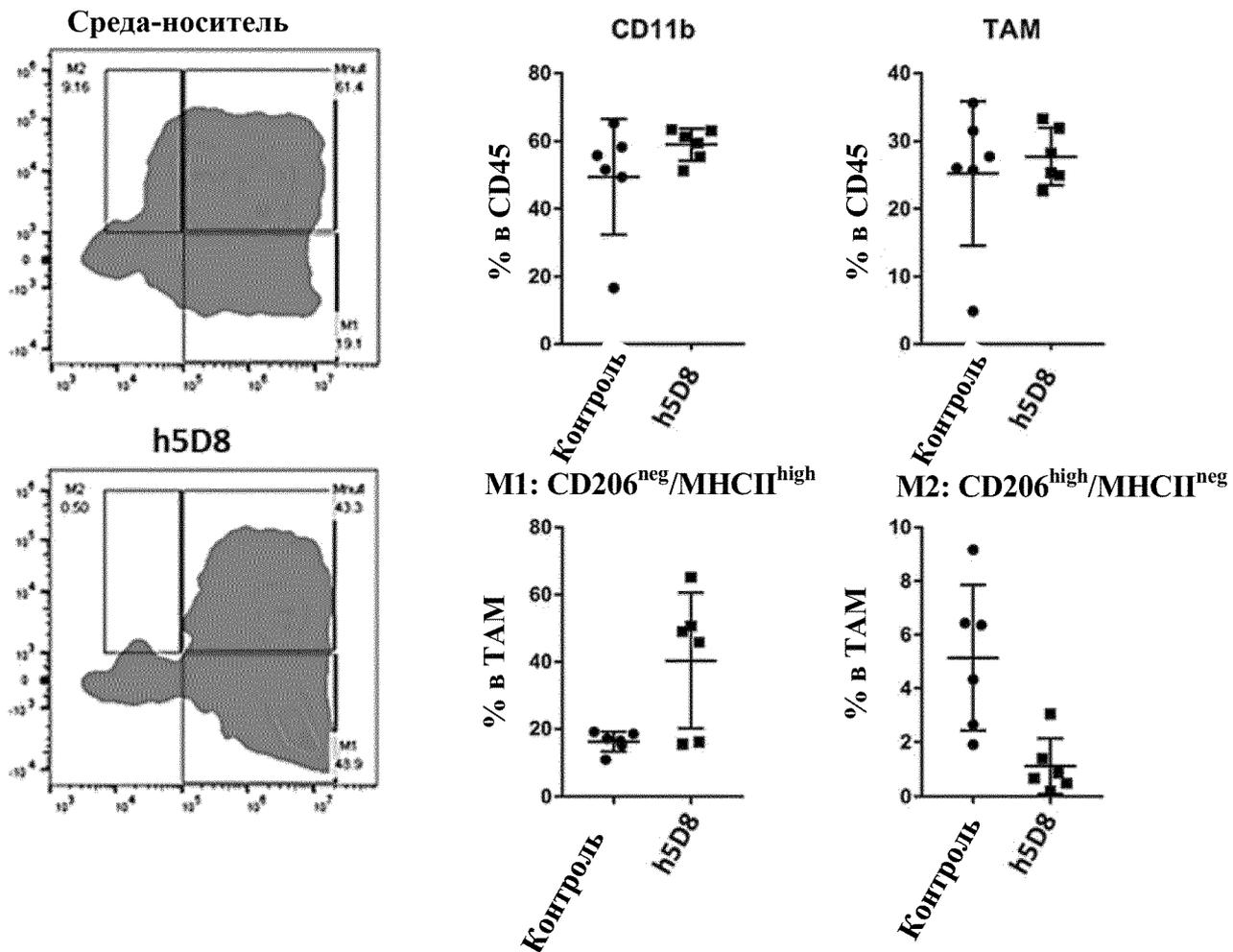


Фиг. 10C



Фиг. 10D

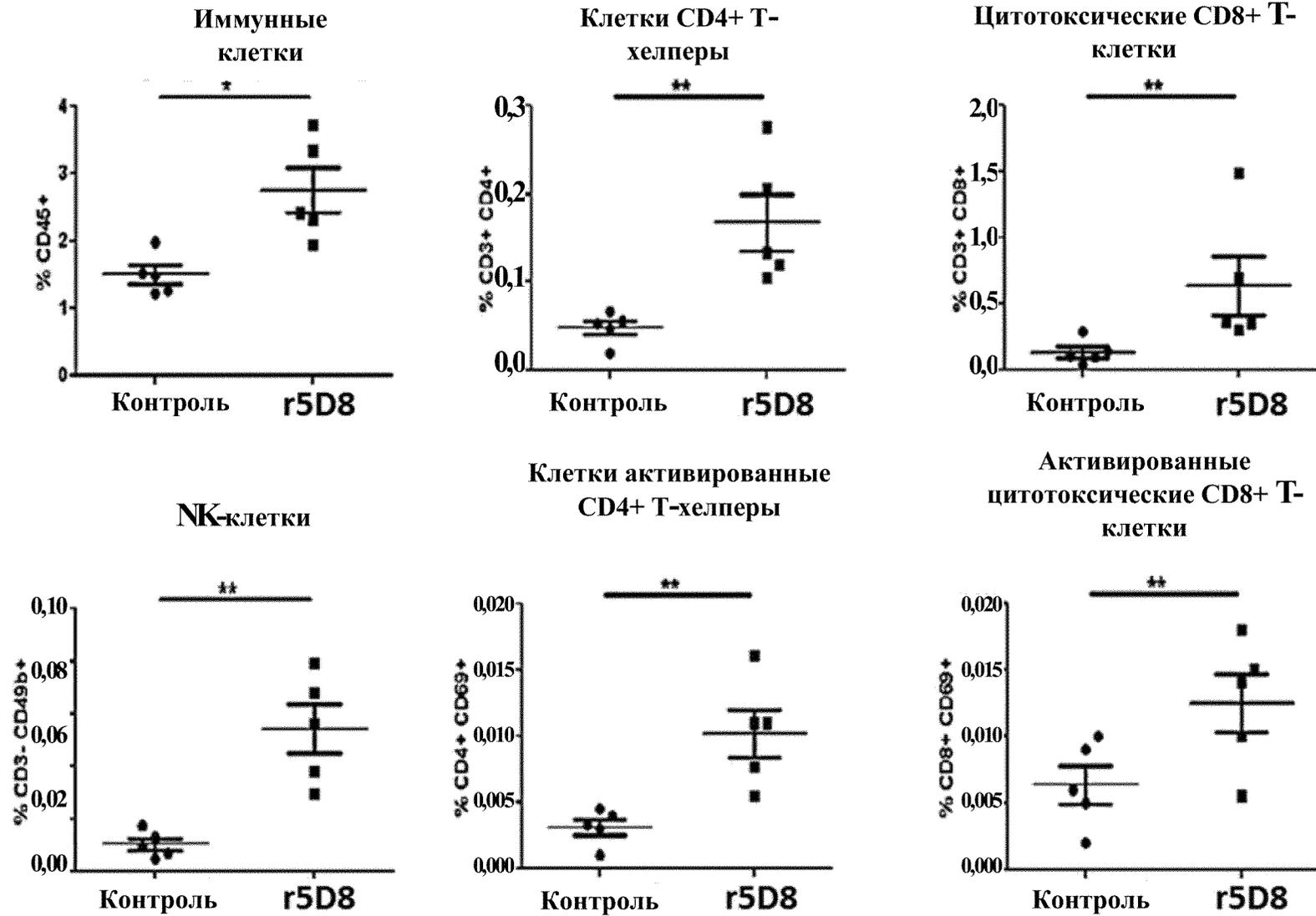




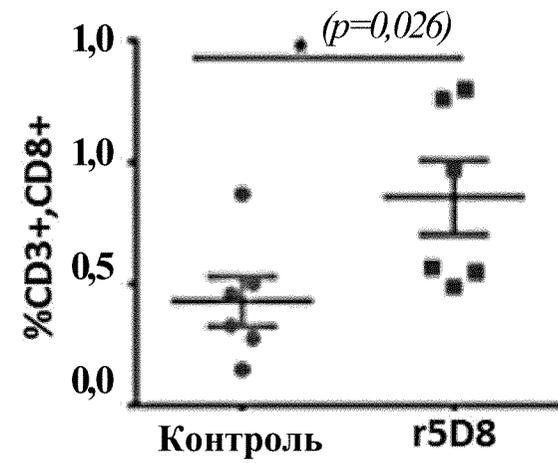
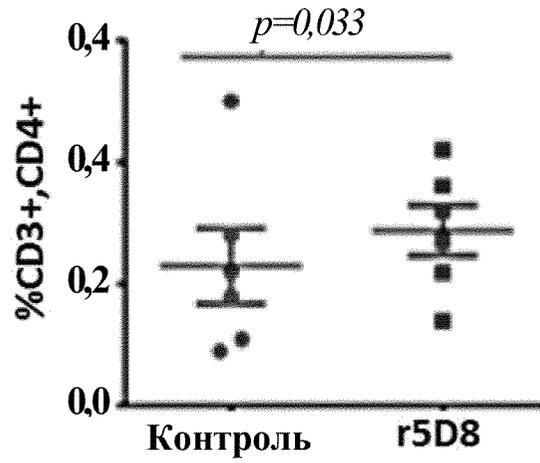
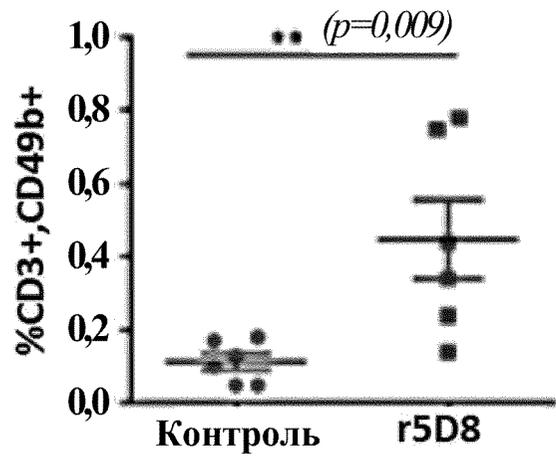
Фиг. 10Е



