

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202291025** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2022.09.08**

(22) Дата подачи заявки  
**2020.09.28**

(51) Int. Cl. *C07K 16/24* (2006.01)  
*C12N 15/13* (2006.01)  
*C12N 15/63* (2006.01)  
*C12N 5/10* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

---

(54) **СВЯЗЫВАЮЩАЯ МОЛЕКУЛА, СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ДЛЯ LIF, И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ**

---

(31) PCT/CN2019/108904;  
PCT/CN2020/077049

(32) 2019.09.29; 2020.02.27

(33) CN

(86) PCT/CN2020/118247

(87) WO 2021/057991 2021.04.01

(71) Заявитель:  
**ДЖАКОБИО ФАРМАСЬЮТИКАЛС  
КО., ЛТД. (CN)**

(72) Изобретатель:  
**Лю Цинхао, Тао Цзюнь, Чжоу  
Вэньлай, Хэ Шаньшань, Ян Хайянь,  
Ван Хунлин, Ян Гуйцюнь (CN)**

(74) Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

---

(57) Предложена связывающая молекула, специфичная для LIF, и ее применение. В частности, предложено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с LIF и ингибирует активность LIF. Также предложены применения выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента для лечения заболеваний.

**202291025**  
**A1**

**202291025**

**A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-573854EA/071

### СВЯЗЫВАЮЩАЯ МОЛЕКУЛА, СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ДЛЯ LIF, И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ

#### Область техники

Изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, специфически связывающемуся с LIF, и к применению выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, а также к способу лечения с использованием выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению.

#### Уровень техники

Фактор, ингибирующий лейкоз, (LIF) является членом цитокинов типа II<sub>6</sub> и обладает различными биологическими активностями, включая стимуляцию или ингибирование пролиферации, дифференцировки и выживания клеток [1]. Человеческий белок LIF состоит из 202 аминокислот и имеет два рецептора на поверхности клеточной мембраны, GP130 и LIFR. Белок LIF связывается с этими двумя рецепторами, заставляя два рецептора образовывать гетеродимер, тем самым активируя нижестоящие сигнальные пути, такие как сигнальный путь MAPK и сигнальный путь JAK/STAT [2]. Сообщалось, что сверхэкспрессия белка LIF и повышенный уровень белка LIF в сыворотке коррелируют с плохим прогнозом при множественных опухолях [3, 4]. LIF является ключевым регулятором опухолевых стволовых клеток, играет важную роль в поддержании стволовых клеток, самообновлении и плюрипотентности и т. д. и связан с химиорезистентностью [5, 6]. Кроме того, LIF также может способствовать росту и метастазированию опухоли [7]. Недавние данные указывают на то, что LIF активирует сигнальный путь JAK-STAT3 через аутокринные и паракринные механизмы в опухолях, тем самым играя роль в стимуляции роста опухоли и ингибировании иммунного ответа [8, 9, 10]. Следовательно, LIF является потенциальной терапевтической мишенью. Однако разработанный в настоящее время метод лечения мишеней LIF не оптимистичен. Например, во многих источниках сообщается, что снижение экспрессии белка LIF с помощью РНК-интерференции может ингибировать рост опухоли [11, 12], но недостаток метода РНК-интерференции заключается в неточном нацеливании, коротком периоде полужизни, плохой проницаемости мембраны и трудности производства лекарственного средства. ЕС359 представляет собой низкомолекулярный ингибитор LIFR. Он может не только ингибировать связывание LIFR с LIF, но также ингибировать связывание OSM, STF1 и CNTF с LIFR [13]. Неизвестно, приведут ли эти дополнительные ингибирования к дополнительной токсичности, а низкомолекулярные ингибиторы, специфичные для белка LIF, еще не описаны. Только одно лекарственное антитело, нацеленное на белок LIF, в настоящее время находится на стадии клинической разработки, и соответствующие данные о его безопасности и эффективности еще не опубликованы.

Следовательно, необходимы дополнительные исследования для разработки

лекарственных средств и комбинированной терапии для мишеней LIF.

### **Сущность изобретения**

Изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, специфически связывающемуся с LIF, и к их применению для лечения заболеваний.

В одном отношении изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое связывается с эпитопом, представленным аминокислотной последовательностью TYGPDTSKGKDVFQKK (SEQ ID NO: 61) белка LIF человека, или с эпитопом соответствующей аминокислотной последовательности другого вида млекопитающего.

В другом отношении, изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое содержит:

(a) LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 или 66, и их консервативных модификаций;

(b) LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 или 67, и их консервативных модификаций;

(c) LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3 или 68, и их консервативных модификаций;

(d) HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4 или 69, и ее консервативных модификаций;

(e) HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 45 или 70, и ее консервативных модификаций; и

(f) HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6 или 71, и их консервативных модификаций.

Необязательно LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 или HCDR3 содержат добавления, замены, делеции и/или вставки 17 или менее аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(a) LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и ее консервативных модификаций;

(b) LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и ее консервативных модификаций;

(c) LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3 и ее консервативных модификаций;

(d) HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4 и ее консервативных модификаций;

(e) HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5 или 45, и их консервативных модификаций;

(f) HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6 и ее консервативных модификаций.

Необязательно LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 или HCDR3 содержат добавления, замены, делеции и/или вставки 17 или менее аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 или HCDR3 необязательно содержат добавления, замены, делеции и/или вставки 9 или менее аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления LCDR1, LCDR2, LCDR3, HCDR1, HCDR2 или HCDR3 необязательно содержат добавления, замены, делеции и/или вставки 5 или менее аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

1) (a) LCDR1, содержащую SEQ ID NO: 1, (b) LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 2, (c) LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 3, (d) HCDR1, содержащую SEQ ID NO: 4, (e) HCDR2, содержащую SEQ ID NO: 5, и (f) HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 6;

2) (a) LCDR1, содержащую SEQ ID NO: 1, (b) LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 2, (c) LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 3, (d) HCDR1, содержащую SEQ ID NO: 4, (e) HCDR2, содержащую SEQ ID NO: 45, и (f) HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 6; или

3) (a) LCDR1, содержащую SEQ ID NO: 66, (b) LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 67, (c) LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 68, (d) HCDR1, содержащую SEQ ID NO: 69, (e) HCDR2, содержащую SEQ ID NO: 70, и (f) HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 71.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

1) (a) LCDR1, содержащую SEQ ID NO: 1, (b) LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 2, (c) LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 3, (d) HCDR1, содержащую SEQ ID NO: 4, (e) HCDR2, содержащую SEQ ID NO: 5, и (f) HCDR3, содержащий SEQ ID NO: 6; или

2) (a) LCDR1, содержащую SEQ ID NO: 1, (b) LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 2, (c) LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 3, (d) HCDR1, содержащую SEQ ID NO: 4, (e) HCDR2, содержащую SEQ ID NO: 45, и (f) HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(a) LCDR1, содержащую SEQ ID NO: 1, (b) LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 2, (c) LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 3, (d) HCDR1, содержащую SEQ ID NO: 4, (e) HCDR2, содержащую SEQ ID NO: 5 и (f) HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(a) LCDR1, содержащую SEQ ID NO: 1, (b) LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 2, (c) LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 3, (d) HCDR1, содержащую SEQ ID NO: 4, (e) HCDR2, содержащую SEQ ID NO: 45 и (f) HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(a) LCDR1, содержащую SEQ ID NO: 66, (b) LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 67,

(c) LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 68, (d) HCDR1, содержащую SEQ ID NO: 69, (e) HCDR2, содержащую SEQ ID NO: 70 и (f) HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 71.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой мышиное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, химерное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, полностью человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело представляет собой гуманизированное антитело, содержащее каркасную область или вариант этой каркасной области, полученное из человеческого антитела.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(i) переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 11, 15, 19, 46, 74 или 82, и их консервативных модификаций; и

(ii) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23, 27, 31, 48, 75 или 83, и их консервативных модификаций.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(i) переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 11, 15, 19 или 46, и ее консервативных модификаций; и

(ii) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23, 27, 31 или 48, и их консервативных модификаций.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(i) переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 11, 15 или 19, и ее консервативных модификаций; и

(ii) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23, 27 или 31, и их консервативных модификаций.













вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 74, и вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 75.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 82, и вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 83.

В некоторых вариантах осуществления вариабельная область легкой и тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности вариабельной области легкой и тяжелой цепи, выбранной из 1)-15), соответственно.

С одной стороны, изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему комбинацию вариабельной области тяжелой и легкой цепи, выбранной из любого из следующих (a)-(c):

(a) вариабельной области легкой цепи (VL), содержащей LCDR1, LCDR2 и LCDR3, которые имеют ту же последовательность, что и любая из SEQ ID NO: 7, 11, 15, 19, 46 или 82; и

(ii) вариабельной области тяжелой цепи (VH), содержащей HCDR1, HCDR2 и HCDR3, которые имеют ту же последовательность, что и любая из SEQ ID NO: 23, 27, 31, 48 или 83.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую и тяжелую цепь, где:

(I) легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 13, 17, 21, 37, 39, 50 или 54, и их консервативных модификаций; и

(II) тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 29, 33, 35, 52 или 56, и их консервативных модификаций.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую и тяжелую цепь, где:

(I) легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из

группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 13, 17, 21, 37, 39 или 50, и их консервативных модификаций; и

(II) тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 29, 33, 35 или 52, и их консервативных модификаций.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую и тяжелую цепь, где:

(I) легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 13, 17 или 21, и их консервативных модификаций; и

(II) тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 29 или 33, и их консервативных модификаций.

В некоторых вариантах осуществления легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с легкой цепью, выбранной из (I), и тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с тяжелой цепью, выбранной из (II).

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

1) легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9, и тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 25,

2) легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9, и тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 29,

3) легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9, и тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 33,

4) легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 13, и тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 25,

5) легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую









Еще в одном отношении изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему (a) LCDR1, содержащую SEQ ID NO: 1, (b) LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 2, (c) LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 3, (d) HCDR1, содержащую SEQ ID NO: 4, (e) HCDR2, содержащую SEQ ID NO: 45, и (f) HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 6.

В еще одном отношении изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему вариabельную область легкой цепи (VL), представленную SEQ ID NO: 7, и вариabельную область тяжелой цепи (VH), представленную SEQ ID NO: 23.