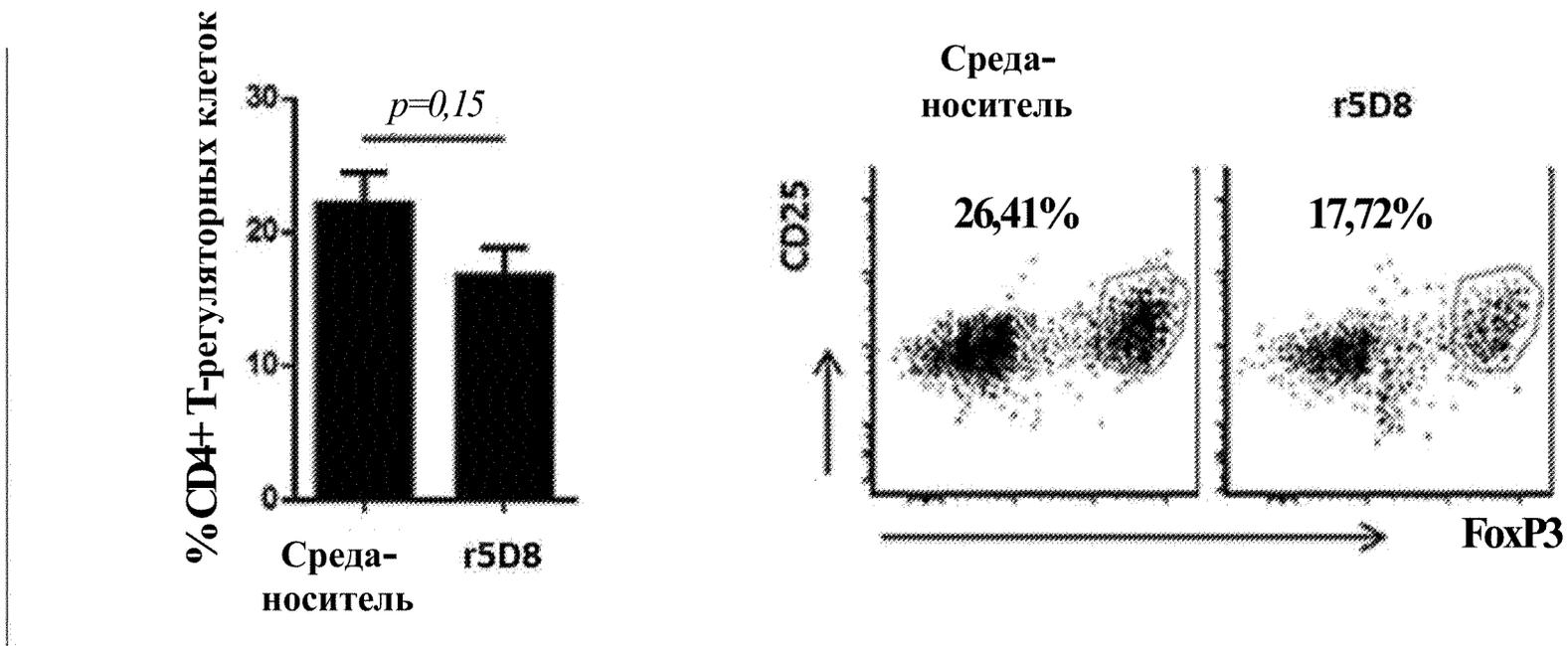
Фиг. 10F



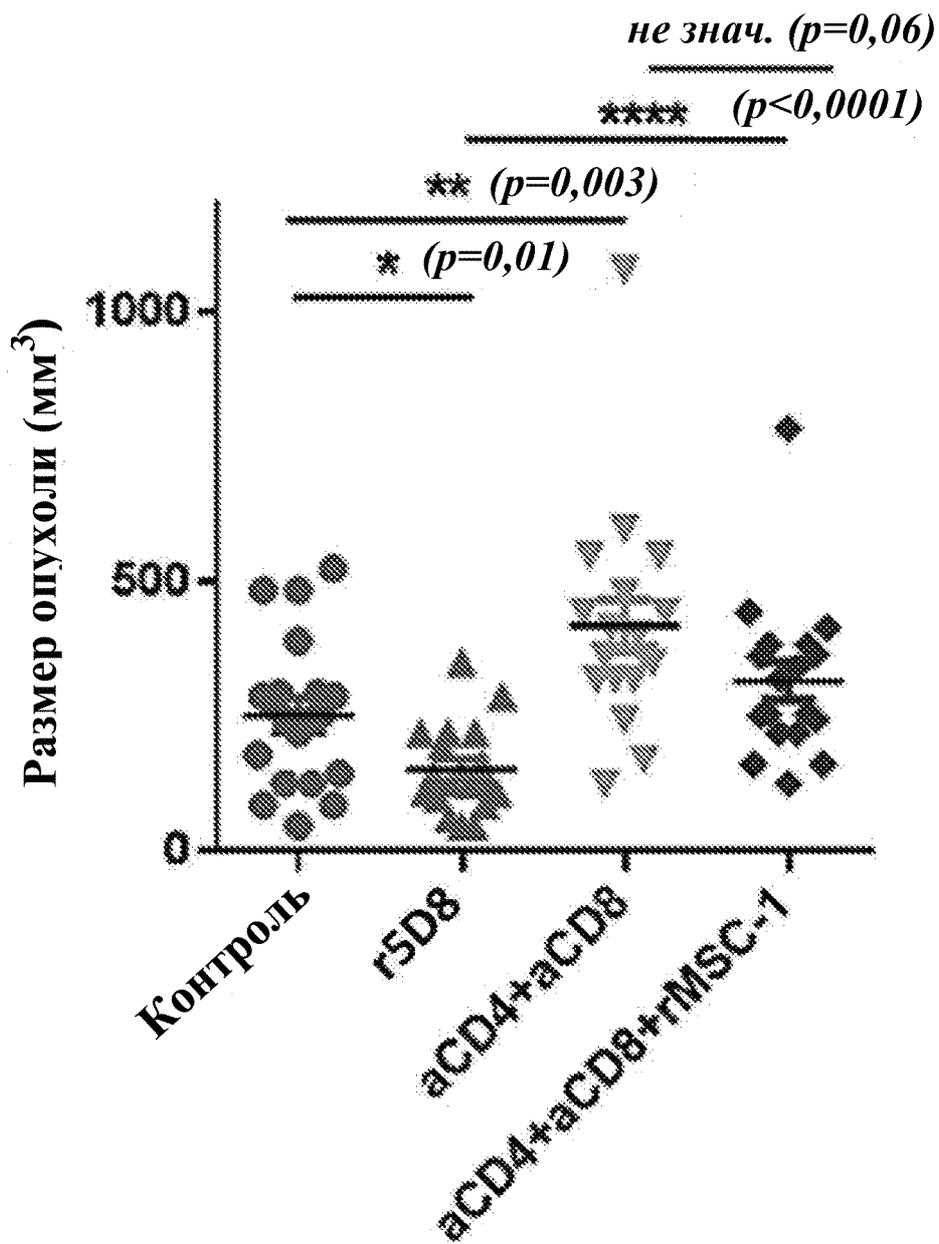
Фиг. 11А



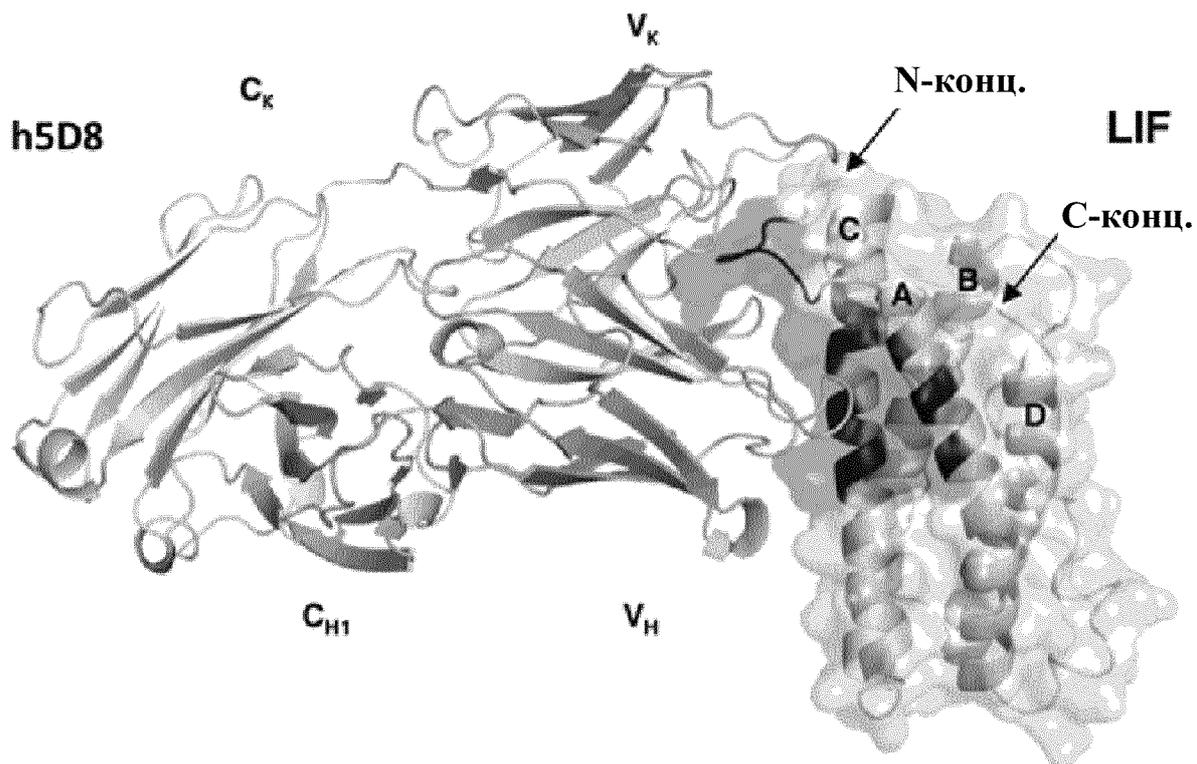
Фиг. 11В



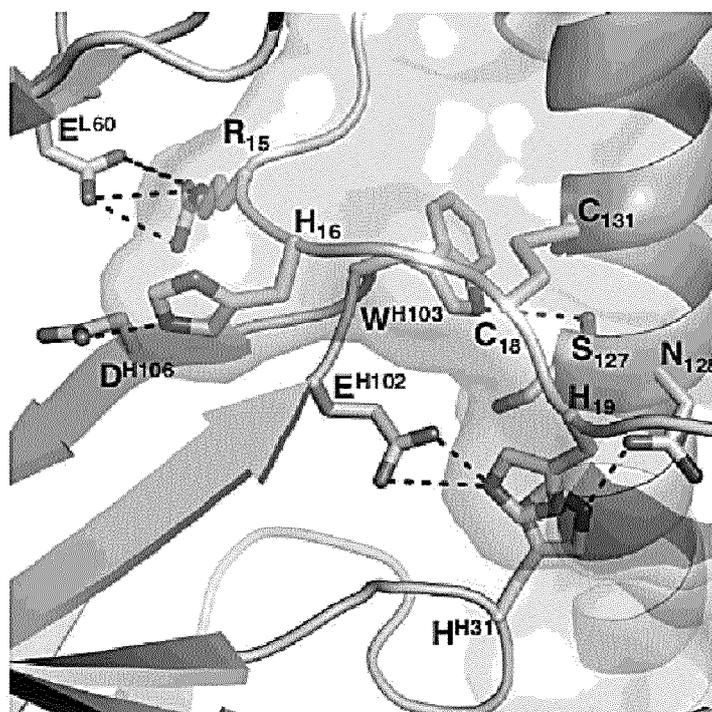
Фиг. 11С



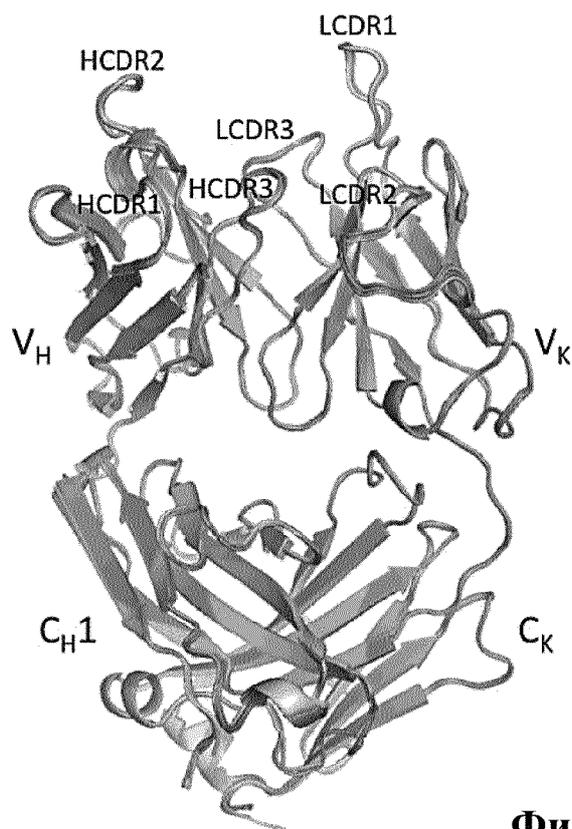
Фиг. 12



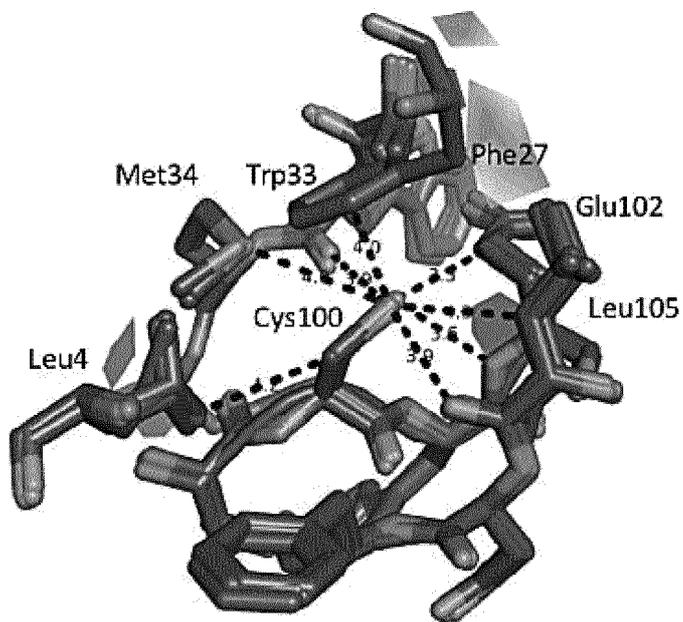
Фиг. 13А



Фиг. 13В

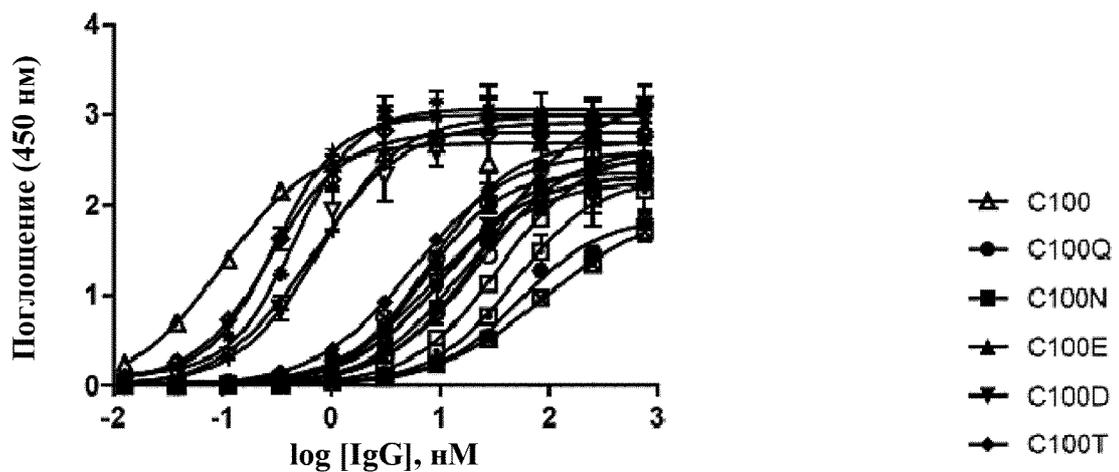


Фиг. 14А



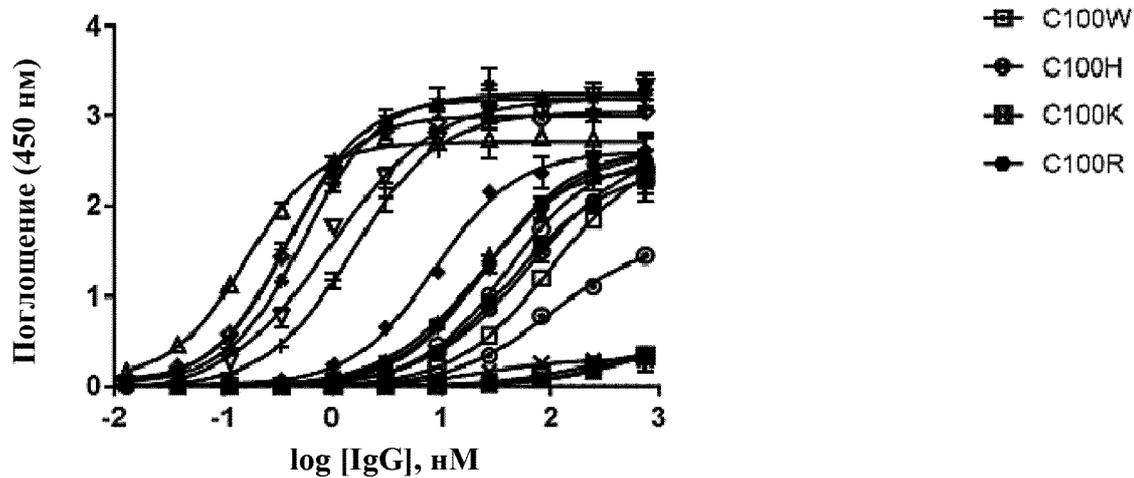
Фиг. 14В

Человеческий LIF

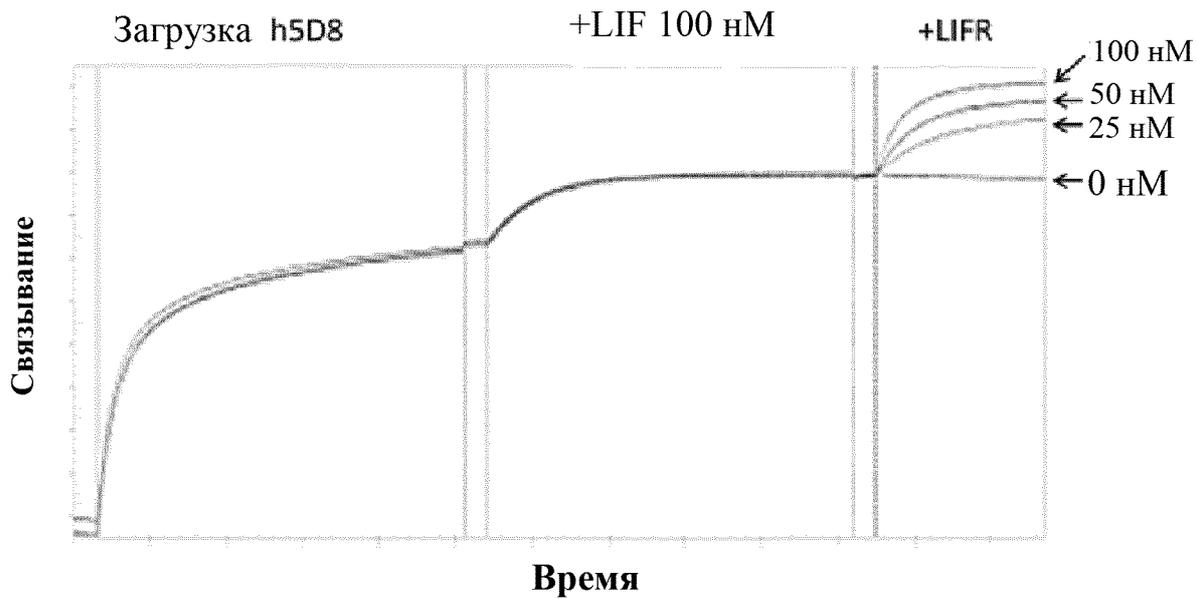


Фиг. 15А

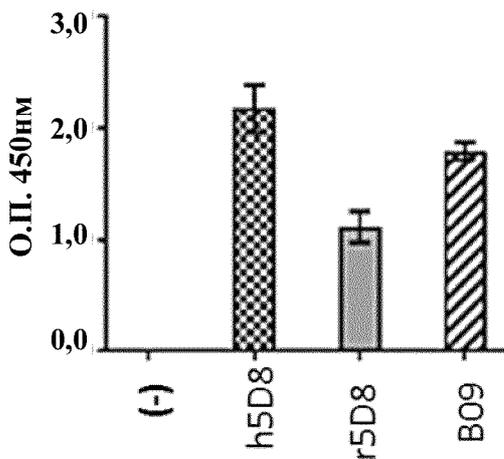
Мышиный LIF



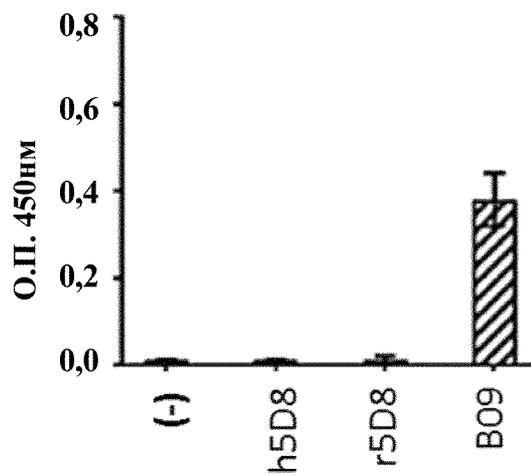
Фиг. 15В



Фиг. 16А

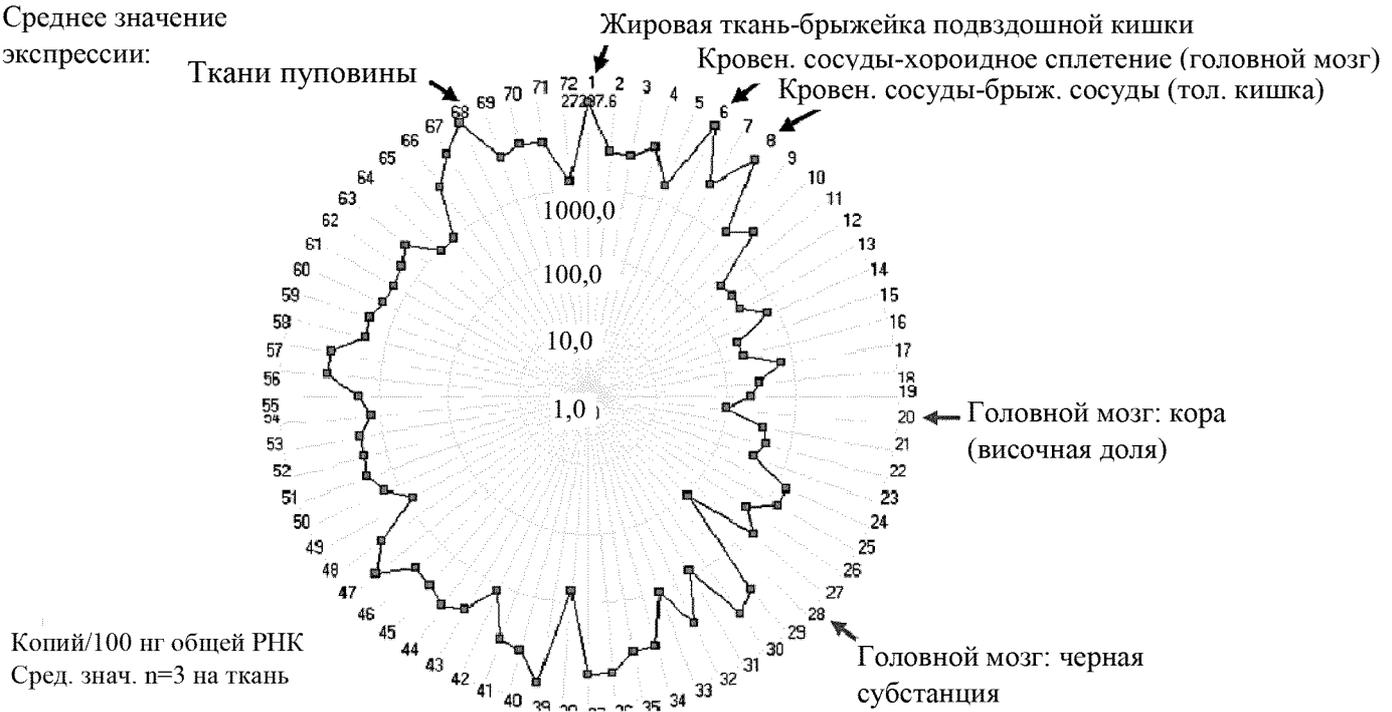


Фиг. 16В

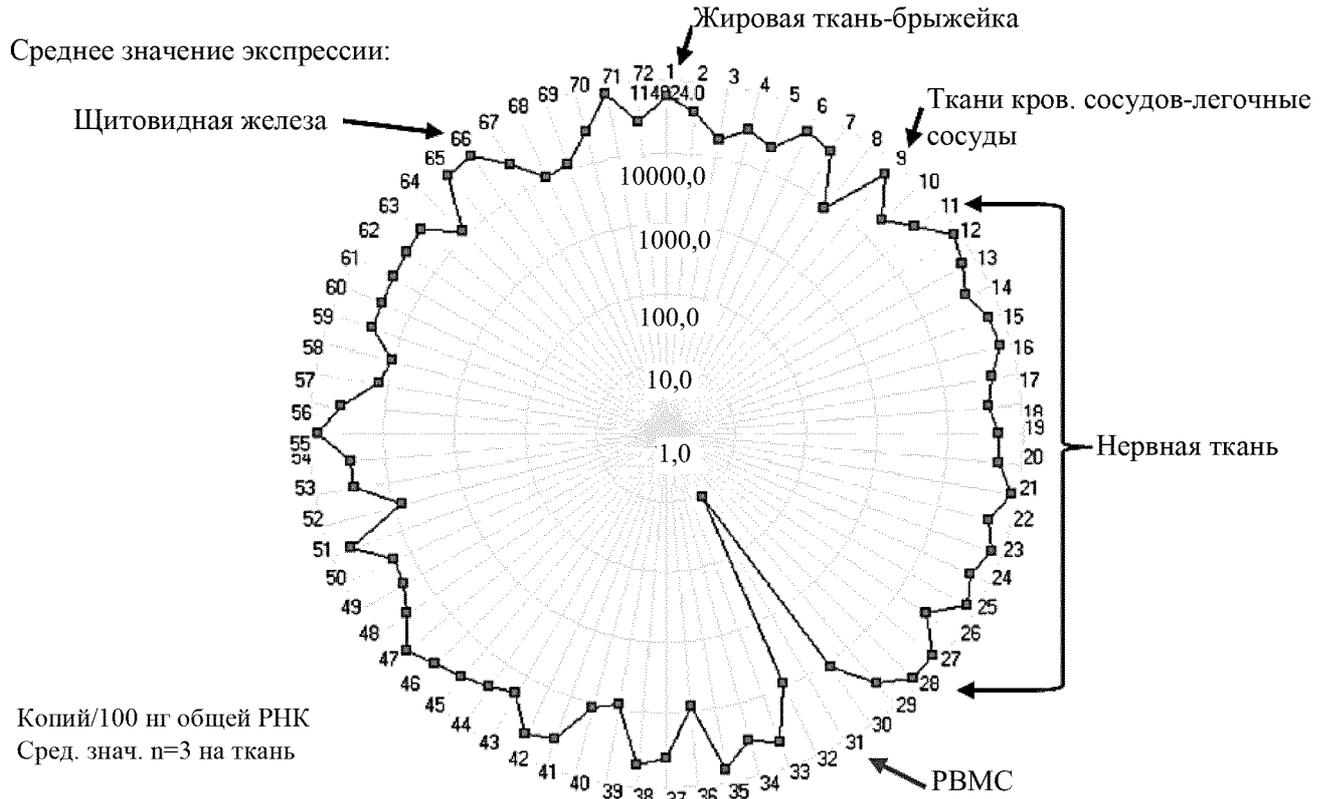


Фиг. 16С

Среднее значение экспрессии:

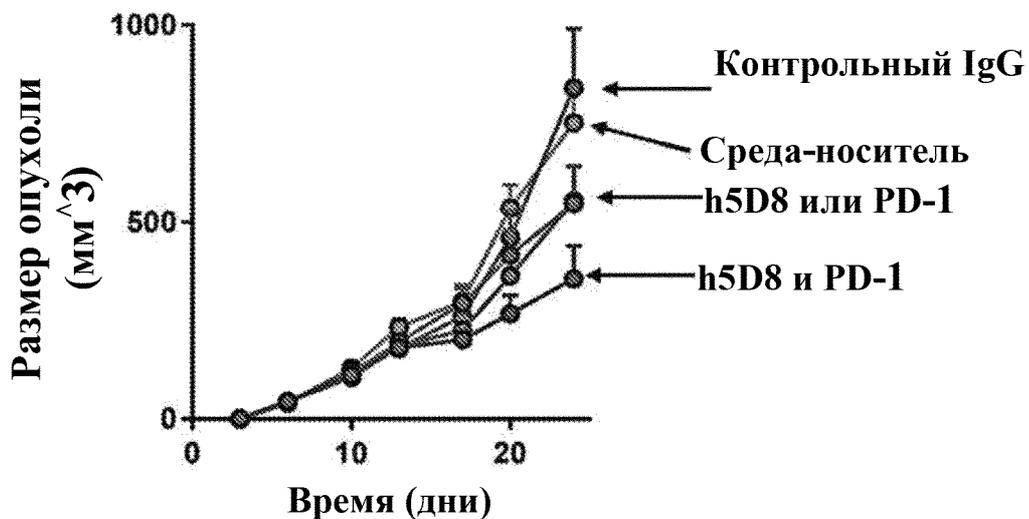


Фиг. 17А



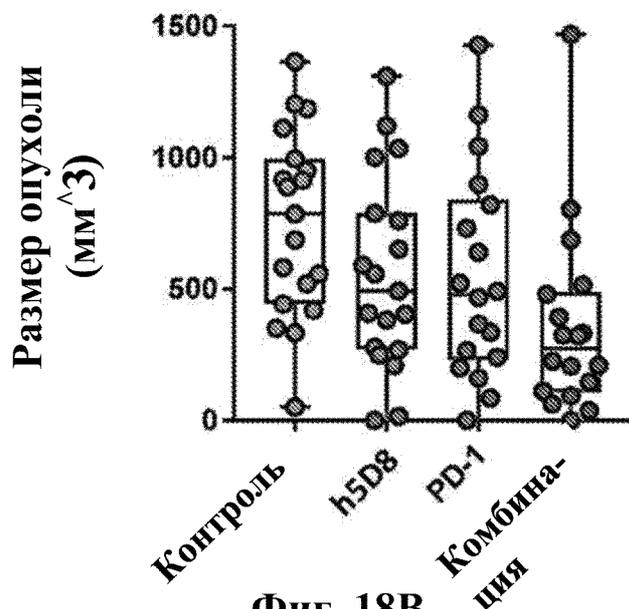
Фиг. 17В

Рост опухоли СТ26

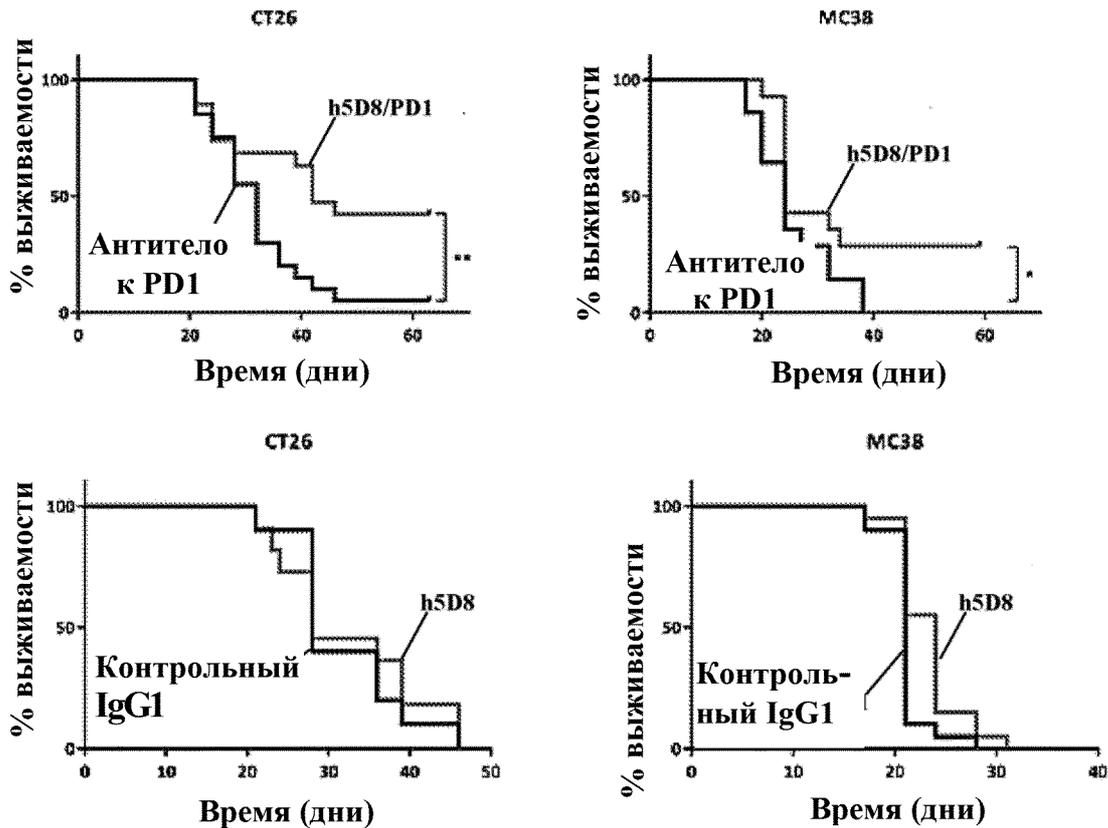


Фиг. 18А

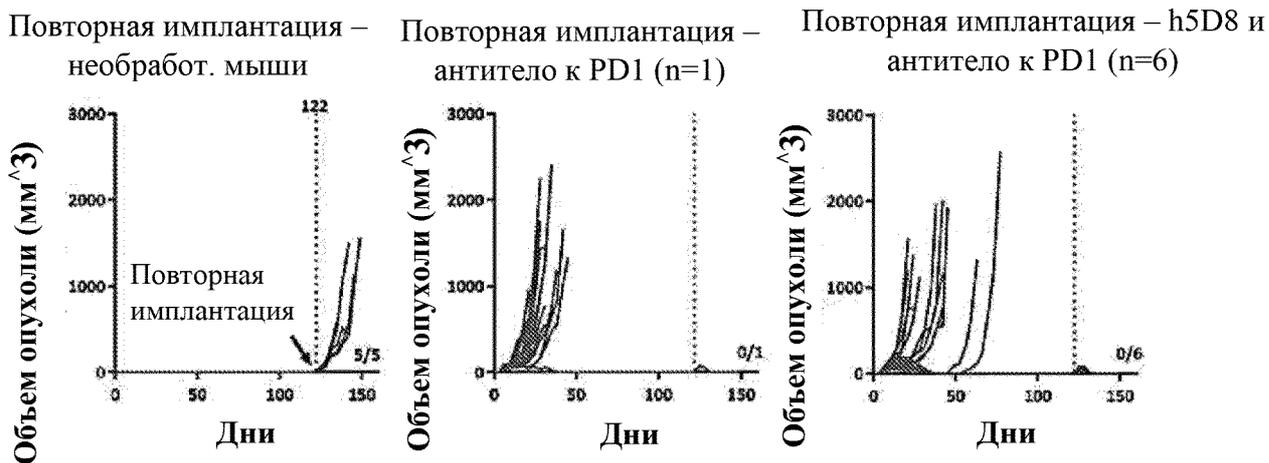
Размеры опухолей СТ26 (t=24)