В еще одном отношении изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему вариabельную область легкой цепи (VL), представленную SEQ ID NO: 11, и вариabельную область тяжелой цепи (VH), представленную SEQ ID NO: 31.

В еще одном отношении изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему вариabельную область легкой цепи (VL), представленную SEQ ID NO: 19, и вариabельную область тяжелой цепи (VH), представленную SEQ ID NO: 31.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело представляет собой моноклональное антитело, химерное антитело, гуманизованное антитело, сконструированное человеческое антитело, человеческое антитело, биспецифическое антитело, Fv, одноцепочечное антитело (scFv), Fab, Fab', Fab'-SH или F(ab')<sub>2</sub>.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело представляет собой IgG.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело представляет собой IgG1, IgG2 или IgG4.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антагонист фактора, ингибирующего лейкемию (LIF).

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способно ингибировать экспрессию LIF и/или блокировать активность LIF.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способно конкурировать или перекрестно конкурировать за связывание с LIF.

В еще одном отношении изобретение относится к нуклеотидной композиции, содержащей нуклеотидную молекулу, кодирующую выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная молекула представляет собой ДНК или РНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная молекула представляет собой ДНК.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная композиция содержит:

(i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую ДНК, кодирующую переменную область легкой цепи (VL), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7, 11, 15, 19, 46 или 82; и

(ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую ДНК, кодирующую переменную область тяжелой цепи (VH), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 23, 27, 31, 48 или 83.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная композиция содержит:

(i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую ДНК, кодирующую переменную область легкой цепи (VL), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7, 11, 15, 19 или 46; и

(ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую ДНК, кодирующую переменную область тяжелой цепи (VH), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 23, 27, 31 или 48.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная композиция содержит:

(i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую ДНК, кодирующую переменную область легкой цепи (VL), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7, 11, 15 или 19; и

(ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую ДНК, кодирующую переменную область тяжелой цепи (VH), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 23, 27 или 31.

В некоторых вариантах осуществления первая молекула нуклеиновой кислоты содержит ДНК, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с первой молекулой нуклеиновой кислоты, выбранной из (i); вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит ДНК, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности со второй молекулой нуклеиновой кислоты, выбранной из (ii).

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная композиция содержит:

1) первую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую ДНК, кодирующую переменную область легкой цепи (VL), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7, и вторую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую ДНК, кодирующую переменную область тяжелой цепи (VH), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 23;

2) первую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую ДНК, кодирующую переменную область легкой цепи (VL), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7, и вторую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую ДНК, кодирующую переменную область тяжелой цепи (VH), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 27;

3) первую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую ДНК, кодирующую











последовательностью SEQ ID NO: 46, и вторую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую ДНК, кодирующую переменную область тяжелой цепи (VH), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 48.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная композиция содержит:

первую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую ДНК, кодирующую переменную область легкой цепи (VL), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 74, и вторую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую ДНК, кодирующую переменную область тяжелой цепи (VH), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 75.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная композиция содержит:

первую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую ДНК, кодирующую переменную область легкой цепи (VL), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 82, и вторую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую ДНК, кодирующую переменную область тяжелой цепи (VH), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 83.

В некоторых вариантах осуществления первая последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность ДНК, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с первой последовательностью нуклеиновой кислоты или со второй последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из 1)-15), соответственно.

В некоторых вариантах осуществления ДНК, кодирующая переменную область легкой цепи (VL), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7, соответствует SEQ ID NO: 8.

В некоторых вариантах осуществления ДНК, кодирующая переменную область легкой цепи (VL), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 11, соответствует SEQ ID NO: 12.

В некоторых вариантах осуществления ДНК, кодирующая переменную область легкой цепи (VL), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 15, соответствует SEQ ID NO: 16.

В некоторых вариантах осуществления ДНК, кодирующая переменную область легкой цепи (VL), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 19, соответствует SEQ ID NO: 20.

В некоторых вариантах осуществления ДНК, кодирующая переменную область легкой цепи (VL), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 46, соответствует SEQ ID NO: 47.

В некоторых вариантах осуществления ДНК, кодирующая переменную область легкой цепи (VL), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 74, соответствует SEQ ID NO: 76.

В некоторых вариантах осуществления ДНК, кодирующая переменную область

легкой цепи (VL), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 82, соответствует SEQ ID NO: 72.

В некоторых вариантах осуществления ДНК, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи (VH), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 23, соответствует SEQ ID NO: 24.

В некоторых вариантах осуществления ДНК, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи (VH), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 27, соответствует SEQ ID NO: 28.

В некоторых вариантах осуществления ДНК, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи (VH), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 31, соответствует SEQ ID NO: 32.

В некоторых вариантах осуществления ДНК, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи (VH), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 48, соответствует SEQ ID NO: 49.

В некоторых вариантах осуществления ДНК, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи (VH), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 75, соответствует SEQ ID NO: 77.

В некоторых вариантах осуществления ДНК, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи (VH), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 83, соответствует SEQ ID NO: 73.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная композиция содержит:

(I) первую последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую ДНК, кодирующую легкую цепь, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9, 13, 17, 21, 37, 39, 50 или 54; и

(II) вторую последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую ДНК, кодирующую тяжелую цепь, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 25, 29, 33, 35, 52 или 56.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная композиция содержит:

(I) первую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую ДНК, кодирующую легкую цепь, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9, 13, 17, 21, 37, 39 или 50; и

(II) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую ДНК, кодирующую тяжелую цепь, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 25, 29, 33, 35 или 52.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная композиция содержит:

(I) первую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую ДНК, кодирующую легкую цепь, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9, 13, 17 или 21; и

(II) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую ДНК, кодирующую тяжелую цепь, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 25, 29











SEQ ID NO: 57.

В еще одном отношении изобретение относится к вектору, содержащему нуклеотидную композицию по изобретению.

В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой эукариотический экспрессирующий вектор, прокариотический экспрессирующий вектор или вирусный вектор.

В еще одном отношении изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей вектор по изобретению.

В некоторых вариантах осуществления клетку-хозяин, содержащую вектор, получают векторной трансформацией.

В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой бактериальную клетку, дрожжевую или клетку млекопитающего.

В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетки *escherichia coli*, дрожжевые клетки *richia*, клетки яичника китайского хомячка или эмбриональные клетки почки человека 293.

В еще одном отношении изобретение относится к способу получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, включающему экспрессию антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в клетке-хозяине по изобретению и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

В еще одном отношении изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество вышеупомянутого выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

В еще одном отношении изобретение относится к агенту для детекции LIF в биологических образцах, содержащих вышеупомянутое выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления биологические образцы представляют собой кровь, сыворотку, мочу, материалы биопсии, опухоль или любые ткани, предположительно имеющие аномальные уровни LIF.

В другом отношении изобретение относится к способу ингибирования экспрессии LIF и/или блокирования активности LIF, включающему введение пациенту терапевтически эффективного количества вышеупомянутого выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и/или вышеуказанной фармацевтической композиции.

В еще одном отношении изобретение относится к применению указанного выше выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и/или указанной выше фармацевтической композиции в производстве лекарственного средства, применяемого для ингибирования экспрессии LIF и/или блокирования активности LIF.

В еще одном отношении изобретение относится к вышеупомянутому выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту и/или к вышеупомянутой

фармацевтической композиции для применения при ингибировании экспрессии LIF и/или блокировании активности LIF.

В другом отношении изобретение относится к способу лечения заболевания или состояния, связанного с LIF, включающему введение пациенту терапевтически эффективного количества вышеупомянутого выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и/или вышеупомянутой фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние, связанное с LIF, представляет собой опухоль. В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой солидную опухоль. В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль включает глиобластому, рак легкого, рак яичников, колоректальный рак, рак поджелудочной железы или рак предстательной железы.

В еще одном отношении изобретение относится к применению вышеупомянутого выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и/или вышеупомянутой фармацевтической композиции в производстве лекарственного средства для лечения заболевания или состояния, связанного с LIF. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние, связанное с LIF, представляет собой опухоль. В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой солидную опухоль. В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль включает глиобластому, рак легкого, рак яичников, колоректальный рак, рак поджелудочной железы или рак предстательной железы.

В еще одном отношении изобретение относится к вышеупомянутому выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту и/или к вышеупомянутой фармацевтической композиции для применения при лечении заболевания или состояния, связанного с LIF. В некоторых вариантах осуществления заболевание, связанное с LIF, представляет собой опухоль. В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой солидную опухоль. В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль включает глиобластому, рак легкого, рак яичников, колоректальный рак, рак поджелудочной железы или рак предстательной железы.

Заболевание или состояние, связанное с LIF, означает, что блокирование LIF и LIRR и/или GP130 может лечить, ослаблять, облегчать и/или стабилизировать заболевание или состояние.

В другом отношении изобретение относится к способу детектирования LIF в биологических образцах, включающему (i) получение образца ткани или жидкости пациента, (ii) воздействие на образец ткани или жидкости вышеупомянутого выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или вышеупомянутого реагента; и (iii) сравнение связывания LIF с образцом ткани или жидкости из (ii) со связыванием LIF с контрольным образцом, где увеличение количества связанного LIF по сравнению с контрольным образцом демонстрирует аномальный уровень продукции, экспрессии или активации LIF.

В некоторых вариантах осуществления образец ткани или жидкости содержит

кровь, сыворотку, мочу, материалы биопсии, опухоль или любые ткани, предположительно имеющие аномальные уровни LIF.

Таблица I Описание последовательности антител по изобретению

Последовательность No.	Последовательность
SEQ ID NO:1 (LCDR1 aa 38E10E1C11, гуманизированное антитело против LIF или Химерное 38E)	RASENIYSYLA
SEQ ID NO:2 (LCDR2 aa 38E10E1C11, гуманизированное антитело против LIF или Химерное 38E)	NAKTLAE
SEQ ID NO:3 (LCDR3 aa 38E10E1C11, гуманизированное антитело против LIF или Химерное 38E)	QHNYVTPLT
SEQ ID NO:4 (HCDR1 aa 38E10E1C11, гуманизированное антитело против LIF or Химерное 38E)	SYAMS
SEQ ID NO:5 (HCDR2 aa гуманизированное антитело против LIF)	TISSGGSNTYSPDTVKG
SEQ ID NO:6 (HCDR3 aa 38E10E1C11, гуманизированное антитело против LIF или Химерное 38E)	YYGYFDF
SEQ ID NO:7 (VL1, aa)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAWYQQKPGKSPKLLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHNYVTPLTFGQGTKLEIKR
SEQ ID NO:8 (VL1, nt)	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAGG GCCAGCGAGAACATCTACAGCTACCTGGCCTGGTACC AGCAGAAGCCCCGCAAGAGCCCCAAGCTGCTGGTGT ACAACGCCAAGACCCTGGCCGAGGGCGTGCCCAGCA GGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCT GACCATCAGCAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACC TACTACTGCCAGCACCACTACGTGACCCCCCTGACCT TCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGAGG
SEQ ID NO:9(полноразмерная легкая цепь 1, aa)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAWYQQKPGKSPKLLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHNYVTPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

<p>SEQ ID NO:10(полноразмерная легкая цепь 1, nt)</p>	<p>GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGC GCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAGG GCCAGCGAGAACATCTACAGCTACCTGGCCTGGTACC AGCAGAAGCCCCGGCAAGAGCCCCAAGCTGCTGGTGT ACAACGCCAAGACCCTGGCCGAGGGCGTGCCCAGCA GGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCT GACCATCAGCAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACC TACTACTGCCAGCACCACTACGTGACCCCCCTGACCT TCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGAGGACCG TGGCCGCCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGA CGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTG CCTGCTGAACAACCTTCTACCCCAGGGAGGCCAAGGTG CAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAAC AGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGAC AGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGC AAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGGTGTACGCCTGC GAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCAGCCCCGTGACC AAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC</p>
<p>SEQ ID NO:11(VL2, aa)</p>	<p>DIHMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAWYQQK PGKSPKLLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYCQHHYVTPITFGQGTKLEIKR</p>
<p>SEQ ID NO:12 (VL2, nt)</p>	<p>GACATCCACATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGC GCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAGG GCCAGCGAGAACATCTACAGCTACCTGGCCTGGTACC AGCAGAAGCCCCGGCAAGAGCCCCAAGCTGCTGGTGT ACAACGCCAAGACCCTGGCCGAGGGCGTGCCCAGCA GGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCT GACCATCAGCAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACC TACTACTGCCAGCACCACTACGTGACCCCCCTGACCT TCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGAGG</p>
<p>SEQ ID NO:13 (полноразмерная легкая цепь 2, aa)</p>	<p>DIHMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAWYQQK PGKSPKLLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYCQHHYVTPITFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKIDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>

<p>SEQ ID NO:14 (полноразмерная легкая цепь 2, nt)</p>	<p>GACATCCACATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGC GCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAGG GCCAGCGAGAACATCTACAGCTACCTGGCCTGGTACC AGCAGAAGCCCGGCAAGAGCCCCAAGCTGCTGGTGT ACAACGCCAAGACCCTGGCCGAGGGCGTGCCCAGCA GGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCT GACCATCAGCAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACC TACTACTGCCAGCACCACTACGTGACCCCCCTGACCT TCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGAGGACCG TGGCCGCCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGA CGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTG CCTGCTGAACAACCTTCTACCCCAGGGAGGCCAAGGTG CAGTGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAAC AGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGAC AGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGC AAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGC GAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCAGCCCCGTGACC AAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC</p>
<p>SEQ ID NO:15(VL3, aa)</p>	<p>DIHMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAWYQQK PGKSPQLLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFTLTSSLQ PEDFATYYCQHHYVTPLTFGQGTKLEIKR</p>
<p>SEQ ID NO:16 (VL3, nt)</p>	<p>GACATCCACATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGC GCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAGG GCCAGCGAGAACATCTACAGCTACCTGGCCTGGTACC AGCAGAAGCCCGGCAAGAGCCCCCAGCTGCTGGTGT ACAACGCCAAGACCCTGGCCGAGGGCGTGCCCAGCA GGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCCAGTTCACCCT GACCATCAGCAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACC TACTACTGCCAGCACCACTACGTGACCCCCCTGACCT TCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGAGG</p>
<p>SEQ ID NO:17 (полноразмерная легкая цепь 3, aa)</p>	<p>DIHMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAWYQQK PGKSPQLLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFTLTSSLQ PEDFATYYCQHHYVTPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>

<p>SEQ ID NO:18 (полноразмерная легкая цепь 3, nt)</p>	<p>GACATCCACATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGC GCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAGG GCCAGCGAGAACATCTACAGCTACCTGGCCTGGTACC AGCAGAAGCCCCGGCAAGAGCCCCCAGCTGCTGGTGT ACAACGCCAAGACCCTGGCCGAGGGCGTGCCCAGCA GGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCCAGTTCACCCT GACCATCAGCAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACC TACTACTGCCAGCACCACTACGTGACCCCCCTGACCT TCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGAGGACCG TGGCCGCCCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGA CGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTG CCTGCTGAACAACCTTCTACCCCAGGGAGGCCAAGGTG CAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAAC AGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGAC AGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGC AAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGC GAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCAGCCCCGTGACC AAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC</p>
<p>SEQ ID NO:19(VL4, aa)</p>	<p>DIHMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAWYQQK QGKSPQLLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFTLKINSL QPEDFATYYCQHNYVTPLTFGQGTKLEIKR</p>
<p>SEQ ID NO:20(VL4, nt)</p>	<p>GACATCCACATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGC GCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAGG GCCAGCGAGAACATCTACAGCTACCTGGCCTGGTACC AGCAGAAGCAGGGCAAGAGCCCCCAGCTGCTGGTGT ACAACGCCAAGACCCTGGCCGAGGGCGTGCCCAGCA GGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCCAGTTCACCCT GAAGATCAACAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCAC CTACTACTGCCAGCACCACTACGTGACCCCCCTGACC TTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGAGG</p>
<p>SEQ ID NO:21(полноразмерная легкая цепь 4, aa)</p>	<p>DIHMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAWYQQK QGKSPQLLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFTLKINSL QPEDFATYYCQHNYVTPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>

<p>SEQ ID NO:22(полноразмерная легкая цепь 4, nt)</p>	<p>GACATCCACATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGC GCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAGG GCCAGCGAGAACATCTACAGCTACCTGGCCTGGTACC AGCAGAAGCAGGGCAAGAGCCCCCAGCTGCTGGTGT ACAACGCCAAGACCCTGGCCGAGGGCGTGCCCAGCA GGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCCAGTTCACCCT GAAGATCAACAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCAC CTACTACTGCCAGCACCCTACGTGACCCCCCTGACC TTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGAGGACC GTGGCCGCCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCG ACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGT GCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCAGGGAGGCCAAGGT GCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAA CAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGA CAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGAGC AAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGGTGTACGCCTGC GAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCAGCCCCGTGACC AAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC</p>
<p>SEQ ID NO:23(VH1 , aa)</p>	<p>EVMLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFIFSSYAMS WVRQAPGTGLEWVATISSGGSNTYSPDVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYYGYYFD FWGQGTLLTVSS</p>
<p>SEQ ID NO:24(VH1, nt)</p>	<p>GAGGTGATGCTGCTGGAGAGCGGCGGGCGGCCTGG TGCAGCCCCGGCGGCAGCCTGAGGCTGAGCTGCGC CGCCAGCGGCTTCATCTTCAGCAGCTACGCCATG AGCTGGGTGAGGCAGGCCCCCGGCACCGGCCTGG AGTGGGTGGCCACCATCAGCAGCGGCGGCAGCAA CACCTACAGCCCCGACACCGTGAAGGGCAGGTTTC ACCATCAGCAGGGACAACAGCAAGAACACCCTGT ACCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACAC CGCCGTGTACTACTGCGCCAGGTACTACGGCTAC TACTTCGACTTCTGGGGCCAGGGCACCCCTGCTGA CCGTGAGCAGC</p>
<p>SEQ ID NO:25(полноразмерная тяжелая цепь 1, aa)</p>	<p>EVMLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFIFSSYAMS WVRQAPGTGLEWVATISSGGSNTYSPDVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYYGYYFD FWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY ASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>

SEQ ID  
NO:26(полноразмерная  
тяжелая цепь 1, nt)

GAGGTGATGCTGCTGGAGAGCGGCGGCGGCCTGG  
TGCAGCCCGGCGGCAGCCTGAGGCTGAGCTGCGC  
CGCCAGCGGCTTCATCTTCAGCAGCTACGCCATG  
AGCTGGGTGAGGCAGGCCCGGCACCGGCCTGG  
AGTGGGTGGCCACCATCAGCAGCGGCGGCAGCAA  
CACCTACAGCCCCGACACCGTGAAGGGCAGGTTC  
ACCATCAGCAGGGACAACAGCAAGAACACCCTGT  
ACCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACAC  
CGCCGTGTAATACTGCGCCAGGTACTACGGCTAC  
TACTTCGACTTCTGGGGCCAGGGCACCCCTGCTGA  
CCGTGAGCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGT  
GTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCCAGC  
GGCGGCACCGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGG  
ACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGAGCTGGAA  
CAGCGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTC  
CCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCC  
TGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCAGCAGCAGCCT  
GGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCAC  
AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTG  
GAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCC  
CCCCCTGCCCGCCCCCGAGCTGCTGGGCGGCC  
CAGCGTGTTCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGAC  
ACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCT  
GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCCGA  
GGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG  
GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAG  
CAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGAAGCGTGC  
TGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAA  
GGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGCCCT  
GCCCCCCCCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCC  
AAGGGCCAGCCAGGGAGCCCCAGGTGTACACCC  
TGCCCCCAGCAGGGAGGAGATGACCAAGAACC  
AGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTA  
CCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAC  
GGCCAGCCCGAGAACAATAACAAGACCACCCCC  
CCGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTA  
CAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA  
GCAGGGCAACGTGTTTCACTGCAGCGTGATGCAC  
GAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCC  
TGAGCCTGAGCCCCGGCAAG