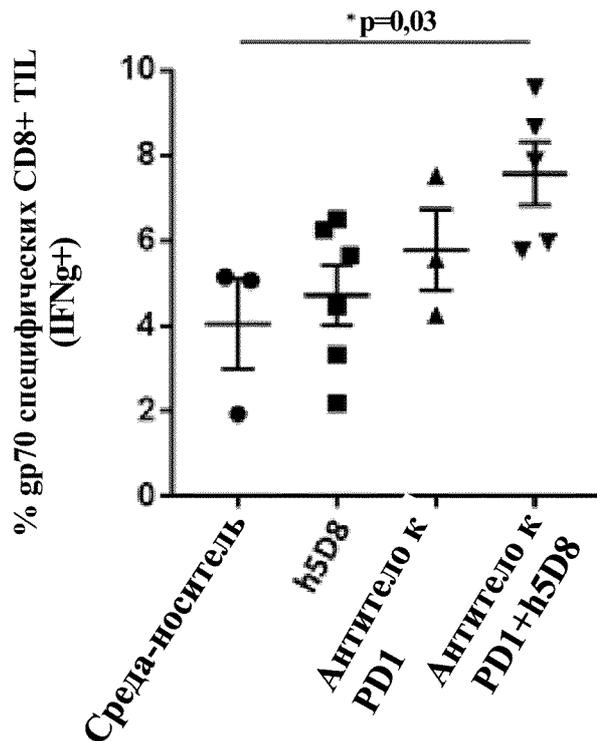
Фиг. 18В



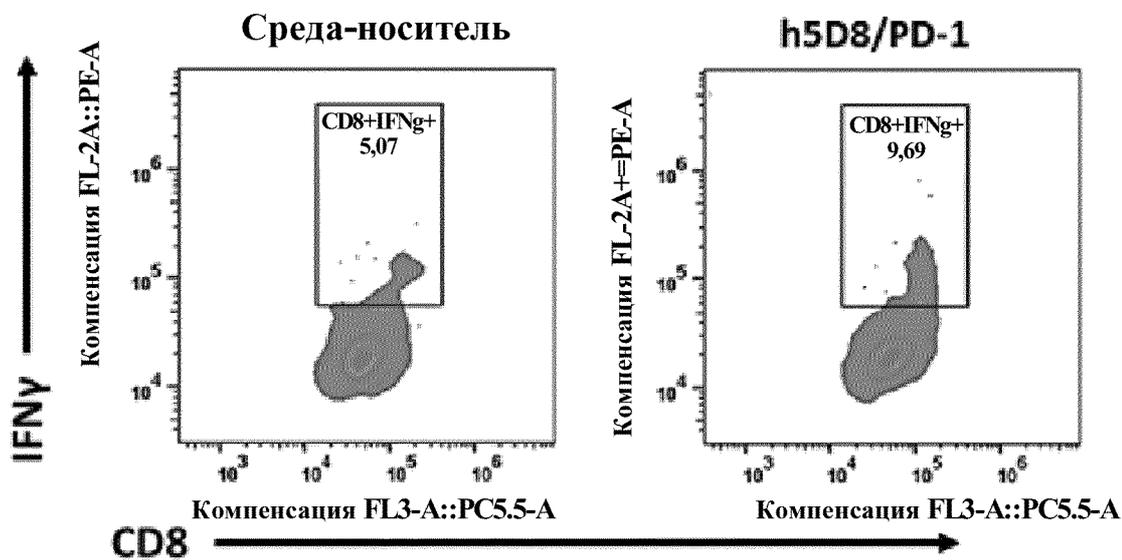
Фиг. 18С



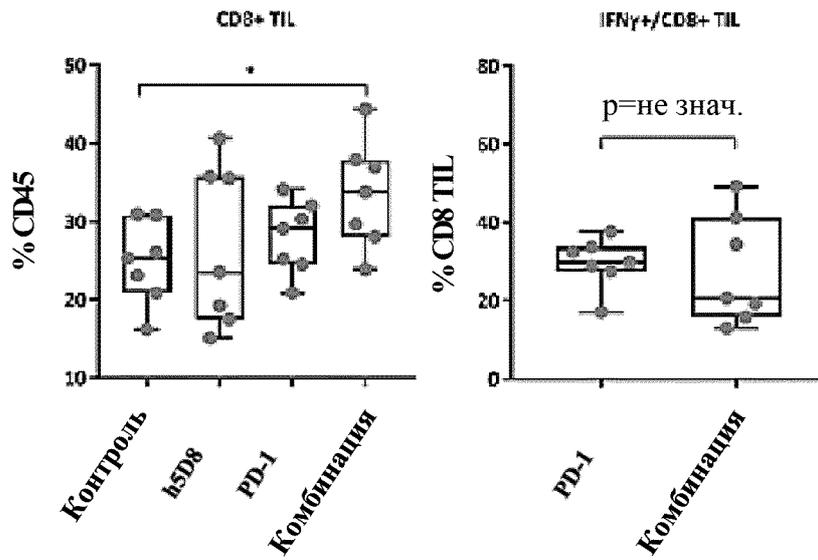
Фиг. 18D



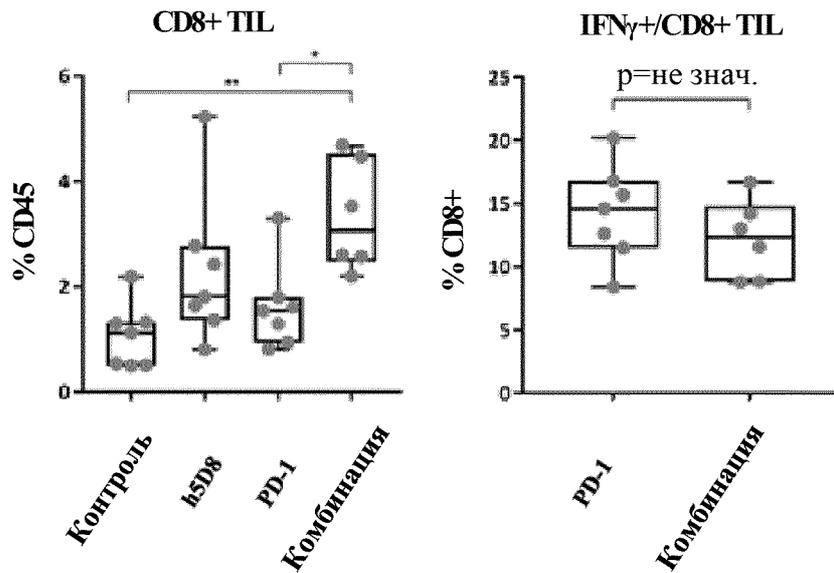
Фиг. 19А



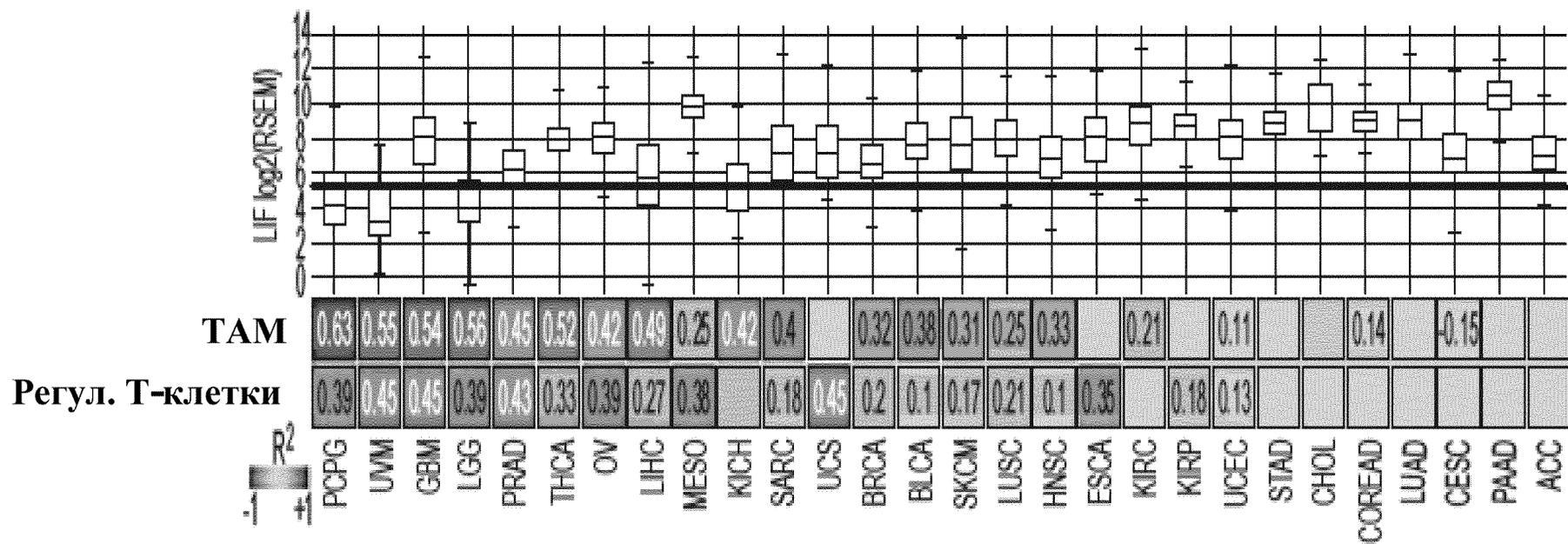
Фиг. 19В



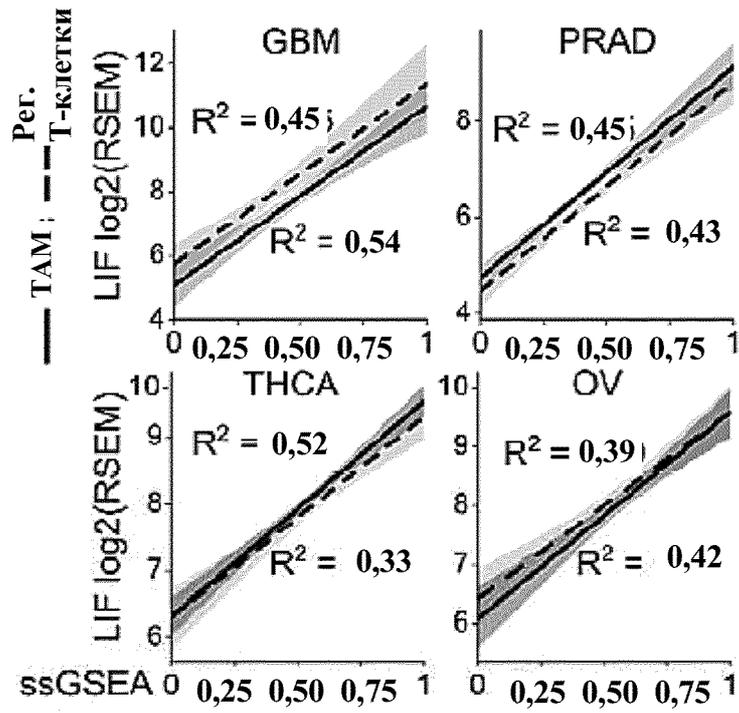
Фиг. 19С



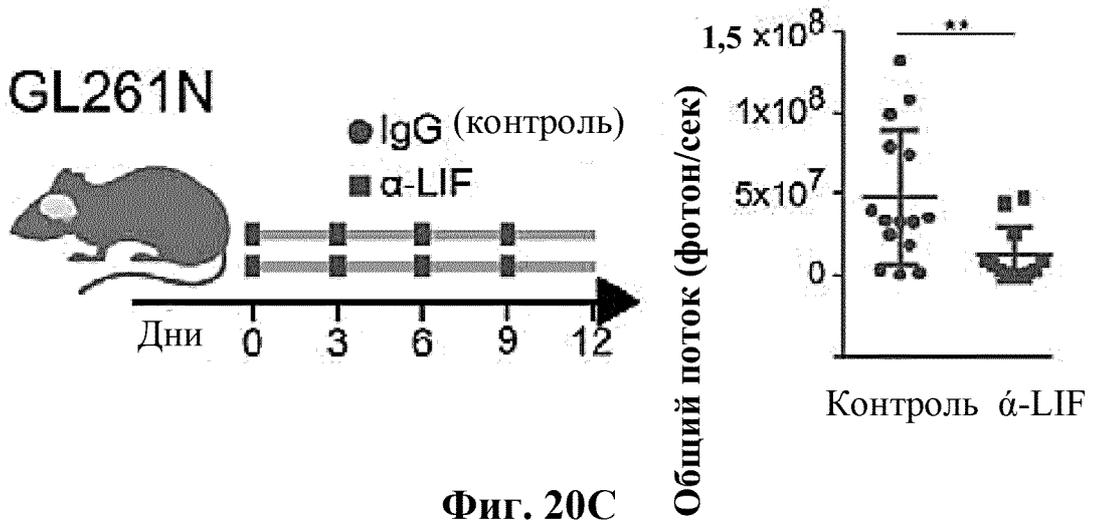
Фиг. 19D



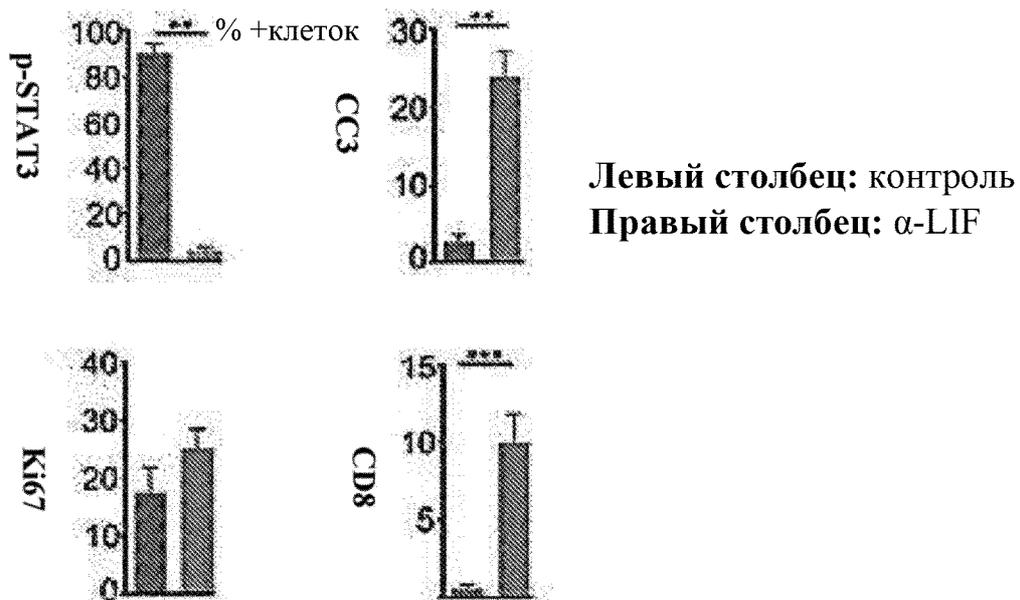
Фиг. 20А



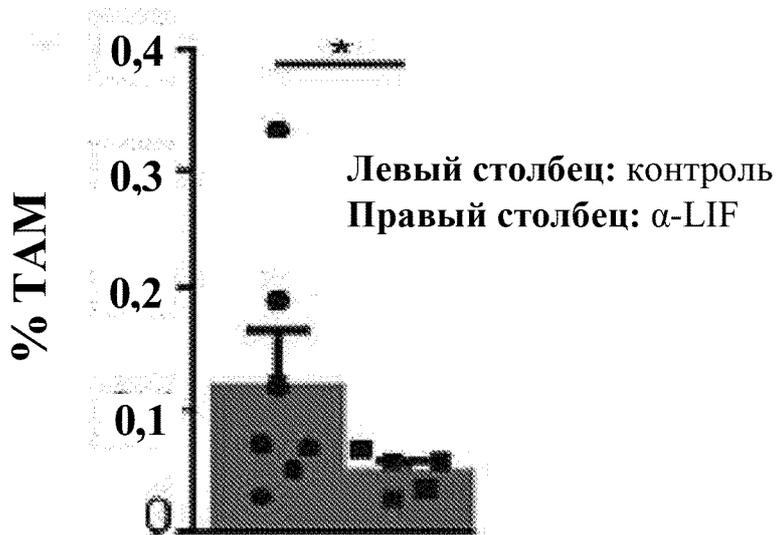
Фиг. 20В



Фиг. 20С



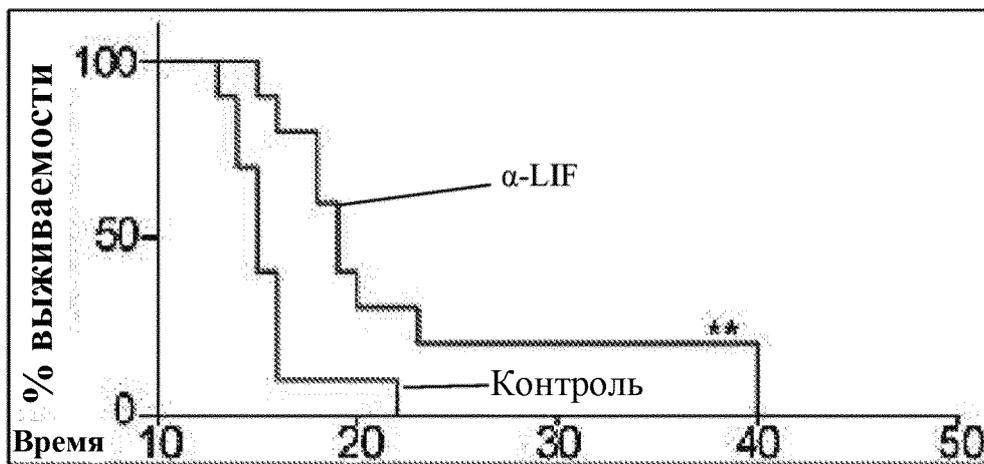
Фиг. 20D



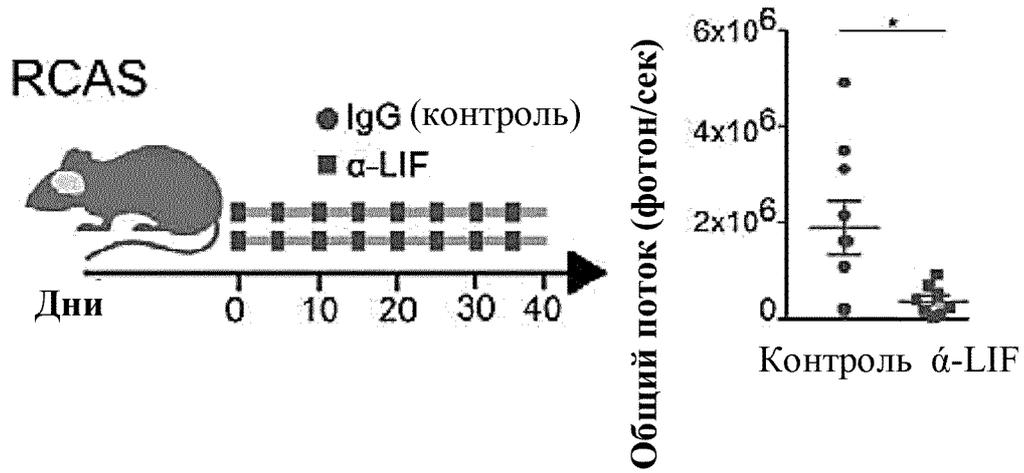
Фиг. 20E



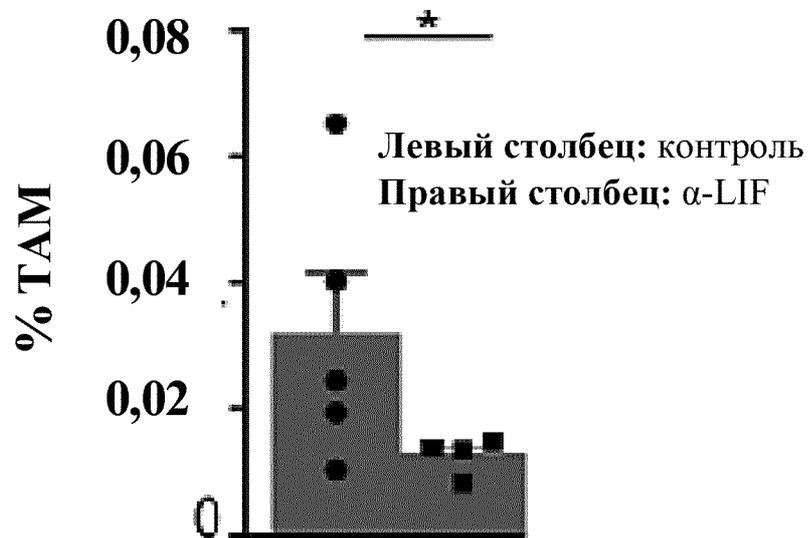
Фиг. 20F



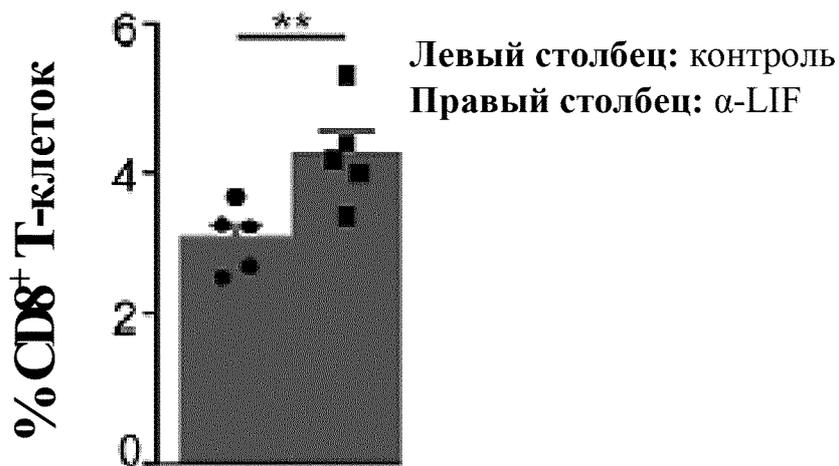
Фиг. 20G



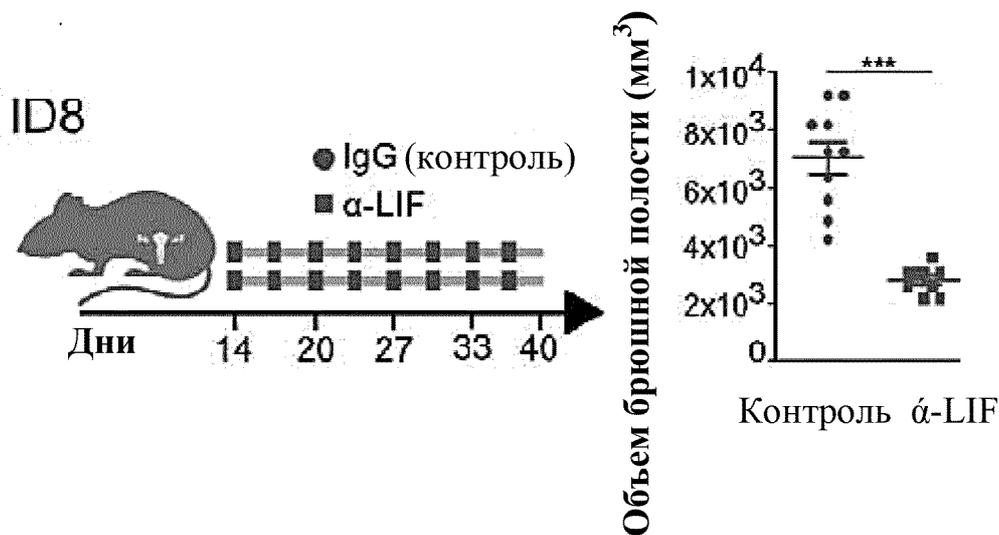
Фиг. 20H



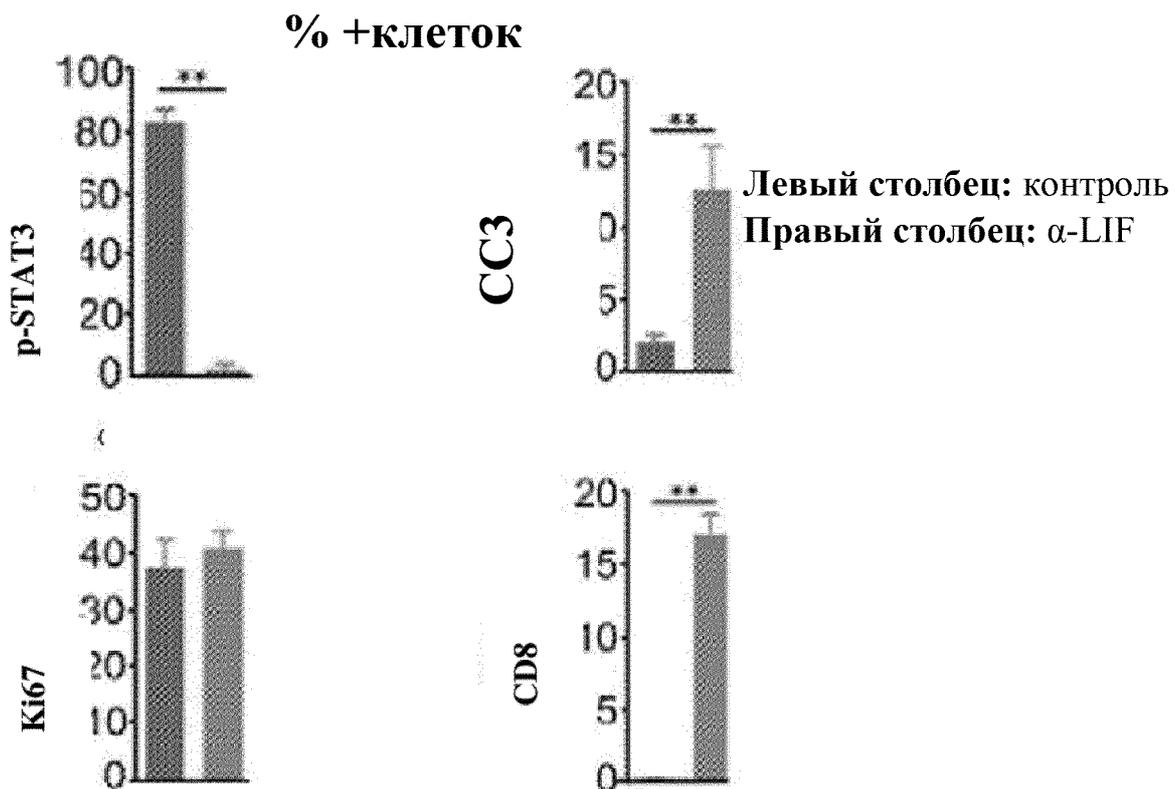
Фиг. 20I



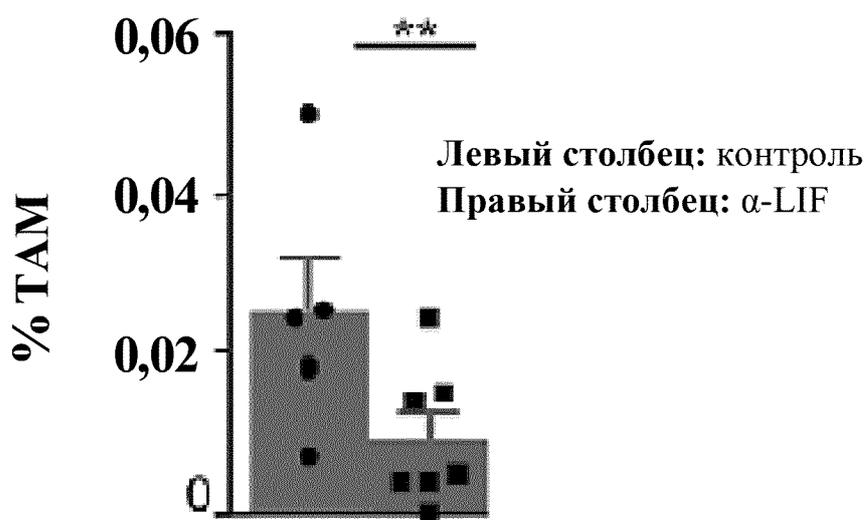
Фиг. 20J



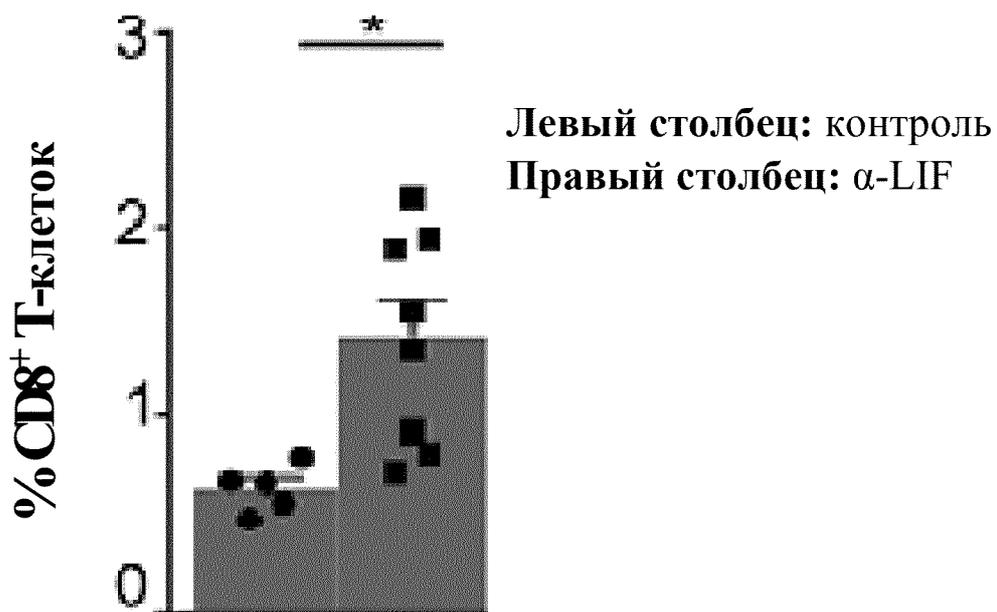
Фиг. 20K



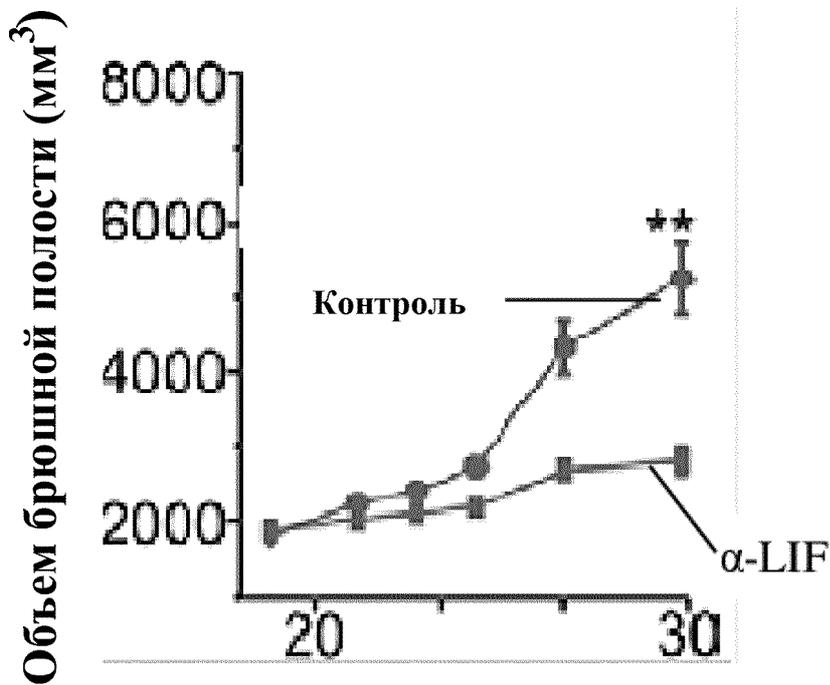
Фиг. 20L



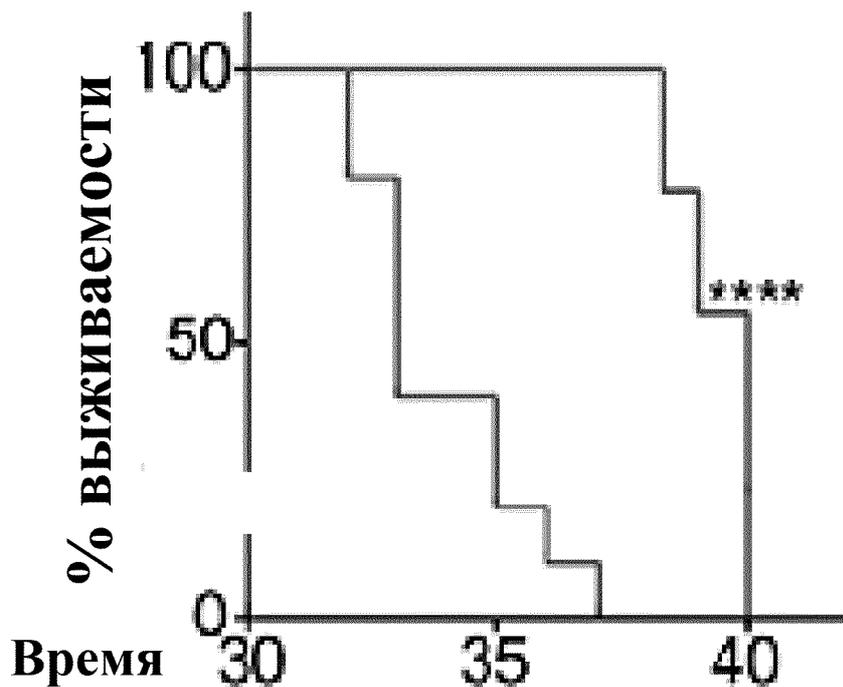
Фиг. 20M



Фиг. 20N



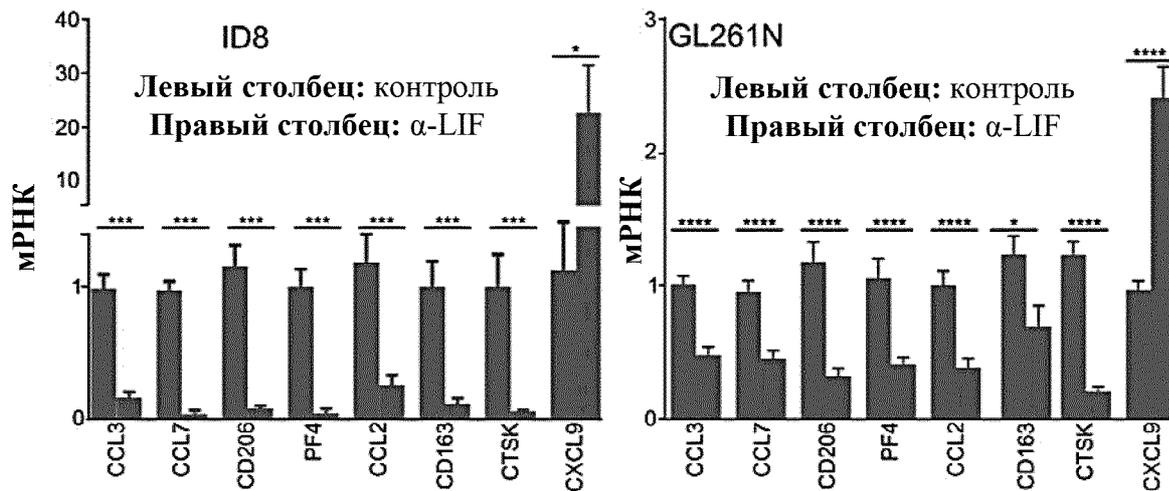
Фиг. 20O



Фиг. 20Р

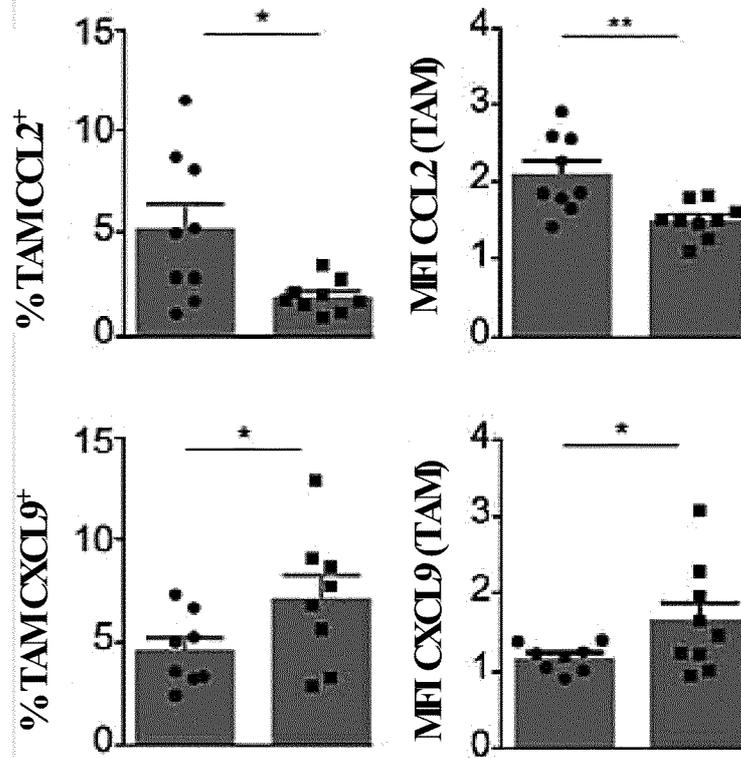


Фиг. 21А

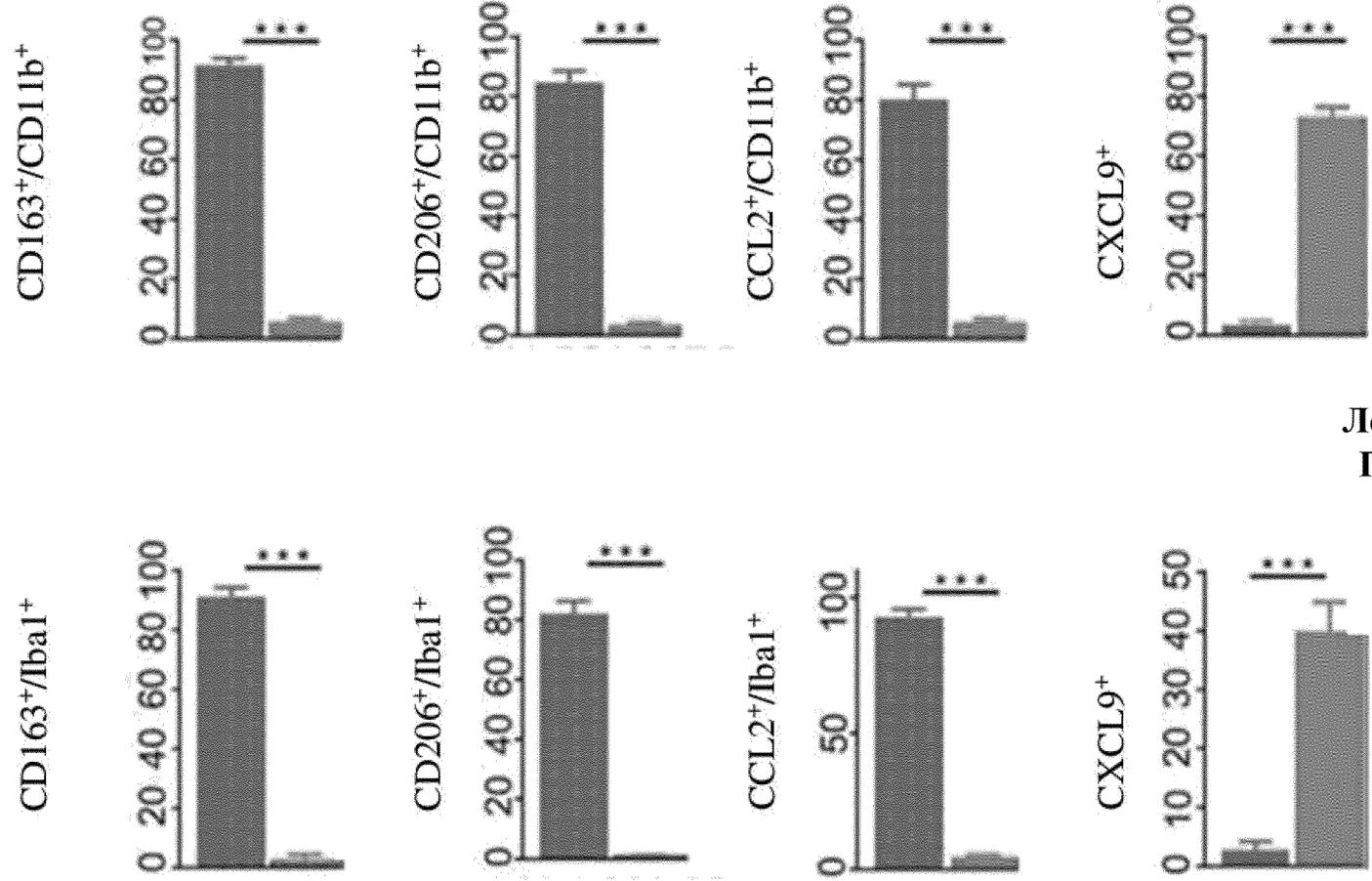


Фиг. 21В

Левый столбец: контроль
Правый столбец: α -LIF



Фиг. 21С

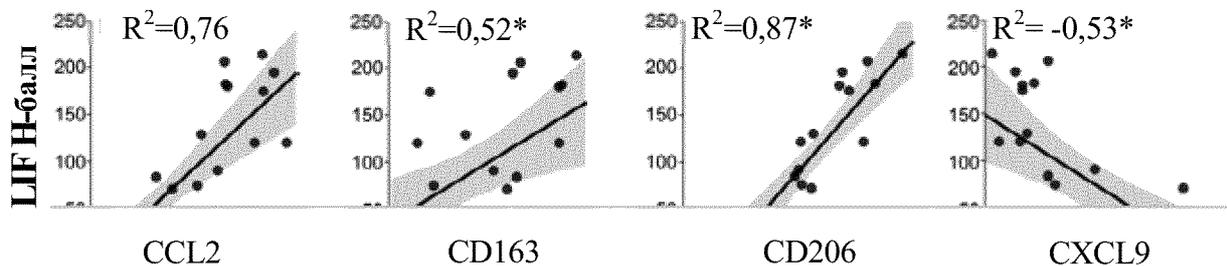


Левый столбец: контроль
 Правый столбец: α -LIF

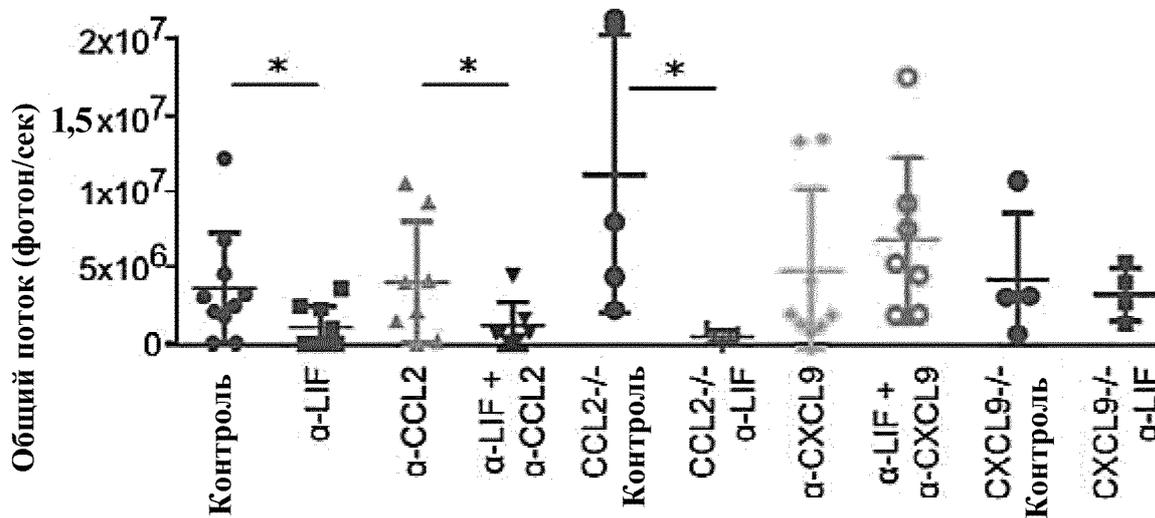
ID8

GL261N

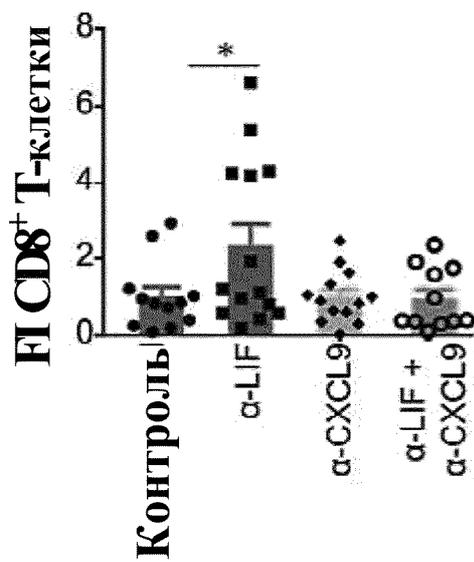
Фиг. 21D



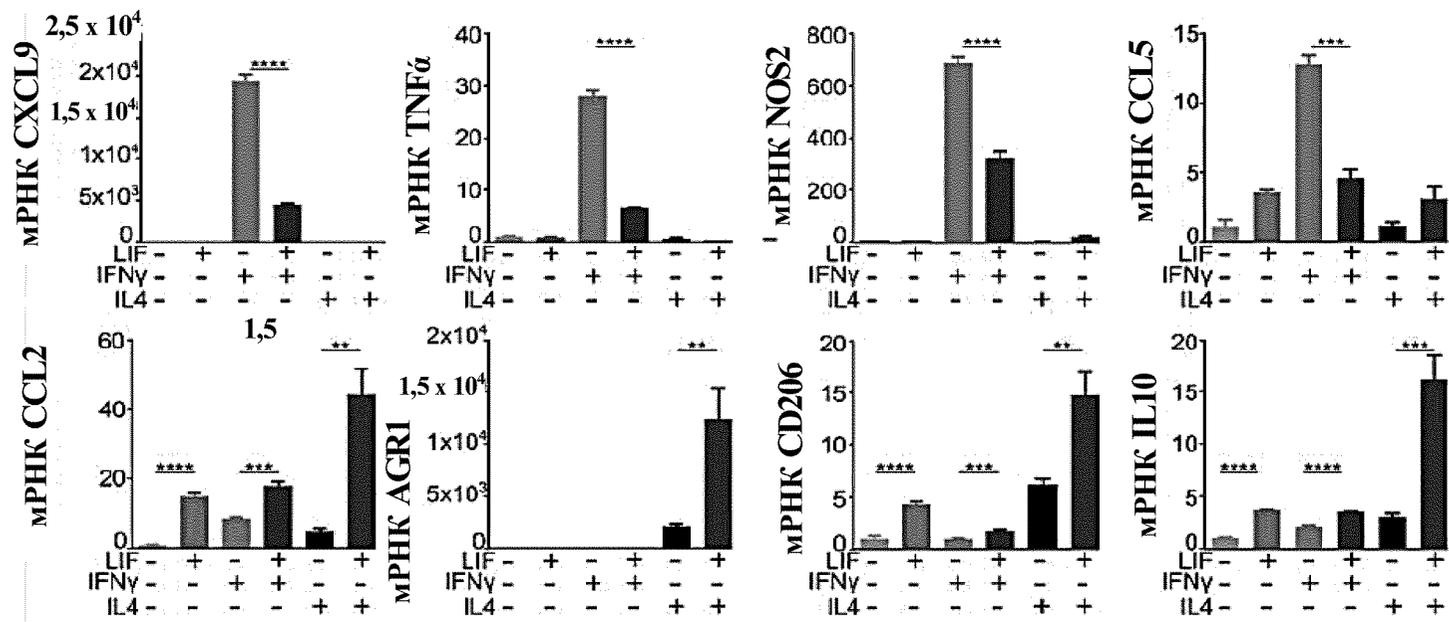
Фиг. 21Е



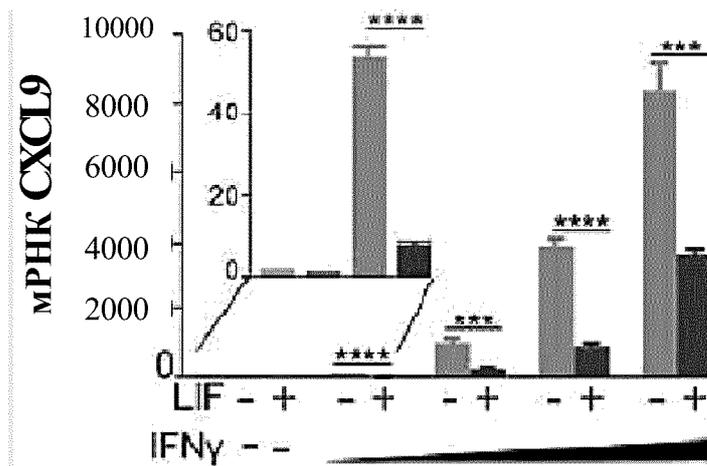
Фиг. 21F



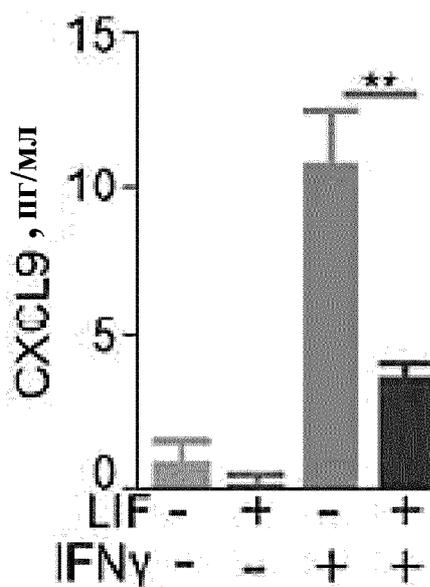