SEQ ID NO:27(VH2, aa)	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFISSYAMSWVR QAPGTGLEWVATISSGGSNTYSPDTVKGFRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAMYYCARYYGYYFDFWGGQTLL TVSS
SEQ ID NO:28(VH2,nt)	GAGGTGATGCTGGTGGAGAGCGGCGGCGGCCTGGTG CAGCCCGGCGGCAGCCTGAGGCTGAGCTGCGCCGCC AGCGGCTTCATCTTCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGG TGAGGCAGGCCCGGCGCACCGGCCTGGAGTGGGTGG CCACCATCAGCAGCGGCGGCAGCAACACCTACAGCC CCGACACCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGG ACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACA GCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCATGTACTACTGCG CCAGGTA CTACGGCTACTACTTCGACTTCTGGGGCCA GGGCACCCTGCTGACCGTGAGCAGC
SEQ ID NO:29(полноразмерная тяжелая цепь 2, aa)	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFISSYAMSWVR QAPGTGLEWVATISSGGSNTYSPDTVKGFRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAMYYCARYYGYYFDFWGGQTLL TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

<p>SEQ ID NO:30 (полноразмерная тяжелая цепь 2, nt)</p>	<p>GAGGTGATGCTGGTGGAGAGCGGCGGCGGCCTGGTG CAGCCCGGCGGCAGCCTGAGGCTGAGCTGCGCCGCC AGCGGCTTCATCTTCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGG TGAGGCAGGCCCCCGGCACCGGCCTGGAGTGGGTGG CCACCATCAGCAGCGGCGGCAGCAACACCTACAGCC CCGACACCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGG ACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACA GCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCATGTACTACTGCG CCAGGTACTIONACGGCTACTACTTCGACTTCTGGGGCCA GGGCACCCTGCTGACCGTGAGCAGCGCCAGCACCAA GGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAG AGCACCAGCGGCGGCACCGCCGCCCTGGGCTGCCTG GTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGAGCT GGAACAGCGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACACT TCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCT GAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCAGCAGCAGCCTGGG CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCC AGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAG AGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCCTGCCCCG CCCCCGAGCTGCTGGGGCGGCCCCAGCGTGTTCCCTGTT CCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAG GACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCC CAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGT GAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAA CGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGC CCTGCCCGCCCCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGC CAAGGGCCAGCCCAGGGAGCCCCAGGTGTACACCCT GCCCCCAGCAGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGT GAGCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCC GAGAACAATAACAAGACCACCCCCCGTGCTGGAC AGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCG TGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCA GCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACT ACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG</p>
<p>SEQ ID NO:31 (VH3, aa)</p>	<p>EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFIFSSYAMS WVRQAPETRLWVATISSGGSNTYSPDVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCARYYGYYFD FWGQGTLTVSS</p>

<p>SEQ ID NO:32(VH3,nt)</p>	<p>GAGGTGATGCTGGTGGAGAGCGGCGGCCTGG  TGCAGCCCGGCGGCAGCCTGAGGCTGAGCTGCGC  CGCCAGCGGCTTCATCTTCAGCAGCTACGCCATG  AGCTGGGTGAGGCAGGCCCGAGACCAGGCTGG  AGTGGGTGGCCACCATCAGCAGCGGCGGCAGCAA  CACCTACAGCCCCGACACCGTGAAGGGCAGGTTC  ACCATCAGCAGGGACAACAGCAAGAACCCTGT  ACCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACAC  CGCCATGTACTACTGCGCCAGGTACTACGGCTAC  TACTTCGACTTCTGGGGCCAGGGCACCTGCTGA  CCGTGAGCAGC</p>
<p>SEQ ID  NO:33(полноразмерная  тяжелая цепь 3, aa)</p>	<p>EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFIFSSYAMS  WVRQAPETRLEWVATISSGGSNTYSPDTVKGRFTIS  RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAMYCYARYYGYFD  FWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG  CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS  LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC  DKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT  CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY  ASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE  KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF  YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT  VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>

<p>SEQ ID NO:34(полноразмерная тяжелая цепь 3, nt)</p>	<p>GAGGTGATGCTGGTGGAGAGCGGCGGCGGCCTGGTG CAGCCCGGCGGCAGCCTGAGGCTGAGCTGCGCCGCC AGCGGCTTCATCTTCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGG TGAGGCAGGCCCCCGAGACCAGGCTGGAGTGGGTGG CCACCATCAGCAGCGGCGGCAGCAACACCTACAGCC CCGACACCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGG ACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACA GCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCATGTACTACTGCG CCAGGTACTIONACTACTTTCGACTTCTGGGGCCA GGGCACCCTGCTGACCGTGAGCAGCGCCAGCACCAA GGGCCCCAGCGTGTTCCTCCCTGGCCCCCAGCAGCAAG AGCACCAGCGGCGGCACCGCCGCCCTGGGCTGCCTG GTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGAGCT GGAACAGCGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCT TCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCT GAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCAGCAGCAGCCTGGG CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCC AGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAG AGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCCG CCCCCGAGCTGCTGGGCGGCCCCAGCGTGTTCCTGTT CCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAG GACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCC CAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGT GAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAA CGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGC CCTGCCCGCCCCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGC CAAGGGCCAGCCCAGGGAGCCCCAGGTGTACACCCT GCCCCCAGCAGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGT GAGCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCC GAGAACAACTACAAGACCACCCCCCGTGCTGGAC AGCGACGGCAGCTTCTCCTGTACAGCAAGCTGACCG TGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCA GCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACT ACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG</p>
<p>SEQ ID NO:35(38E HuH3L2-m или 38E HuH3L4-m полноразмерная тяжелая цепь,aa)</p>	<p>EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFIFSSYAMSWVR QAPETRLIEWVATISSGGSNTYSPDTVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAMYYCARYYGYYFDFWGQGTLL TVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFP EPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTPSS TWPSETVTCNV AHPASSTKVDKIVPRDCGCKPCICTVP EVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVT CVVDISKDDPEVQF SWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDW LNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPP PKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAEN YKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSV LHEGLHNHHTKSLSHSPGK</p>

<p>SEQ ID NO:36(38E HuH3L2-m или 38E HuH3L4-m полноразмерная тяжелая цепь, nt)</p>	<p>GAGGTGATGCTGGTGGAGAGCGGCGGGCGGCCTGGTG CAGCCCGGCGGCAGCCTGAGGCTGAGCTGCGCCGCC AGCGGCTTCATCTTCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGG TGAGGCAGGCCCGGAGACCAGGCTGGAGTGGGTGG CCACCATCAGCAGCGGCGGCAGCAACACCTACAGCC CCGACACCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGG ACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACA GCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCATGTACTACTGCG CCAGGTACTIONACGGCTACTACTTCGACTTCTGGGGCCA GGGCACCCTGCTGACCGTGAGCAGCGCCAAGACCAC CCCCCCCAGCGTGTACCCCTGGCCCCCGGCAGCGCC GCCAGACCAACAGCATGGTGACCCTGGGCTGCCTG GTGAAGGGTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGACCT GGAACAGCGGCAGCCTGAGCAGCGGCGTGCACACCT TCCCCGCCGTGCTGCAGAGCGACCTGTACACCCTGAG CAGCAGCGTGACCGTGCCCAGCAGCACCTGGCCCAG CGAGACCGTGACCTGCAACGTGGCCCACCCCGCCAG CAGCACCAAGGTGGACAAGAAGATCGTGCCCAGGGA CTGCGGCTGCAAGCCCTGCATCTGCACCGTGCCCGAG GTGAGCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCCAAGCCCAAGG ACGTGCTGACCATCACCCCTGACCCCAAGGTGACCTG CGTGGTGGTGGACATCAGCAAGGACGACCCCGAGGT GCAGTTCAGCTGGTTCGTGGACGACGTGGAGGTGCAC ACCGCCCAGACCCAGCCAGGGAGGAGCAGTTCAAC AGCACCTTCAGGAGCGTGAGCGAGCTGCCCATCATGC ACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTTCAAGTGCA GGGTGAACAGCGCCGCCTTCCCCGCCCCCATCGAGAA GACCATCAGCAAGACCAAGGGCAGGCCCAAGGCCCC CCAGGTGTACACCATCCCCCCCCCAAGGAGCAGATG GCCAAGGACAAGGTGAGCCTGACCTGCATGATCACC GACTTCTTCCCCGAGGACATCACCGTGGAGTGGCAGT GGAACGGCCAGCCCGCCGAGAACTACAAGAACACCC AGCCCATCATGGACACCGACGGCAGCTACTTCGTGTA CAGCAAGCTGAACGTGCAGAAGAGCAACTGGGAGGC CGGCAACACCTTCACCTGCAGCGTGCTGCACGAGGGC CTGCACAACCACACACCGAGAAGAGCCTGAGCCAC AGCCCCGGCAAG</p>
<p>SEQ ID NO:37 (38E HuH3L2-m полноразмерная легкая цепь, aa)</p>	<p>DIHMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAWYQQK PGKSPKLLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQ PEDFATYYCQHHYVTPFTFGQGTKLEIKRADAAPTVISIF PPSSEQLTSGGASVVCFLNMFYPKDINVKWKIDGSRQN GVLNSWTDQDSKDYMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCE ATHKTSTSPIVKSFNREK</p>

<p>SEQ ID NO:38 (38E HuH3L2-m полноразмерная легкая цепь, nt)</p>	<p>GACATCCACATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGC GCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAGG GCCAGCGAGAACATCTACAGCTACCTGGCCTGGTACC AGCAGAAGCCCCGGCAAGAGCCCCAAGCTGCTGGTGT ACAACGCCAAGACCCTGGCCGAGGGCGTGCCCAGCA GGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCCGACTTCACCCT GACCATCAGCAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACC TACTACTGCCAGCACCACTACGTGACCCCCCTGACCT TCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGAGGGCCG ACGCCGCCCCACCCTGAGCATCTTCCCCCCCAGCAG CGAGCAGCTGACCAGCGGCGGCGCCAGCGTGGTGTG CTTCCTGAACAACCTTCTACCCCAAGGACATCAACGTG AAGTGGAAGATCGACGGCAGCGAGAGGCAGAACGGC GTGCTGAACAGCTGGACCGACCAGGACAGCAAGGAC AGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTGACCCTGACC AAGGACGAGTACGAGAGGCACAACAGCTACACCTGC GAGGCCACCCACAAGACCAGCACCCCATCGTG AAGAGCTTCAACAGGAACGAGTG</p>
<p>SEQ ID NO:39(38E HuH3L4-m полноразмерная легкая цепь, aa)</p>	<p>DIHMTQSPSSLSASVGDRTITCRASENIYSYLAWYQQK QGKSPQLLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFTLKINSL QPEDFATYYCQHHYVTPLTFGQGTKLEIKRADAAPT VSI FPPSSEQLTSGGASVVCFLNMFYPKDINVKWKIDGSERQ NGVLNSWTDQDSKDYMSSTLTLTKDEYERHNSYTC EATHKTSTSPIVKSFNREK</p>
<p>SEQ ID NO:40 (38E HuH3L4-m полноразмерная легкая цепь, nt)</p>	<p>GACATCCACATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGC GCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAGG GCCAGCGAGAACATCTACAGCTACCTGGCCTGGTACC AGCAGAAGCAGGGCAAGAGCCCCCAGCTGCTGGTGT ACAACGCCAAGACCCTGGCCGAGGGCGTGCCCAGCA GGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCCAGTTCACCCT GAAGATCAACAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCAC CTACTACTGCCAGCACCACTACGTGACCCCCCTGACC TTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGAGGACC GTGGCCGCCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCG ACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGT GCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCAAGGAGGCCAAGGT GCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAA CAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGA CAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGAGC AAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGC GAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCAGCCCCGTGACC AAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTG</p>
<p>SEQ ID NO:41 (38E10E1C11 полноразмерная легкая цепь aa)</p>	<p>DIHMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLAWYQQK QGKSPQLLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSL QPEDFGSYCQHHYVTPLTFGAGTKLELKRADAAPT VSI IFPPSSEQLTSGGASVVCFLNMFYPKDINVKWKIDGSER QNGVLNSWTDQDSKDYMSSTLTLTKDEYERHNSYT CEATHKTSTSPIVKSFNREK</p>

<p>SEQ ID NO:42 (38E10E1C11 полноразмерная легкая цепь nt)</p>	<p>GACATCCACATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTG CATCTGTGGGAGAACTGTCACCATCACATGTCGAGC AAGTGAGAATATTTACAGTTATTTAGCATGGTATCAG CAGAAACAGGGAAAATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATA ATGCAAAAACCTTAGCAGAAGGTGTGCCATCAAGGT TCAGTGGCAGTGGATCAGGCACACAGTTTTCTCTGAA GATCAACAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGGGAGTTAT TACTGTCAACATCATTATGTTACTCCGCTCACGTTCCG TGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGGGCTGATGC TGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAG CAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCT TGAACAACCTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTG GAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCCT GAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCAC CTACAGCATGAGCAGCACCCCTCACGTTGACCAAGGA CGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGC CACTCACAAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGC TTCAACAGGAATGAGTGT</p>
<p>SEQ ID NO:43 (38E10E1C11 полноразмерная тяжелая цепь aa)</p>	<p>EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFIFSSYAMSWVR QSPETRLWVATISSGGSNTYSPDSVKGRFTISRDNKN TLYLQMSSLRSEDAMYYCARYYGYFFDFWGQGTLLT VSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEP VTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTW PSETVTCNV AHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEV SSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSW FVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLN GKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPK EQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYK NTQPIMDTDGSYFVYSKLVNPKSNWEAGNTFTCSVLHE GLHNHHTKSLSHSPGK</p>

<p>SEQ ID NO:44(38E10E1C11 полноразмерная тяжелая цепь nt)</p>	<p>GAAGTGATGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTG AAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCT CTGGATTCATTTTCAGTAGTTATGCCATGTCTTGGGTT CGCCAGAGTCCGGAGACGAGGCTGGAGTGGGTTCGCA ACCATTAGTAGTGGTGGTAGTAACACCTACTCTCCAG ACAGTGTGAAGGGGCGATTACCATCTCCAGAGACA ATGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCT GAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAG ATATTATGGTTACTACTTTGACTTCTGGGGCCAAGGC ACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCC CATCTGTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCCCA AACTAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAG GGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGA CTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGC TGTCCTGCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCA GTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCGAGACCG TCACCTGCAACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCACCAA GGTGGACAAGAAAATTGTGCCAGGGATTGTGGTTGT AAGCCTTGCATATGTACAGTCCCAGAAGTATCATCTG TCTTCATCTTCCCCCAAGCCCAAGGATGTGCTCAC CATTA CTGACTCCTAAGGTACAGTGTGTTGTGGTA GACATCAGCAAGGATGATCCCAGAGTCCAGTTCAGCT GGTTTGTAGATGATGTGGAGGTGCACACAGCTCAGAC GCAACCCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACTTCCG CTCAGTCAGTGA ACTTCCCATCATGCACCAGGACTGG CTCAATGGCAAGGAGTTCAAATGCAGGGTCAACAGT GCAGCTTTCCTGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCA AAACCA AAGGCAGACCGAAGGCTCCACAGGTGTACA CCATTCCACCTCCCAAGGAGCAGATGGCCAAGGATA AAGTCAGTCTGACCTGCATGATAACAGACTTCTTCCC TGAAGACATTACTGTGGAGTGGCAGTGGAAATGGGCA GCCAGCGGAGAACTACAAGA AACTCAGCCCATCAT GGACACAGATGGCTCTTACTTCGTCTACAGCAAGCTC AATGTGCAGAAGAGCAACTGGGAGGCAGGAAATACT TTCACCTGCTCTGTGTTACATGAGGGCCTGCACAACC ACCATACTGAGAAGAGCCTCTCCCACTCTCCTGGTAA A</p>
<p>SEQ ID NO:45 (38E10E1C11或Химерное 38E HCDR2 aa)</p>	<p>TISSGGSNTYSPDSVKG</p>
<p>SEQ ID NO:46 (Химерное 38E VL aa)</p>	<p>DIHMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLAWYQQK QGKSPQLLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSL QPEDFGSYQCQHHYVTPLTFGAGTKLELKR</p>
<p>SEQ ID NO:47 (Химерное 38E VL nt)</p>	<p>GACATCCACATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTG CATCTGTGGGAGAACTGTCACCATCACATGTCGAGC AAGTGAGAATATTTACAGTTATTTAGCATGGTATCAG CAGAAACAGGGAAAATCTCCTCAGCTCCTGTCTATAA TGCAAAAACCTTAGCAGAAGGTGTGCCATCAAGGTTC AGTGGCAGTGGATCAGGCACACATTTTCTCTGAAGAT CAACAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGGGAGTTATTAC TGTC AACATCATTATGTTACTCCGCTCACGTTCCGGTGC TGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGGGC</p>

SEQ ID NO:48 (Химерное 38E VH aa)	EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFIFSSYAMSWVR QSPETRLEWVATISSGGSNTYSPDSVKGRFTISRDNANKN TLYLQMSSLRSEDAMYYCARYYGYFFDFWGGQTTLT VSS
SEQ ID NO:49 (Химерное 38E VH nt)	GAAGTGATGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTG AAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCT CTGGATTCATTTTCAGTAGTTATGCCATGTCTTGGGTT CGCCAGAGTCCGGAGACGAGGCTGGAGTGGGTTCGCA ACCATTAGTAGTGGTGGTAGTAACACCTACTCTCCAG ACAGTGTGAAGGGGCGATTACCATCTCCAGAGACA ATGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCT GAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAG ATATTATGGTTACTACTTTGACTTCTGGGGCCAAGGC ACCACTCTCACAGTCTCCTCA
SEQ ID NO:50 (Химерное 38E полноразмерная легкая цепь aa)	DIHMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLAWYQQK QGKSPQLLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSL QPEDFGSYQCQHHYVTPLTFGAGTKLELKRVAAPSVEI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:51 (Химерное 38E полноразмерная легкая цепь nt)	GACATCCACATGACCCAGAGCCCCGCCAGCCTGAGC GCCAGCGTGGGCGAGACCGTGACCATCACCTGCAGG GCCAGCGAGAACATCTACAGCTACCTGGCCTGGTACC AGCAGAAGCAGGGCAAGAGCCCCCAGCTGCTGGTGT ACAACGCCAAGACCCTGGCCGAGGGCGTGCCAGCA GGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCCAGTTCAGCC TGAAGATCAACAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGGCA GCTACTACTGCCAGCACCACTACGTGACCCCCCTGAC CTTCGGCGCCGGCACCAAGCTGGAGCTGAAGAGGAC CGTGGCCGCCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGC GACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTG TGCCTGCTGAACAATTCTACCCCAGGGAGGCCAAGG TGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCA ACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGG ACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGA GCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCT GCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCAGCCCCGTGA CCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC
SEQ ID NO:52 (Химерное 38E полноразмерная тяжелая цепь aa)	EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFIFSSYAMSWVR QSPETRLEWVATISSGGSNTYSPDSVKGRFTISRDNANKN TLYLQMSSLRSEDAMYYCARYYGYFFDFWGGQTTLT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCP APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

<p>SEQ ID NO:53 (Химерное 38E полноразмерная тяжелая цепь nt)</p>	<p>GAGGTGATGCTGGTGGAGAGCGGCGGCGGCCTGGTG AAGCCCGGCGGCAGCCTGAAGCTGAGCTGCGCCGCC AGCGGCTTCATCTTCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGG TGAGGCAGAGCCCCGAGACCAGGCTGGAGTGGGTGG CCACCATCAGCAGCGGCGGCAGCAACACCTACAGCC CCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGG ACAACGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAGCA GCCTGAGGAGCGAGGACACCGCCATGTACTACTGCG CCAGGTACTIONACGGCTACTACTTCGACTTCTGGGGCCA GGGCACCACCCTGACCGTGAGCAGCGCCAGCACCAA GGGCCCCAGCGTGTTCCTCCCTGGCCCCCAGCAGCAAG AGCACCAGCGGCGGCACCGCCGCCCTGGGCTGCCTG GTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGAGCT GGAACAGCGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCT TCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCT GAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCAGCAGCAGCCTGGG CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCC AGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAG AGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCCG CCCCCGAGCTGCTGGGCGGCCCCAGCGTGTTCCTGTT CCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAG GACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCC CAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGT GAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAA CGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGC CCTGCCCGCCCCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGC CAAGGGCCAGCCAGGGAGCCCCAGGTGTACACCCT GCCCCCAGCAGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGT GAGCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCC GAGAACAACTACAAGACCACCCCCCGTGCTGGAC AGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCG TGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCA GCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACT ACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG</p>
<p>SEQ ID NO:54 (P36-033 полноразмерная легкая цепь aa)</p>	<p>DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSNAVAWYQ QKPGQSPRLLIYWASFRHTGVPDRFTGSGSGTEYTLTIS RVQAEDLALYYCQQHYNTPYTFGGGTRLEIKRADAAPT VSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNFPKDIVKWKIDGSE RQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNS YTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC</p>