Фиг. 21G



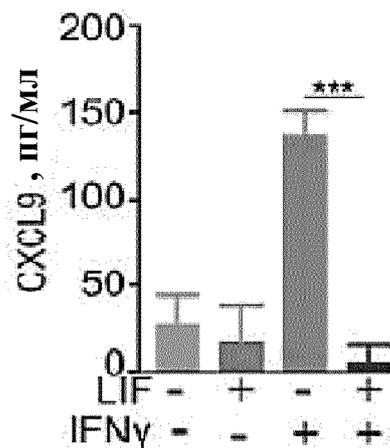
Фиг. 22А



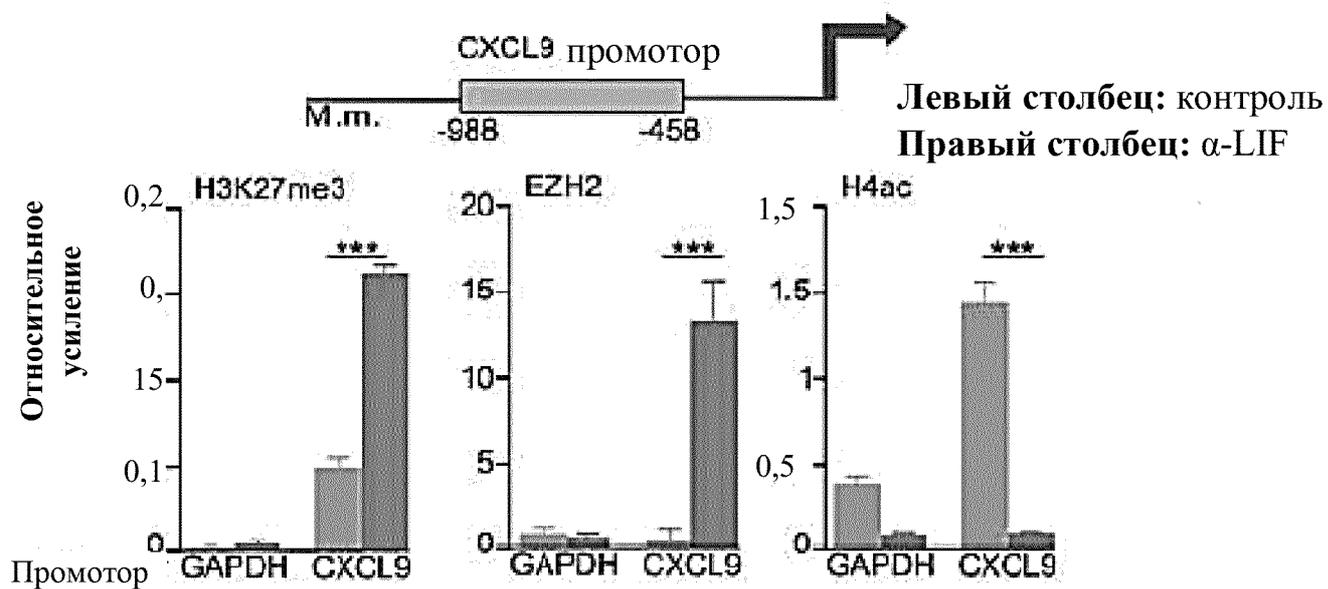
Фиг. 22В



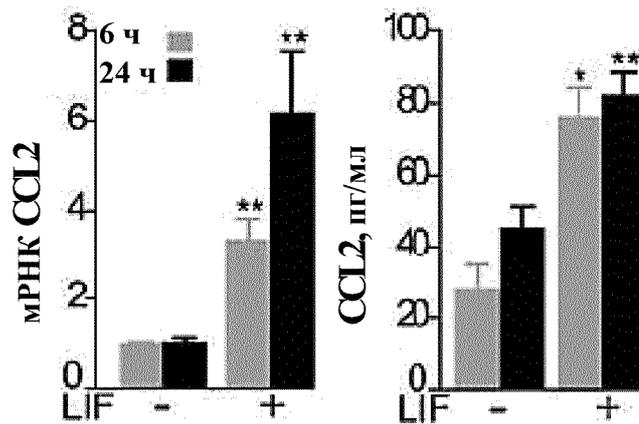
Фиг. 22С



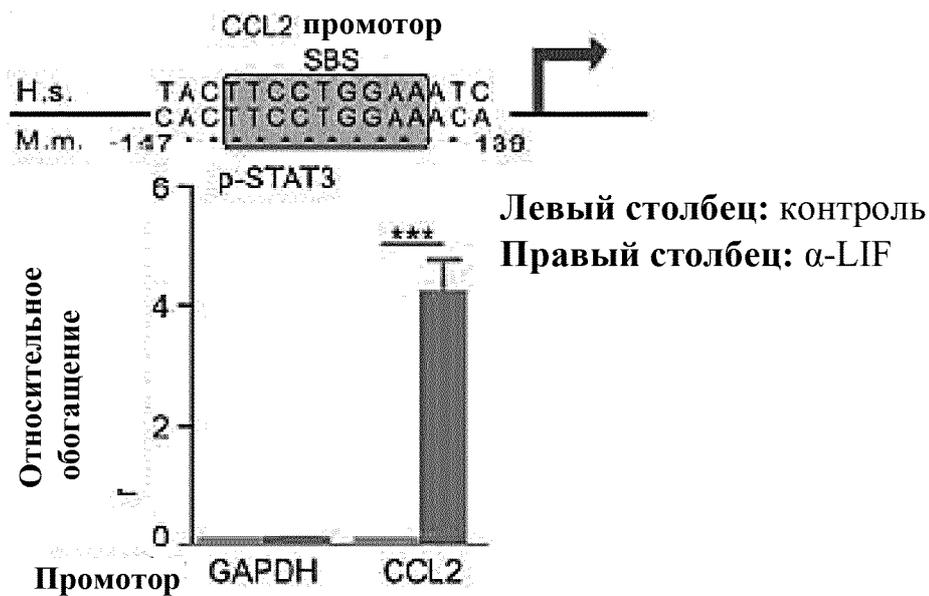
Фиг. 22D



Фиг. 22E



Фиг. 22F



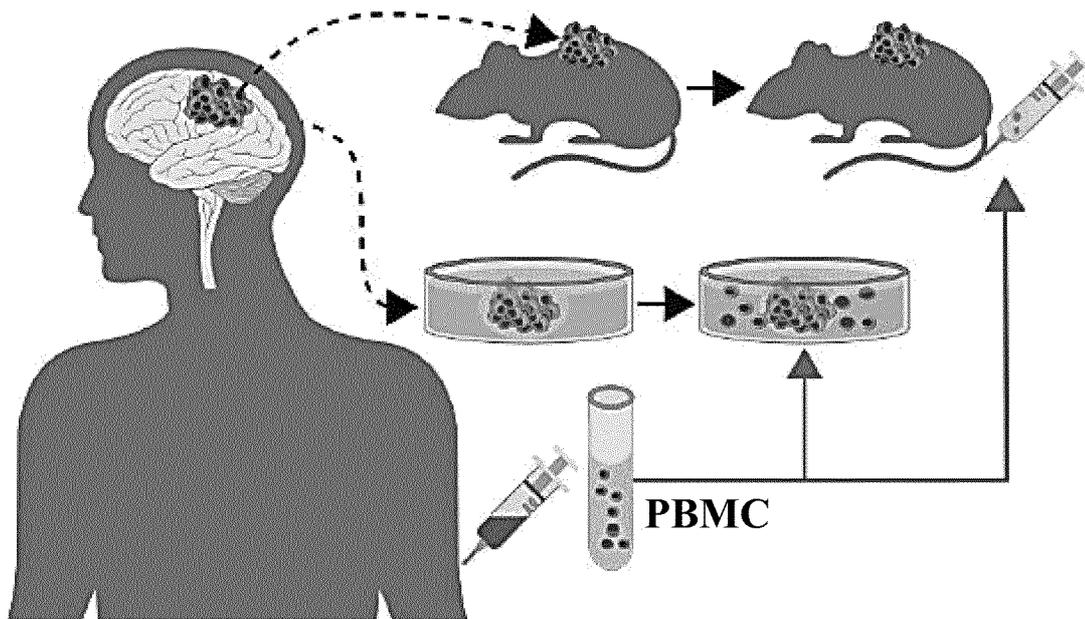
Фиг. 22G



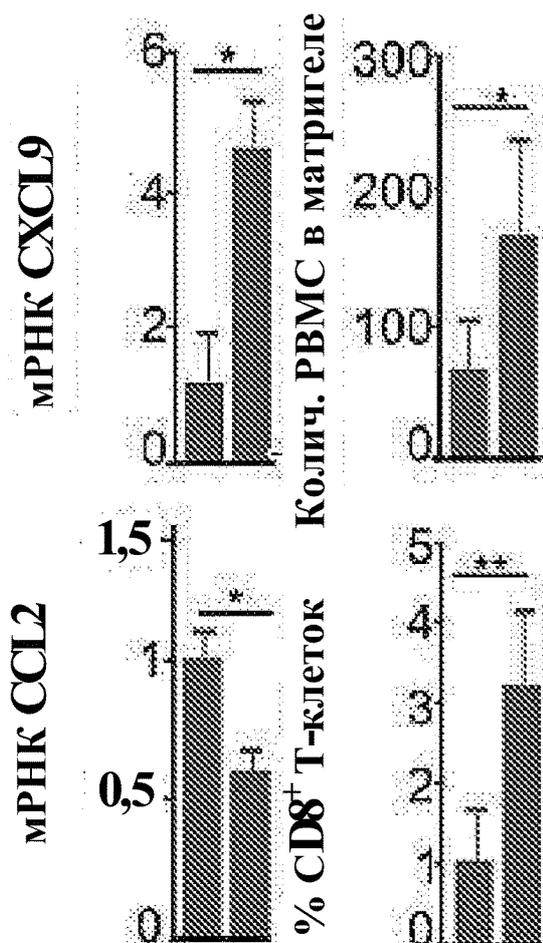
Фиг. 22H

Комбинация ингибиторов LIF и ингибиторов оси PD-1 для применения в лечении рака

48/69



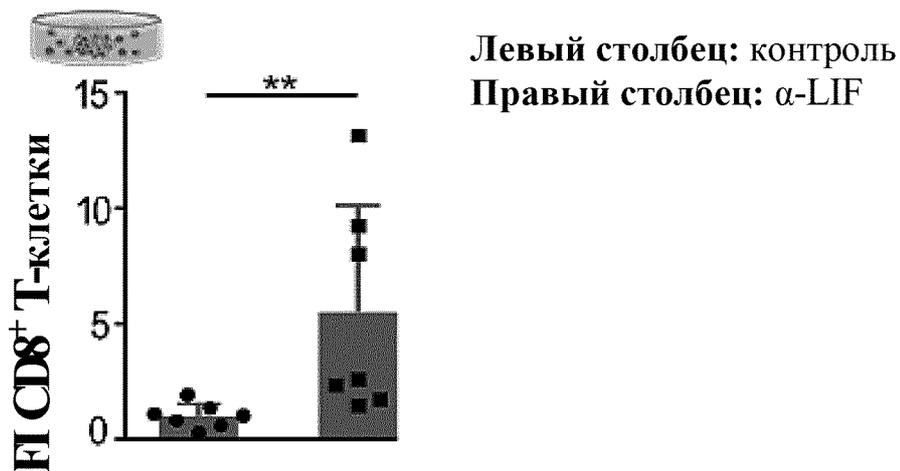
Фиг. 23А



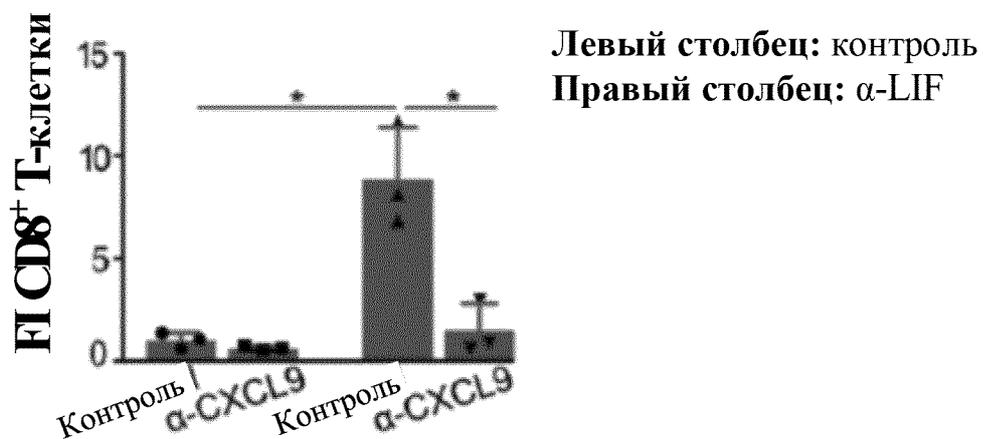
Левый столбец: контроль
Правый столбец: α -LIF

Фиг. 23В

50/69



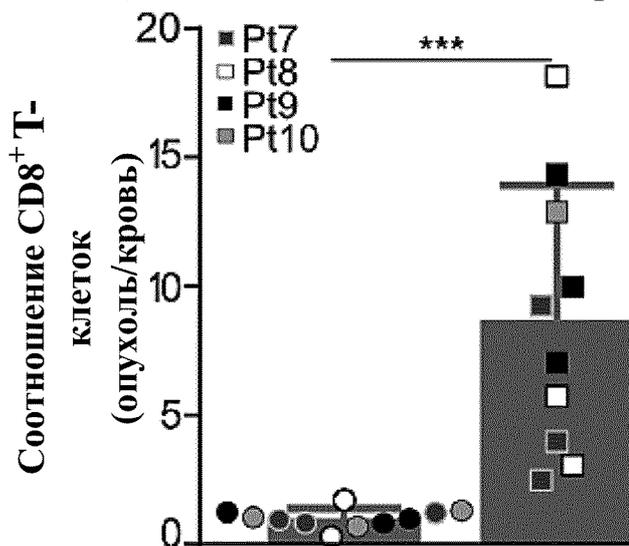
Фиг. 23С



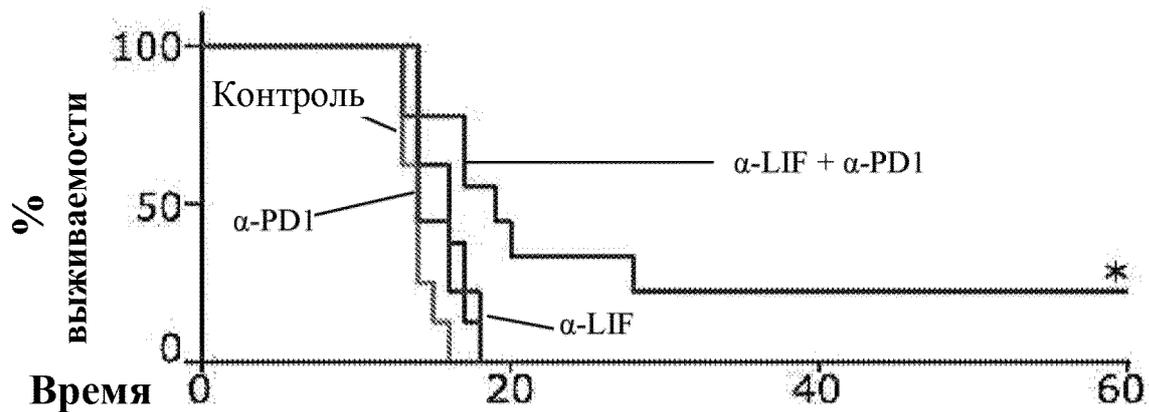
Фиг. 23D



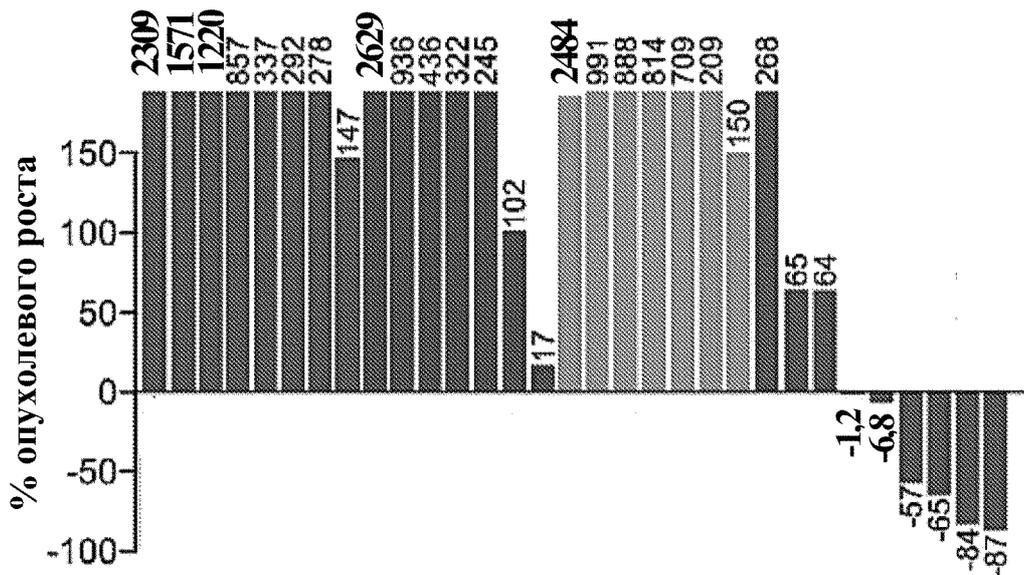
Левый столбец: контроль
Правый столбец: α -LIF