<p>SEQ ID NO:55 (P36-033 полноразмерная легкая цепь nt)</p>	<p>GACATCGTGATGACCCAGTCCCACAAGTTCATGAGCA CCAGCGTGGGCGATCGGGTGTCCATCACCTGTAAGGC CTCCCAGGACGTGAGCAACGCCGTGGCCTGGTATCAG CAGAAGCCTGGCCAGTCCCCTCGGCTGCTGATCTATT GGGCTTCCTTCAGGCACACCGGCGTGCCCGATCGGTT CACCGGCTCCGGATCCGGCACCCGAGTATACCCTGACC ATCTCCCGGGTGCAGGCCGAGGATCTGGCTCTGTATT ATTGTCAGCAGCACTACAATAACCCCTACACCTTCGG CGGCGGCACCAGGCTGGAGATCAAGAGAGCTGATGC TGCCCCACCGTGAGCATCTTCCCTCCCTCCAGCGAG CAGCTGACCTCCGGCGGAGCCTCCGTGGTGTGCTTCC TGAACAACCTTCTACCCCAAGGATATCAACGTGAAGTG GAAGATCGACGGCAGCGAGCGGCAGAATGGCGTGCT GAACTCCTGGACCGACCAGGACAGCAAGGACTCCAC CTATTCCATGTCCTCCACCCTGACCCTGACCAAGGAT GAGTACGAGCGGCACAACAGCTATACCTGTGAGGCC ACCCACAAGACCTCCACCTCCCCCATCGTGAAGTCCT TCAATAGGAATGAGTGC</p>
<p>SEQ ID NO:56 (P36-033 полноразмерная тяжелая цепь aa)</p>	<p>EVMLVESGGGLVQPGGSRRLSCAASGFTFSSYPFWVR QTPEKRMEWVAYISNGGDSTYYPDTVKGRFTVSRDNA KNTLYLQMSSLKSVDTAIYYCVRPSARYDEWFAYWGQ GTLVTVSAAKTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVK GYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVT VPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKIVPRDCGCKPCI CTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTCVVVDISKDDP EVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMH QDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQV YTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQ PAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTF TCSVLHEGLHNHHTTEKSLSHSPGK</p>

<p>SEQ ID NO:57 (P36-033 полноразмерная тяжелая цепь nt)</p>	<p>GAGGTGATGCTGGTGGAGAGCGGCGGCGGCCTGGTG CAGCCCGGCGGCAGCAGGAGGCTGAGCTGCGCCGCC AGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACCCCATGTTCTGGG TGAGGCAGACCCCGAGAAGAGGATGGAGTGGGTGG CCTACATCAGCAACGGCGGCGACAGCACCTACTACCC CGACACCGTGAAGGGCAGGTTACCCGTGAGCAGGGA CAACGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAGCAG CCTGAAGAGCGTGGACACCGCCATCTACTACTGCGTG AGGCCAGCGCCAGGTACGACGAGTGGTTCGCCTACT GGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGCGCCA AGACCACCCCGCCAGCGTGTACCCCTGGCCCCCGG CAGCGCCGCCAGACCAACAGCATGGTGACCCTGGG CTGCCTGGTGAAGGGCTACTTCCCCGAGCCCGTGACC GTGACCTGGAACAGCGGCAGCCTGAGCAGCGGCGTG CACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCGACCTGTACA CCCTGAGCAGCAGCGTGACCGTGCCCAGCAGCACCT GGCCAGCGAGACCGTGACCTGCAACGTGGCCCACC CCGCCAGCAGCACCAGGTGGACAAGAAGATCGTGC CCAGGGACTGCGGCTGCAAGCCCTGCATCTGCACCGT GCCCCGAGGTGAGCAGCGTGTTCATCTCCCCCAAG CCCAAGGACGTGCTGACCATCACCTGACCCCAAGG TGACCTGCGTGGTGGTGGACATCAGCAAGGACGACC CCGAGGTGCAGTTCAGCTGGTTCGTGGACGACGTGGA GGTGCACACCGCCAGACCCAGCCCAGGGAGGAGCA GTTCAACAGCACCTTCAGGAGCGTGAGCGAGCTGCCC ATCATGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTTC AAGTGCAGGGTGAACAGCGCCGCCTTCCCCGCCCCA TCGAGAAGACCATCAGCAAGACCAAGGGCAGGCCCA AGGCCCGCCAGGTGTACACCATCCCCCCCCCAAGGA GCAGATGGCCAAGGACAAGGTGAGCCTGACCTGCAT GATCACCGACTTCTTCCCCGAGGACATCACCGTGGAG TGGCAGTGGAACGGCCAGCCCGCCGAGAACTACAAG AACACCCAGCCCATCATGGACACCGACGGCAGCTAC TTCGTGTACAGCAAGCTGAACGTGCAGAAGAGCAAC TGGGAGGCCGGCAACACCTTCACCTGCAGCGTGCTGC ACGAGGGCCTGCACAACCACACCGAGAAGAGCC TGAGCCACAGCCCCGGCAAG</p>
<p>SEQ ID NO:58 (Человеческий LIF aa)</p>	<p>MKVLAAGVVPLLLVLHWKHGAGSPLPITPVNATCAIRH PCHNNLMNQIRSQLAQLNGSANALFILYYTAQGEPFPN NLDKLCGPNVTDPPFHANGTEKAKLVELYRIVVYLGT SLGNITRDQKILNPSALSLHSKLNATADILRGLLSNVLCR LCSKYHVGHVDTVYGPDTSGKDVFKKKLGCQLLGKY KQIIAVLAQAF</p>
<p>SEQ ID NO:59 (Mut3aa)</p>	<p>MKVLAAGVVPLLLVLHWKHGAGSPLPITPVNATCAIRH PCHNNLMNQIRSQLAQLNGSANALFILYYTAQGEPFPN NLDKLCGPNVTDPPFHANGTEKAKLVELYRIVVYLGT SLGNITRDQKILNPSALSLHSKLNATADILRGLLSNVLCR LCSKYHVGHVDTVYGPDTSGKDVFKKKLGCQLLGTY KQVISVVVQAF</p>

<p>SEQ ID NO:60 (Mut4aa)</p>	<p>MKVLAAGVVPLLLVLHWKHGAGSPLPITPVNATCAIRH PCHNNLMNQIRSQLAQLNGSANALFILYYTAQGEPFPN NLDKLCGPNVTDFPPFHANGTEKAKLVELYRIVVYLGT SLGNITRDQKILNPSALSLSKLNATADILRGLLSNVLCR LCSKYHVGHVDPVPPVDPHSDKEAFQRKKLGCQLLGT KQVISVVVQAF</p>
<p>SEQ ID NO:61</p>	<p>TYGPDTSGKDVFKKK</p>
<p>SEQ ID NO:62 (5D8 полная размерная тяжелая цепь aa)</p>	<p>QVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSHAWMHWV RQAPGKGLEWVGQIKAKSDDYATYYAESVKGRFTISR DSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTCWEWDLDFWGQG TMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>

<p>SEQ ID NO:63 (5D8 полноразмерная тяжелая цепь nt)</p>	<p>CAGGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCGGGCGGCCTGGTG AAGCCCGGCGGCAGCCTGAGGCTGAGCTGCGCCGCC AGCGGCTTCACCTTCAGCCACGCCTGGATGCACTGGG TGAGGCAGGCCCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGG GCCAGATCAAGGCCAAGAGCGACGACTACGCCACCT ACTACGCCGAGAGCGTGAAGGGCAGGTTACCCATCA GCAGGGACGACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGA TGAACAGCCTGAAGACCGAGGACACCGCCGTGTACT ACTGCACCTGCTGGGAGTGGGACCTGGACTTCTGGGG CCAGGGCACCATGGTGACCGTGAGCAGCGCCAGCAC CAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGC AAGAGCACCAAGCGGCGGCACCGCCGCCCTGGGCTGC CTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGA GCTGGAACAGCGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACA CCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAG CCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCAGCAGCAGCCT GGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAA GCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGGGTGGAGCC CAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGC CCCGCCCCGAGCTGCTGGGCGGCCCCAGCGTGTTC TGTTCCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAG CAGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGT GAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCAACTGGTA CGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAA GCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGT GGTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTG AACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAG GCCCTGCCCCCCCCATCGAGAAGACCATCAGCAAG GCCAAGGGCCAGCCAGGGAGCCCCAGGTGTACACC CTGCCCCCAGCAGGGAGGAGATGACCAAGAACCAG GTGAGCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCA GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGC CCGAGAACAATAACAAGACCACCCCCCGTGCTGG ACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGAC CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTT CAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCA CTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAA G</p>
<p>SEQ ID NO:64 (5D8 полноразмерная легкая цепь aa)</p>	<p>DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLDSDGHTYLN WLQQRPGQPPRLLIYSVSNLESGVPDRFSGSAGTDFTL KISRVEAEDVGVYYCMQATHAPPYTFGQGTKLEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>