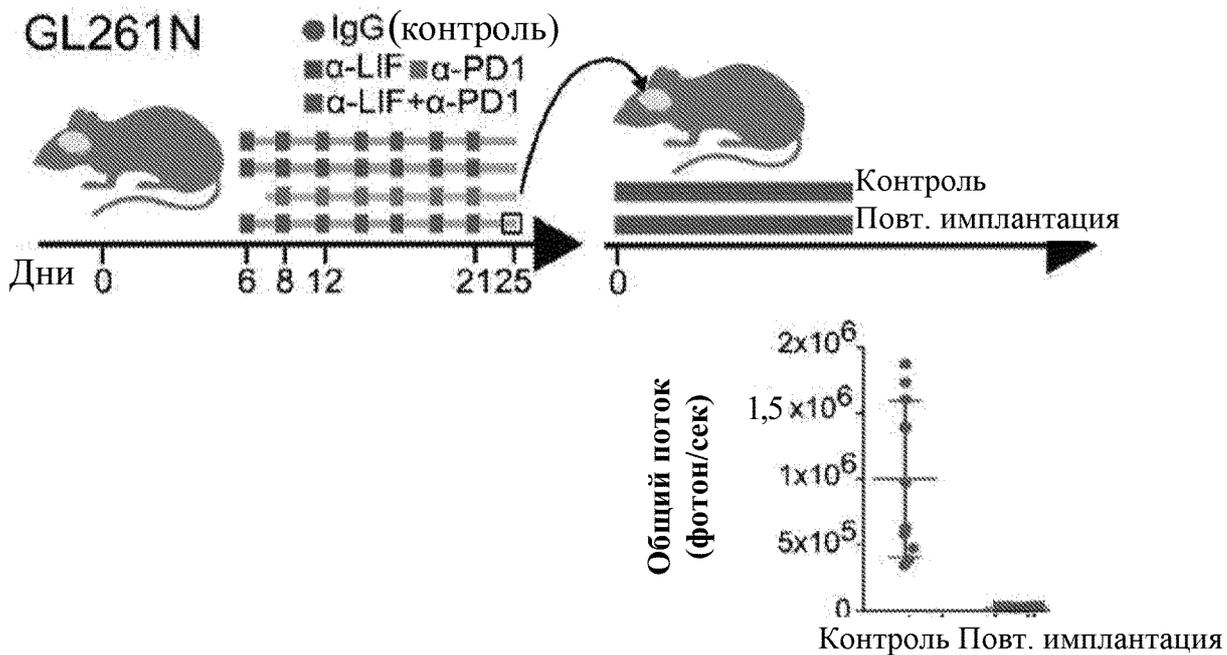
Фиг. 23Е



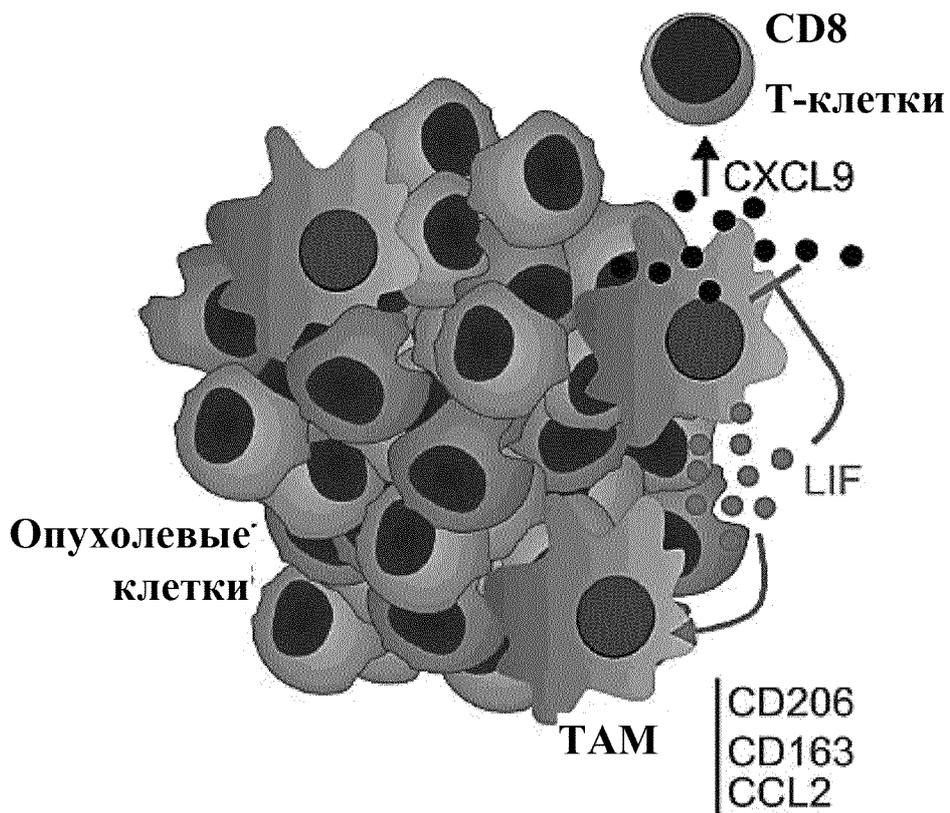
Фиг. 23F



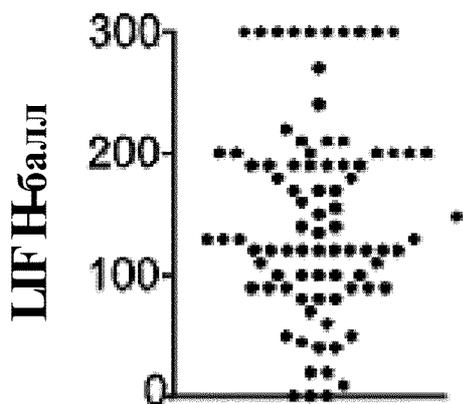
Фиг. 23Г



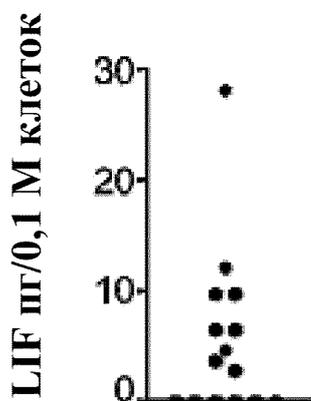
Фиг. 23Н



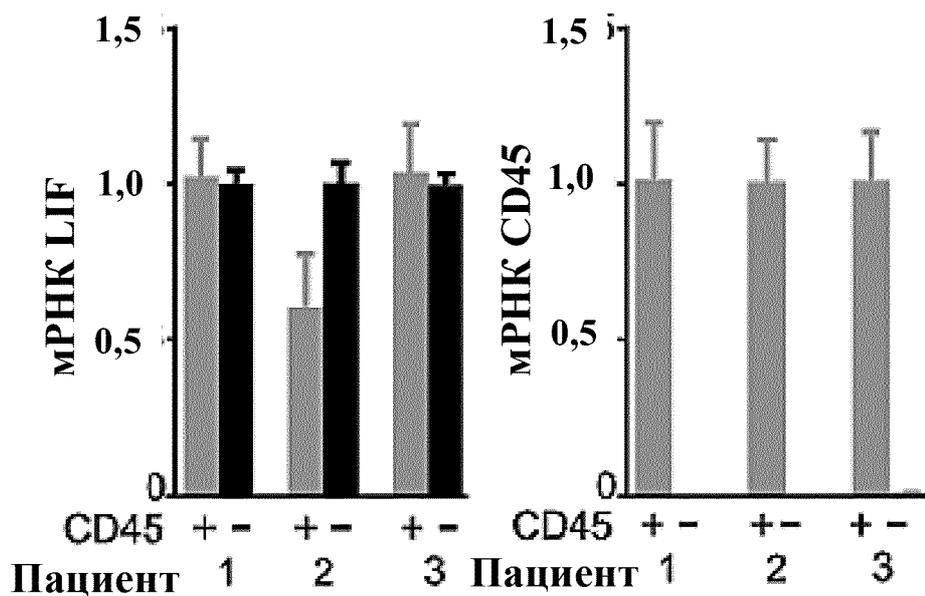
Фиг. 23I



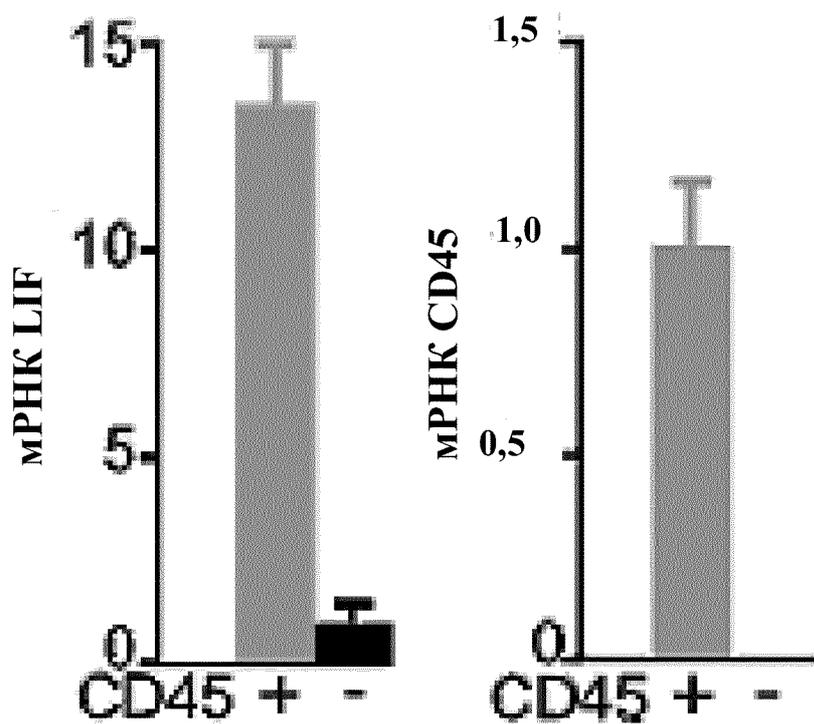
Фиг. 24А



Фиг. 24В

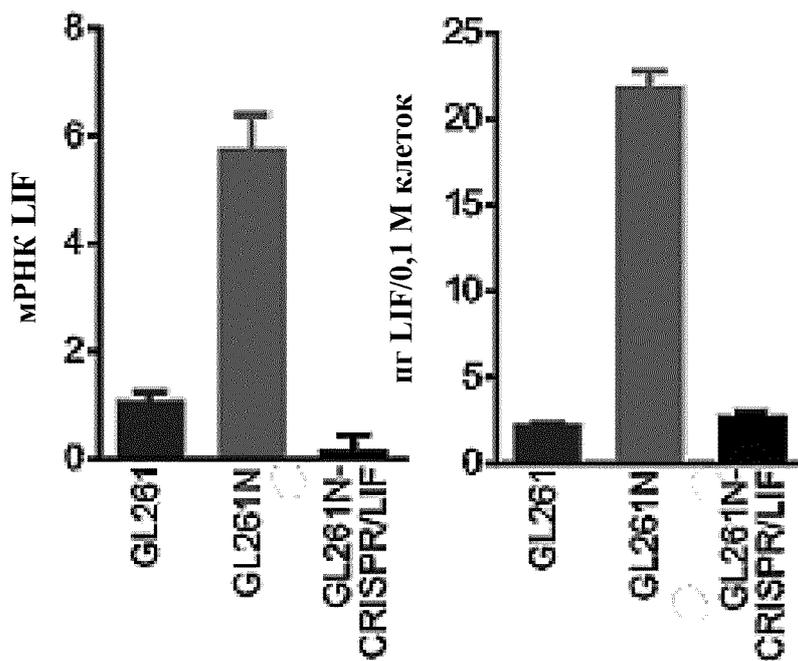


Фиг. 24С

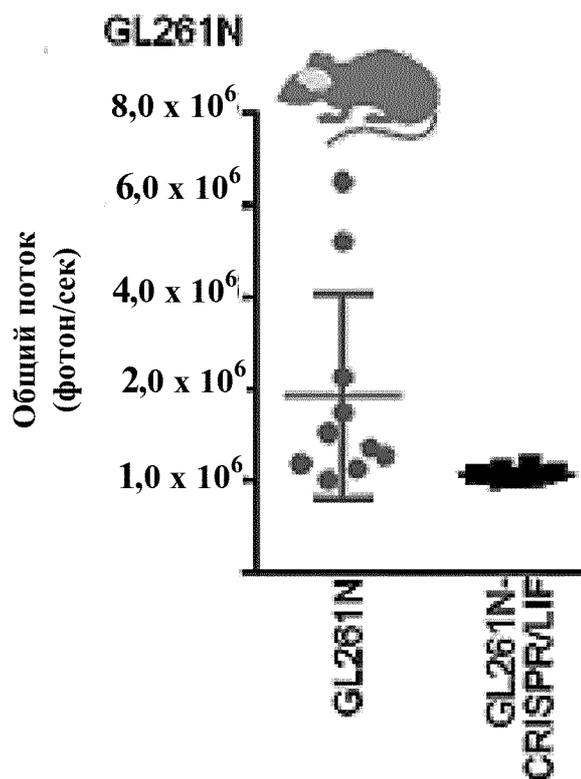


Фиг. 24D

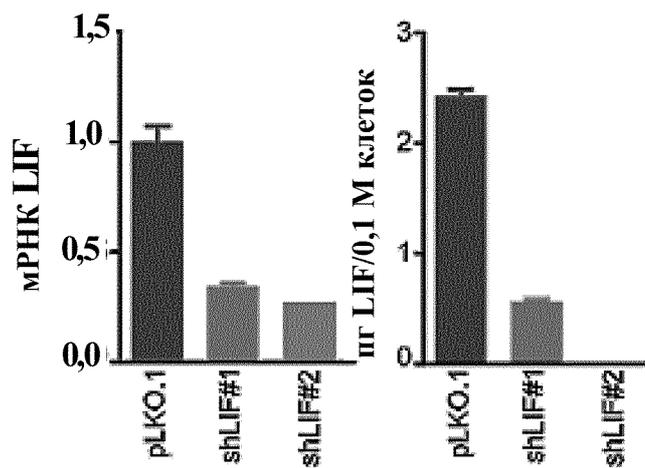
57/69



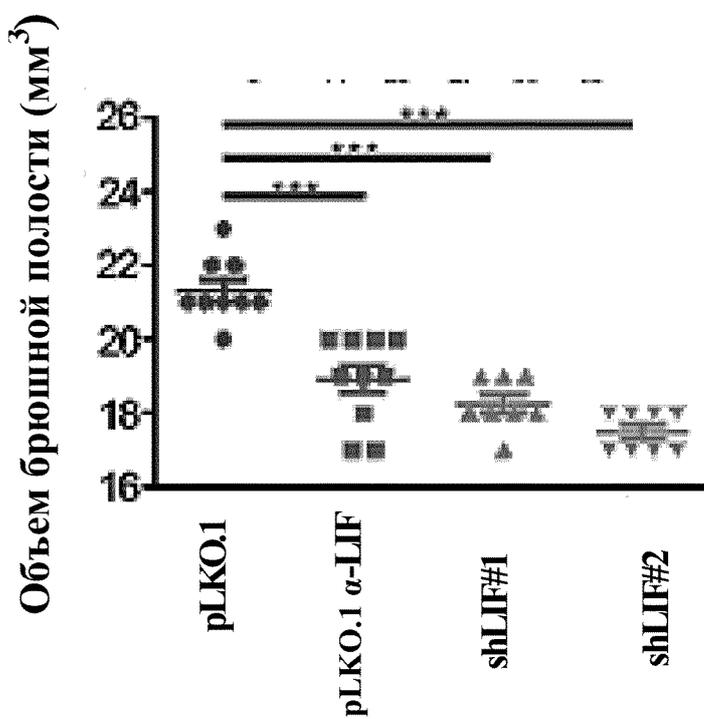
Фиг. 25А



Фиг. 25В



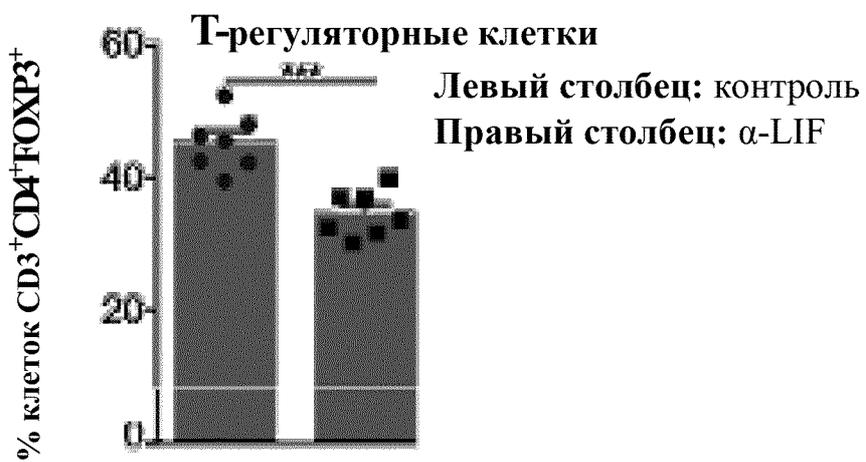
Фиг. 25С



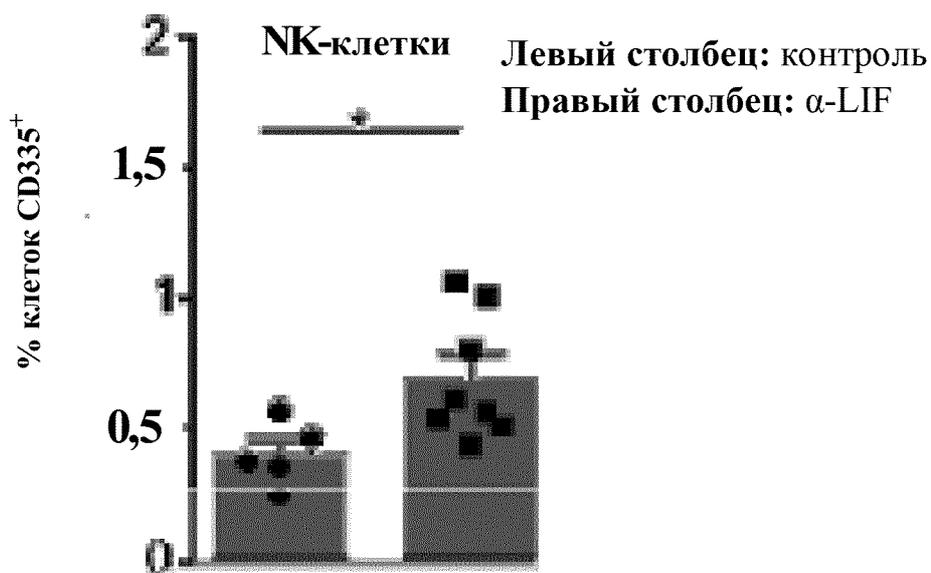
Фиг. 25D



Фиг. 25G



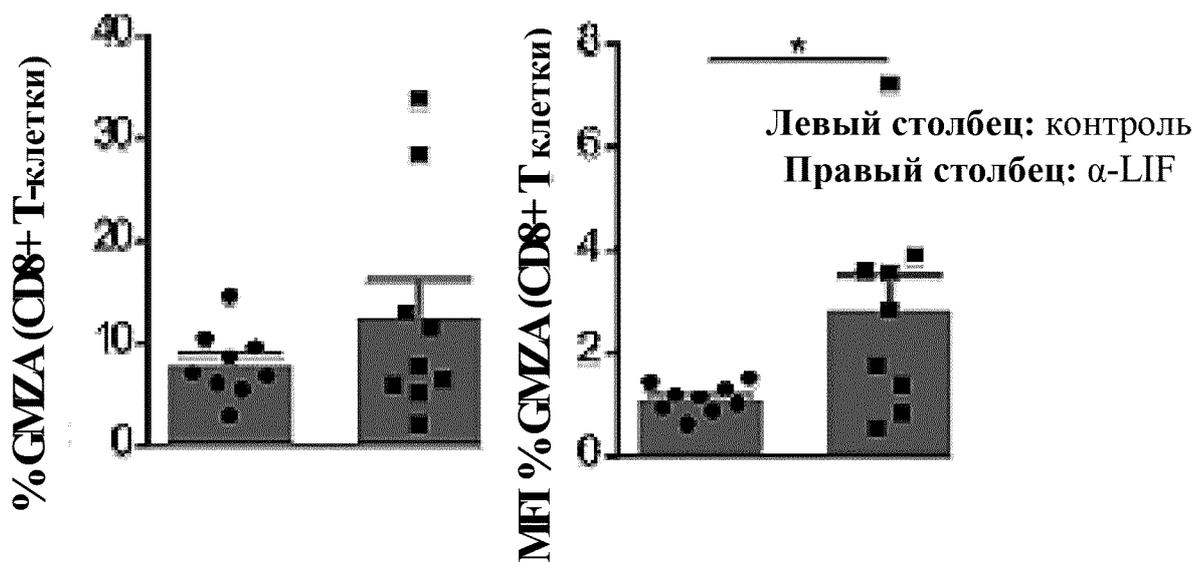
Фиг. 25H