<p>SEQ ID NO:65 (5D8 полноразмерная легкая цепь nt)</p>	<p>GACATCGTGATGACCCAGACCCCCCTGAGCAGCCCCG TGACCCTGGGCCAGCCCGCCAGCATCAGCTGCAGGA GCAGCCAGAGCCTGCTGGACAGCGACGGCCACACCT ACCTGAACTGGCTGCAGCAGAGGCCCGGCCAGCCCC CCAGGCTGCTGATCTACAGCGTGAGCAACCTGGAGA GCGGCGTGCCCGACAGGTTTCAGCGGCAGCGGCCGCG GCACCGACTTCACCCTGAAGATCAGCAGGGTGGAGG CCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCATGCAGGCCA CCCACGCCCCCCCCCTACACCTTCGGCCAGGGCACCAA GCTGGAGATCAAGAGGACCGTGGCCGCCCCCAGCGT GTTTCATCTTCCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGC GGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCT ACCCAGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGGTGGACA ACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGA CCGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTGA GCAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGA AGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGG GCCTGAGCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGG GCGAGTGC</p>
<p>SEQ ID NO:66 (P36-033 LCDR1 aa)</p>	<p>KASQDVSNVA</p>
<p>SEQ ID NO:67 (P36-033 LCDR2 aa)</p>	<p>WASFRHT</p>
<p>SEQ ID NO:68 (P36-033 LCDR3 aa)</p>	<p>QQHYNTPYT</p>
<p>SEQ ID NO:69 (P36-033 HCDR1 aa)</p>	<p>SYPMF</p>
<p>SEQ ID NO:70 (P36-033 HCDR2 aa)</p>	<p>YISNGGDSTYYPDTVKG</p>
<p>SEQ ID NO:71 (P36-033 HCDR3 aa)</p>	<p>PSARYDEWFAY</p>
<p>SEQ ID NO:72 (P36-033 VL nt)</p>	<p>GACATCGTGATGACCCAGTCCCACAAGTTCATGAGCA CCAGCGTGGGCGATCGGGTGTCCATCACCTGTAAGGC CTCCCAGGACGTGAGCAACGCCGTGGCCTGGTATCAG CAGAAGCCTGGCCAGTCCCCTCGGCTGCTGATCTATT GGGCTTCCTTCAGGCACACCGGCGTGCCCGATCGGTT CACCGGCTCCGGATCCGGCACCGAGTATACCCTGACC ATCTCCCGGGTGCAGGCCGAGGATCTGGCTCTGTATT ATTGTCAGCAGCACTACAATACCCCCTACACCTTCGG CGGCGGCACCAGGCTGGAGATCAAG</p>
<p>SEQ ID NO:73 (P36-033 VH nt)</p>	<p>GAGGTGATGCTGGTGGAGAGCGGCGGCGGCCTGGTG CAGCCTGGAGGATCTCGGAGGCTGAGCTGTGCCGCC AGCGGCTTCACCTTCTCCTCCTATCCCATGTTCTGGGT GAGGCAGACCCCCGAGAAGCGGATGGAGTGGGTGGC CTATATCTCCAATGGCGGCGATTCCACCTATTATCCT GACACCGTGAAGGGCCGGTTCACCGTGAGCCGGGAT AACGCCAAGAATACCCTGTACCTGCAGATGAGCAGC CTGAAGTCCGTGGACACCGCTATCTACTATTGCGTGA GGCCCTCCGCTCGGTACGACGAGTGGTTCGCCTATTG GGGCCAGGGCACCCCTGGTGACAGTGAGCGCT</p>

SEQ ID NO:74 (38E10E1C11 VL aa)	DIHMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLAWYQQK QGKSPQLLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSL QPEDFGSYYCQHYYVTPLTFGAGTKLELKRA
SEQ ID NO:75 (38E10E1C11 VH aa)	EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFIFSSYAMSWVR QSPETRLEWVATISSGGSNTYSPDSVKGRFTISRDNKN TLYLQMSSLRSEDAMYYCARYYGYFFDFWGGQTTLT VSS
SEQ ID NO:76 (38E10E1C11 VL nt)	GACATCCACATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTG CATCTGTGGGAGAACTGTCACCATCACATGTCGAGC AAGTGAGAATATTTACAGTTATTTAGCATGGTATCAG CAGAAACAGGGAAAATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATA ATGCAAAAACCTTAGCAGAAGGTGTGCCATCAAGGT TCAGTGGCAGTGGATCAGGCACACAGTTTTCTCTGAA GATCAACAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGGGAGTTAT TACTGTCAACATCATTATGTTACTCCGCTCACGTTCCG TGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGGGCT
SEQ ID NO:77 (38E10E1C11 VH nt)	GAAGTGATGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTG AAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCT CTGGATTCATTTTCAGTAGTTATGCCATGTCTTGGGTT CGCCAGAGTCCGGAGACGAGGCTGGAGTGGGTCCGA ACCATTAGTAGTGGTGGTAGTAACACCTACTCTCCAG ACAGTGTGAAGGGGCGATTACCATCTCCAGAGACA ATGCCAAGAACCCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCT GAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAG ATATTATGGTTACTACTTTGACTTCTGGGGCCAAGGC ACCACTCTCACAGTCTCCTCA
SEQ ID NO:78 (5D8 VH aa)	QVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSHAWMHV RQAPGKGLEWVGQIKAKSDDYATYYAESVKGRFTISR DSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTCWEWDLDFWGGQ TMVTVSS
SEQ ID NO:79 (5D8 VL aa)	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLLDSHGHTYLN WLQQRPGQPPRLLIYSVSNLESGVPDRFSGSGAGTDFTL KISRVEAEDVGVYYCMQATHAPPYTFGQGTKLEIKRTV
SEQ ID NO:80 (5D8 VH nt)	CAGGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCGGCGGCCTGGTG AAGCCCAGGCGGCAGCCTGAGGCTGAGCTGCGCCGCC AGCGGCTTCACCTTCAGCCACGCCTGGATGCACTGGG TGAGGCAGGCCCCCGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGG GCCAGATCAAGGCCAAGAGCGACGACTACGCCACCT ACTACGCCGAGAGCGTGAAGGGCAGGTTACCCATCA GCAGGGACGACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGA TGAACAGCCTGAAGACCGAGGACACCGCCGTGTACT ACTGCACCTGCTGGGAGTGGGACCTGGACTTCTGGGG CCAGGGCACCATGGTGACCGTGAGCAGC

SEQ ID NO:81 (5D8 VL nt)	GACATCGTGATGACCCAGACCCCCCTGAGCAGCCCCG TGACCCTGGGCCAGCCCGCCAGCATCAGCTGCAGGA GCAGCCAGAGCCTGCTGGACAGCGACGGCCACACCT ACCTGAACTGGCTGCAGCAGAGGCCCGGCCAGCCCC CCAGGCTGCTGATCTACAGCGTGAGCAACCTGGAGA GCGGCGTGCCCGACAGGTTTCAGCGGCAGCGGCCGCG GCACCGACTTCACCCTGAAGATCAGCAGGGTGGAGG CCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCATGCAGGCCA CCCACGCCCCCCCCCTACACCTTCGGCCAGGGCACCAA GCTGGAGATCAAGAGGACCGTG
SEQ ID NO:82 (P36-033 VL aa)	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSNAVAWYQ QKPGQSPRLLIYWASFRHTGVPDRFTGSGSGTEYTLTIS RVQAEDLALYYCQQHYNTPYTFGGGTRLEIK
SEQ ID NO:83 (P36-033 VH aa)	EVMLVESGGGLVQPGGSRRLSCAASGFTFSSYPFMWVR QTPEKRMEWVAYISNGGDSTYYPDTVKGRFTVSRDNA KNTLYLQMSLKSVDTAIYYCVRPSARYDEWFAYWGQ GTLVTVSA

Примечания: Все номера аминокислот в CDR и каркасных участках аннотированы в соответствии с индексом EU системы Kabat (Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Edition, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). Все последовательности не включают сигнальный пептид. aa: аминокислота, nt: нуклеотид.

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ**

На ФИГ. 1 показана способность антитела против LIF по изобретению связываться с человеческим белком LIF;

На ФИГ. 2 показана способность антитела против LIF по изобретению связываться с белком LIF мыши;

На ФИГ. 3 показана способность связывания антитела против LIF по изобретению с белком LIF;

На ФИГ. 4 показана аффинность связывания антитела 38E10E1C11 по изобретению с антигеном;

На ФИГ. 5 показана способность антитела 38E10E1C11 по изобретению конкурировать с LIFR за связывание с человеческим белком LIF;

На ФИГ. 6 показана способность антитела P36-333, конкурирующего с рецептором GP130, связываться с человеческим белком LIF;

На ФИГ. 7 представлена перекрестная реакция антитела 38E10E1C11 и антитела P36-333 по изобретению с белком семейства IL-6;

На ФИГ. 8 показано, что антитело 38E10E1C11R по изобретению распознает денатурированный человеческий белок LIF;

Часть А ФИГ. 9 демонстрирует, что антитело 38E10E1C11 по изобретению ингибирует фосфорилирование клеток рака толстой кишки (HCT116), индуцированное человеческим белком LIF; Часть В ФИГ. 9 демонстрирует, что антитело 38E10E1C11 по изобретению ингибирует фосфорилирование STAT3 в клетках рака поджелудочной железы (KP4), индуцированное человеческим белком LIF;

На ФИГ. 10 показано, что антитело 38E10E1C11 по изобретению блокирует активацию STAT3 в клетках рака поджелудочной железы KP4 под действием человеческого LIF, секретируемого клетками CT26-hLIF;

На ФИГ. 11 показано, что антитело P36-333 по изобретению ингибирует фосфорилирование STAT3 в клетках рака толстой кишки (HCT116), индуцированное человеческим белком LIF;

На ФИГ. 12 показано, что антитела 38E1E1C11 и P36-033 по изобретению обращают ингибирование пролиферации клеток M1, вызванное LIF;

На ФИГ. 13 показано, что антитело 38E1E1C11 по изобретению ингибирует рост клеток CT26-hLIF у мышей BABL/c;

На ФИГ. 14 показана чувствительность трех клеточных линий рака поджелудочной железы человека к стимуляции человеческим белком LIF;

На ФИГ. 15 показано, что антитело 38E10E1C11R по изобретению ингибирует фосфорилирование STAT3 в клетках KP4, стимулированных белком LIF;

Часть А ФИГ. 16 демонстрирует экспериментальный результат распознавания полноразмерного человеческого белка LIF, а также гетерозиготного белка LIF антителом 38E10E1C11 по изобретению, а на части В ФИГ. 16 показан экспериментальный результат, заключающийся в том, что антитело 38E10E1C11 по изобретению может обратить вспять ингибирование пролиферации клеток M1, вызванное полноразмерным человеческим белком LIF и гетерозиготным белком LIF;

На ФИГ. 17А - РИС. 17В показан экспериментальный результат антигенсвязывающих свойств гуманизированного антитела против LIF по изобретению;

На ФИГ. 18 показан экспериментальный результат неспецифической аффинности связывания гуманизированного антитела против LIF по изобретению;

На ФИГ. 19 показан экспериментальный результат гуманизированного антитела против LIF по изобретению, конкурирующего с LIFR за связывание человеческого белка LIF;

На ФИГ. 20 показан экспериментальный результат гуманизированного антитела против LIF по изобретению, конкурирующего с GP130 за связывание человеческого белка LIF;

На ФИГ. 21 показан экспериментальный результат гуманизированного антитела против LIF по изобретению, распознающего антигенную специфичность;

Часть А на ФИГ. 22 демонстрирует экспериментальный результат гуманизированного антитела против LIF по настоящему изобретению, распознающего полноразмерные человеческие белки LIF и гетерозиготные белки LIF; и часть В на ФИГ. 22 демонстрирует экспериментальный результат блокирования гуманизированным антителом против LIF по изобретению ингибирования пролиферации клеток M1 полноразмерным белком LIF и гибридным белком;

На ФИГ. 23 показан экспериментальный результат гуманизированного антитела против LIF по изобретению, ингибирующего фосфорилирование STAT3, индуцированное

белком LIF;

На ФИГ. 24 показан экспериментальный результат, согласно которому гуманизованное антитело против LIF по изобретению может сделать обратимым ингибирование пролиферации клеток M1 человеческим белком LIF.