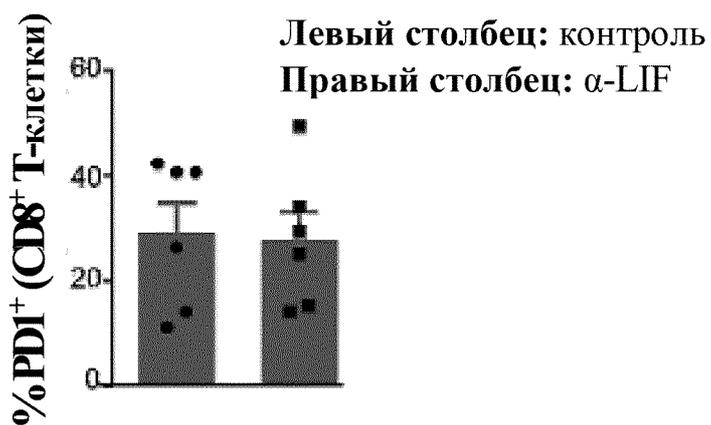
Фиг. 25I



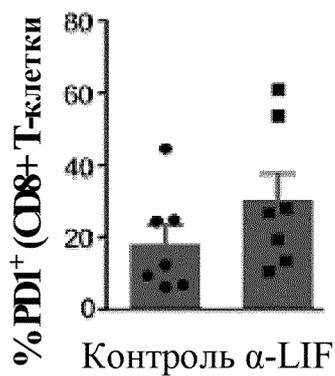
Фиг. 25J



Фиг. 26А

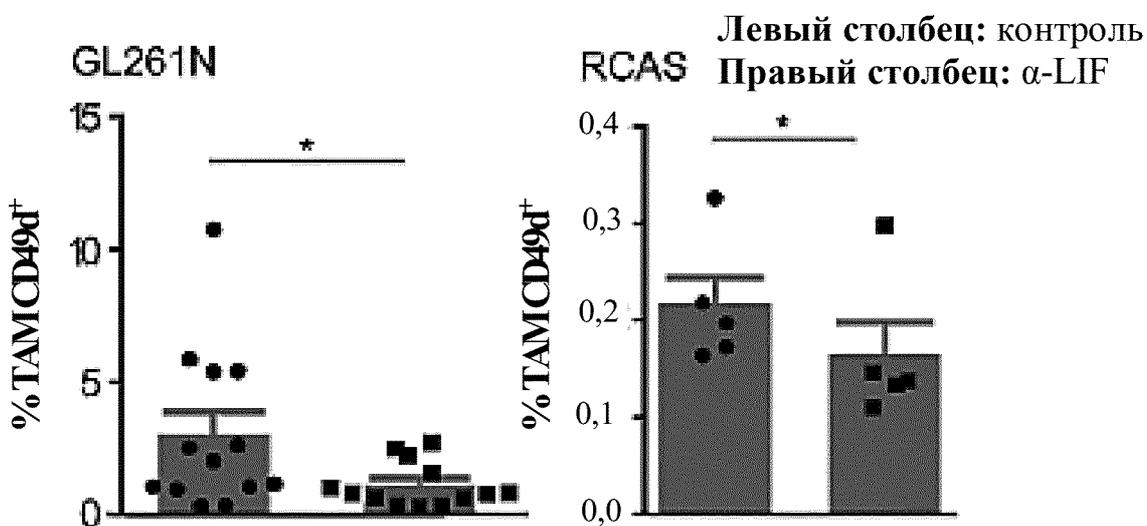


Фиг. 26В

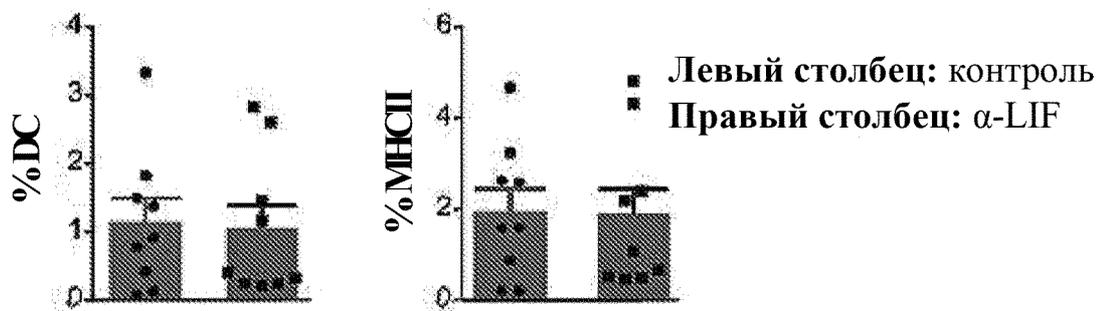


Левый столбец: контроль
Правый столбец: α-LIF

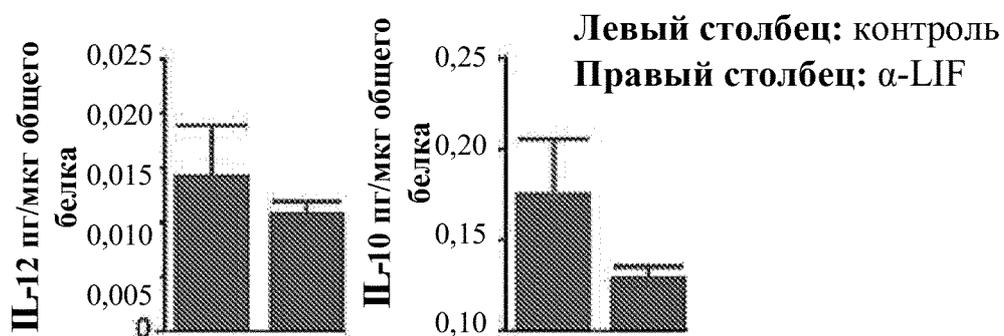
Фиг. 26С



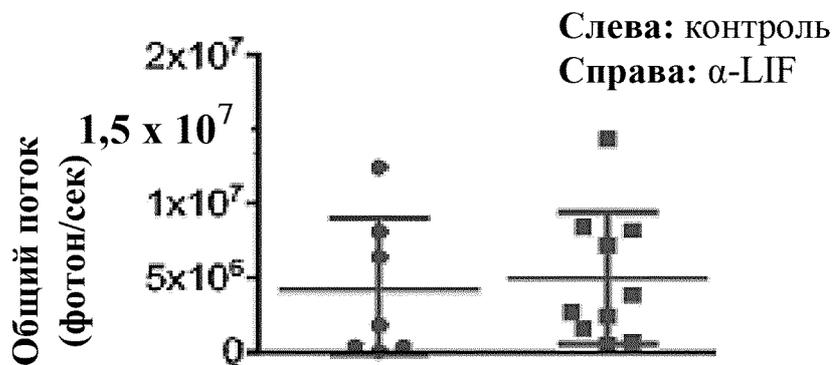
Фиг. 26D



Фиг. 26Е



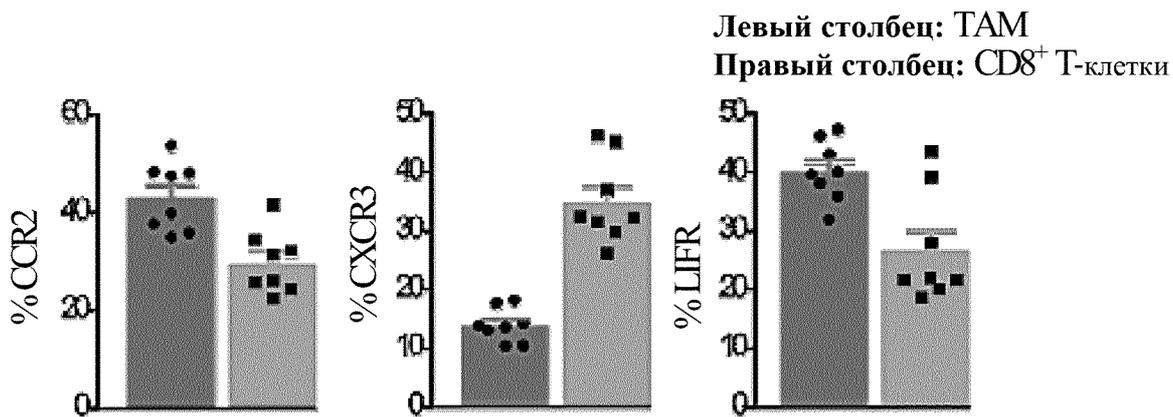
Фиг. 26F



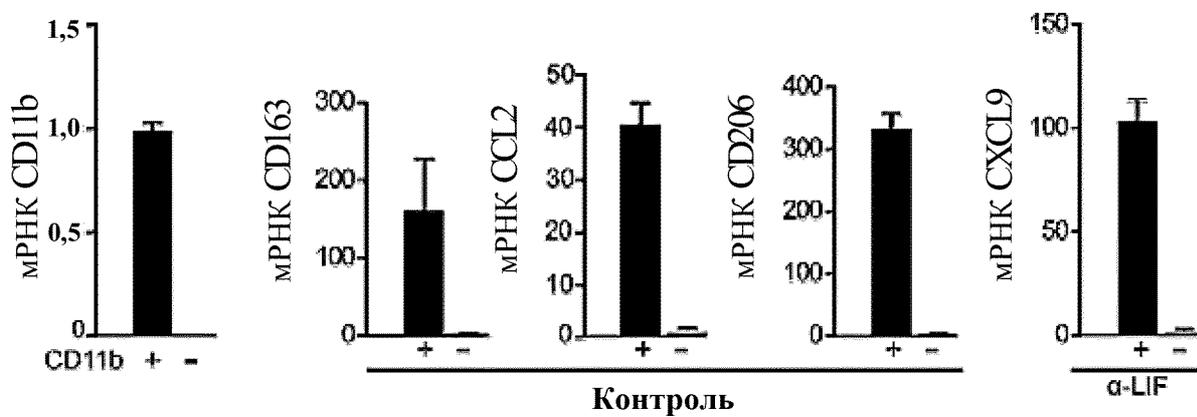
Фиг. 26G



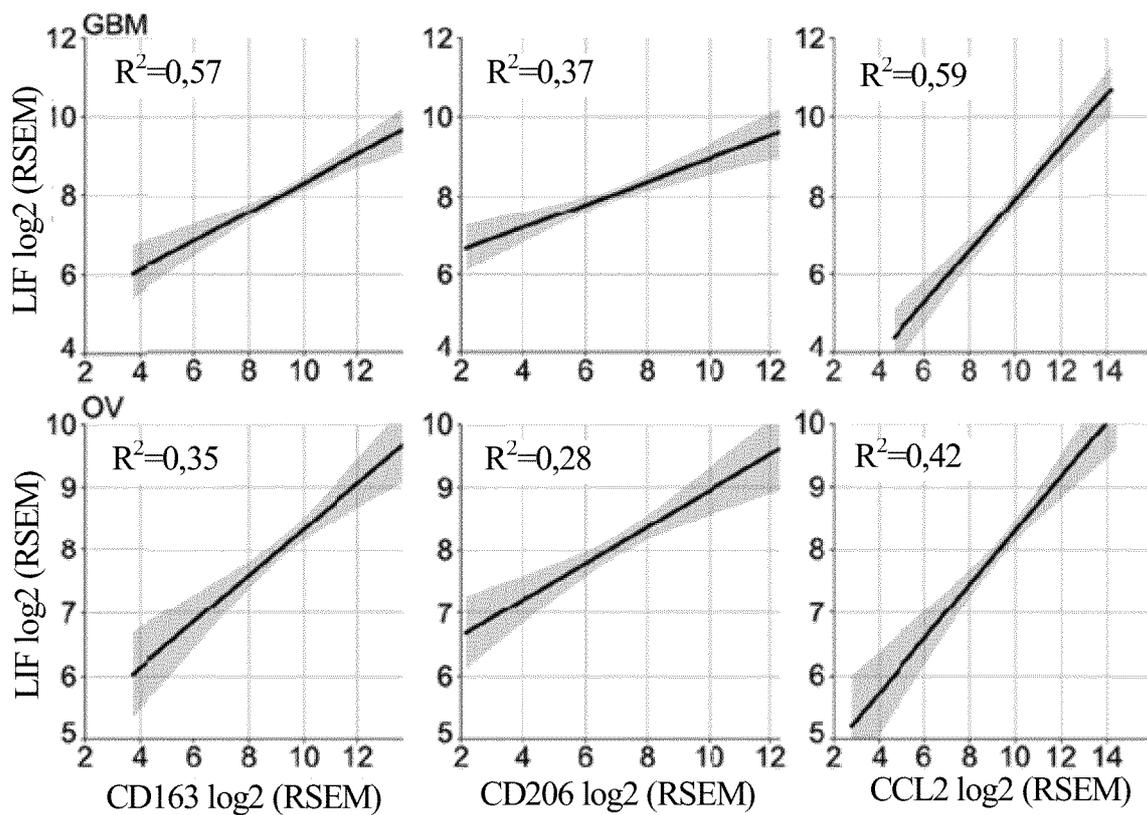
Фиг. 26H



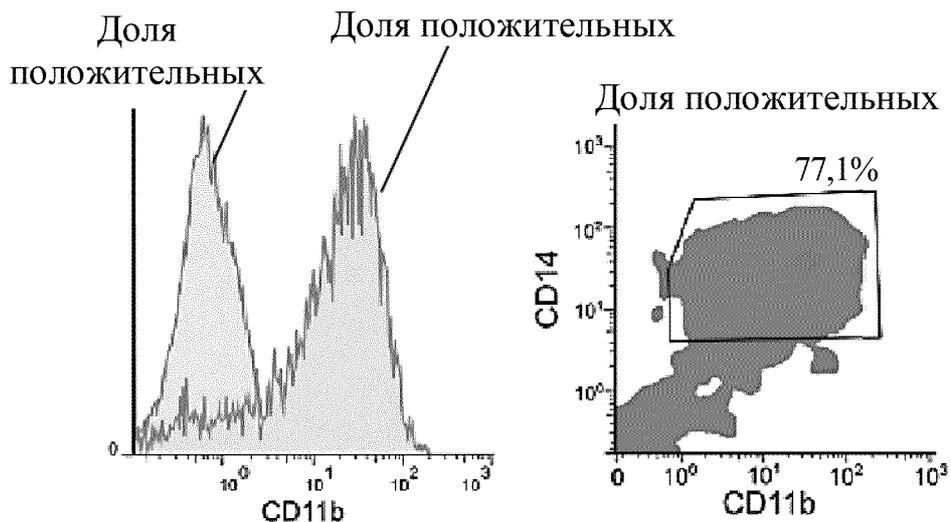
Фиг. 27А



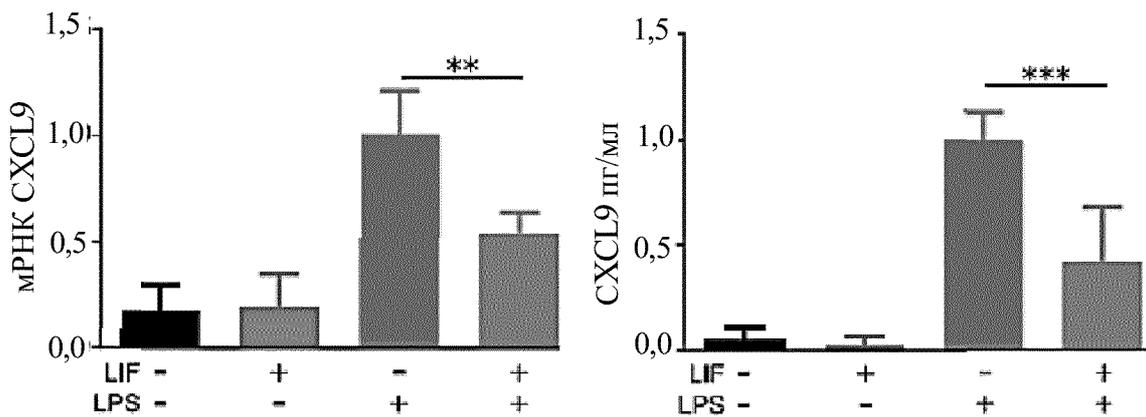
Фиг. 27В



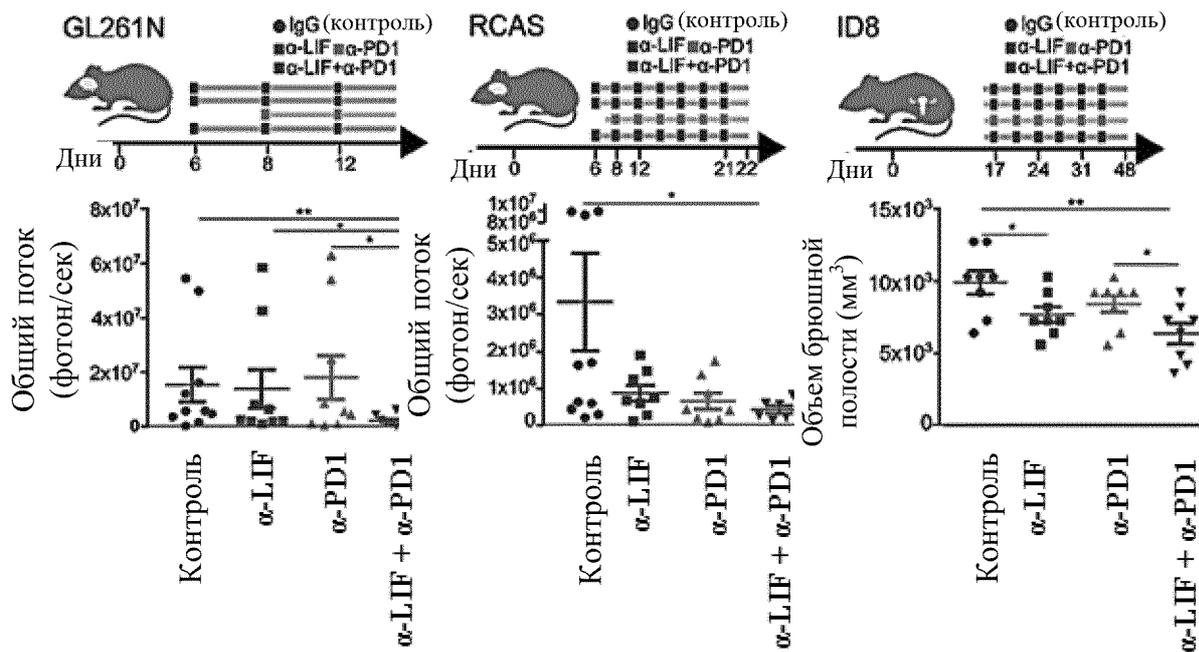
Фиг. 28



Фиг. 29А



Фиг. 29В



Фиг. 30