На ФИГ. 25 показан уровень индуцированного белком LIF фосфорилирования STAT3, ингибированного гуманизованным антителом против LIF, и общий уровень STAT3, определенный методом HTFR.

На ФИГ. 26 показан ADCC-эффект гуманизованного антитела против LIF.

## **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ**

### **Определения**

Для облегчения понимания настоящего описания сначала даны определения некоторых терминов. Дополнительные определения приведены на протяжении всего подробного описания.

Используемый в настоящем описании термин «LIF» относится к фактору, ингибирующему лейкоз. Аминокислотная последовательность LIF общедоступна (Ref Seq NM\_001257135). В некоторых вариантах осуществления LIF может представлять собой LIF человека, LIF мыши (Ref Seq NM\_001039537. 2) или Machin LIF (XM\_015457518. 1). Как описано в других местах настоящего документа, LIF может быть рекомбинантным и/или гликозилированным или негликозилированным.

Используемый в настоящем описании термин «антитело» может включать цельные антитела и любые антигенсвязывающие фрагменты (т. е., «антигенсвязывающие участки») или их отдельные цепи. «Антитело» в одном варианте осуществления относится к гликопротеину или его антигенсвязывающей части, содержащему по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из варибельной области тяжелой цепи (обозначенной в настоящем документе как VH) и константной области тяжелой цепи. В некоторых природных антителах IgG, IgD и IgA константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов: CH1, CH2 и CH3. В некоторых природных антителах каждая легкая цепь состоит из варибельной области легкой цепи (сокращенно обозначаемой здесь как VL) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен, CL. Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гиперварибельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), и области, которые являются более консервативными, называемые каркасными областями (FR), которые между собой имеют смешанное расположение. В настоящем описании CDR из области VH обозначаются аббревиатурой HCDR, то есть три CDR области VH могут обозначаться аббревиатурой HCDR1, HCDR2 и HCDR3; CDR из области VL обозначаются аббревиатурой LCDR, то есть три CDR области VL могут обозначаться аббревиатурой LCDR1, LCDR2, LCDR3. Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Варибельные области

тяжелой и легкой цепей содержат домен связывания который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент классической системы комплемента (C1q).

Тяжелая цепь антитела может содержать или не содержать концевой лизин (K) или концевые глицин и лизин (GK). Таким образом, любая из последовательностей тяжелой цепи и последовательностей константной области тяжелой цепи, предложенных в настоящем документе, может заканчиваться либо на GK, либо на G, либо не содержать K или GK, независимо от того, что обеспечивает последняя аминокислота в последовательности. Это связано с тем, что концевой лизин, а иногда и глицин и лизин расщепляются во время экспрессии антитела.

Антитела обычно специфически связываются с родственным им антигеном с высокой аффинностью, что отражается константой диссоциации (KD) от  $10^{-7}$  до  $10^{-11}$  M или меньше. Любая KD, превышающая примерно  $10^{-6}$  M, обычно считается признаком неспецифического связывания. Используемый в настоящем описании термин «антитело, которое «специфически связывается» с антигеном» относится к антителу, которое связывается с антигеном и с по существу идентичными антигенами с высокой аффинностью, что означает наличие KD  $10^{-7}$  M или менее, предпочтительно  $10^{-8}$  M или менее, еще более предпочтительно  $5 \times 10^{-9}$  M или менее и наиболее предпочтительно от  $10^{-8}$  M до  $10^{-10}$  M или менее, но не связывается с высокой аффинностью с неродственными антигенами. Антиген «по существу идентичен» данному антигену, если он демонстрирует высокую степень идентичности последовательности с данным антигеном, например, если он демонстрирует по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% или более идентичности последовательности с последовательностью данного антигена.

Имуноглобулин может быть любого из общеизвестных изотипов, включая, но не ограничиваясь ими, IgA, секреторный IgA, IgG и IgM. У некоторых видов изотип IgG делится на подклассы: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 у человека и IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3 у мышей. В некоторых вариантах осуществления антитела против LIF, описанные в настоящем документе, относятся к подтипу IgG1 или IgG2 человека. иммуноглобулины, например, IgG1 человека, существуют в нескольких аллотипах, которые отличаются друг от друга по большей мере несколькими аминокислотами. «Антитело» может включать, например, как природные, так и искусственные антитела; моноклональные и поликлональные антитела; химерные и гуманизированные антитела; человеческие и нечеловеческие антитела; полностью синтетические антитела; и одноцепочечные антитела.

Термин «антигенсвязывающая часть» антитела или «антигенсвязывающий фрагмент» антитела, используемый в настоящем документе, относится к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с

антигеном. Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может быть осуществлена с помощью фрагментов полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином «антигенсвязывающая часть» антитела, например, антитело против LIF, описанное в настоящем документе, включает (i) Fab-фрагмент, который представляет собой моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) фрагмент F(ab')<sub>2</sub>, который представляет собой двухвалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент F<sub>d</sub>, состоящий из доменов VH и CH1; (iv) фрагмент F<sub>v</sub>, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела, (v) фрагмент dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), который состоит из домена VH ; и (vi) выделенную определяющую комплементарность область (CDR) или (vii) комбинацию двух или более выделенных CDR, которые необязательно могут быть связаны синтетическим линкером. Кроме того, хотя два домена F<sub>v</sub>-фрагмента, VL и VH, кодируются разными генами, их можно связать с помощью рекомбинантных методов с помощью синтетического линкера, что позволяет сделать их единой белковой цепью, в которой VL и области VH соединяются, образуя моновалентные молекулы, известные как одноцепочечные F<sub>v</sub> (scFv); см. например, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; и Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Подразумевается, что такие одноцепочечные антитела также охватываются термином «антигенсвязывающая часть» антитела. Эти и другие потенциальные конструкции описаны в Chan & Carter (2010) Nat. Rev. Immunol. 10:301. Эти фрагменты антител получают с использованием обычных способов, известных специалистам в данной области, и фрагменты проверяют на применимость таким же образом, как и интактные антитела. Антигенсвязывающие части могут быть получены методами рекомбинантной ДНК или ферментативным или химическим расщеплением интактных иммуноглобулинов.

Термин «аминокислотная последовательность с модификацией консервативной формы» относится к аминокислотным модификациям, которые существенно не влияют или изменяют характеристики связывания антитела, содержащего аминокислотную последовательность, и модификации включают аминокислотные замены, добавления и делеции. Модификации могут быть введены в антитело по изобретению стандартными способами, такими как сайт-направленный мутагенез и мутагенез, опосредованный ПЦР. Консервативные аминокислотные замены представляют собой такие, в которых аминокислотный остаток заменяют на аминокислотный остаток, имеющий сходную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих похожие боковые цепи, известны в данной области. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислые боковые цепи (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин,

изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, один или более аминокислотных остатков в областях CDR антитела по изобретению могут быть заменены другими аминокислотными остатками из того же семейства боковых цепей, и измененное антитело может быть протестировано на сохранение функции с использованием описанных в настоящем документе функциональных анализов. Предпочтительно количество консервативных модификаций не превышает одной или двух.

В изобретении желательна модификация аминокислотных последовательностей, описанных в настоящем документе, особенно тех константных областей тяжелой цепи человека, чтобы адаптировать последовательность к желаемому аллотипу, такому как обнаруженные в азиатских популяциях.

Например, одна или более CDR или групп CDR антитела могут быть трансплантированы на каркас (такому, как человеческий каркас) для получения молекулы антитела. Каркасные области могут представлять собой последовательности генов зародышевой или не зародышевой линии человека. Таким образом, каркас может быть зародышевой линии, где один или более остатков в каркасе могут быть заменены для соответствия остаткам в наиболее похожем каркасе зародышевой линии человека в сравнимом положении. Таким образом, член связывания по изобретению может представлять собой выделенный домен VH, имеющий группу HCDR в каркасе зародышевой линии человека, например, каркас VH IgG зародышевой линии человека. Член связывания может также иметь домен VL, содержащий группу LCDR, например, в каркасе VL IgG зародышевой линии человека.

Остатки VH и/или VL каркаса можно модифицировать, как обсуждалось, как показано в настоящем документе, например, с использованием сайт-направленного мутагенеза. Домены VH или VL или члены связывания по изобретению включают такие домены VL.

Изменения могут быть сделаны в одной или более каркасных областях и/или в одной или более CDR, изменения обычно не приводят к потере функции, поэтому член связывания, содержащий такую измененную аминокислотную последовательность, должен сохранять способность связываться и/или нейтрализовать LIF. Он может поддерживать то же количество связывающих и/или нейтрализующих способностей, что и члены связывания, которые не изменились, согласно измерению с помощью описанного в настоящем документе аналитического метода. Член связывания, содержащий такую измененную аминокислотную последовательность, может обладать улучшенной способностью связывать и/или нейтрализовать LIF.

Изменения могут включать замену одного или более аминокислотных остатков неприродными или нестандартными аминокислотами, модификацию одного или более аминокислотных остатков в неприродную или нестандартную форму или вставку одной или более неприродных аминокислот или нестандартных аминокислоты в последовательность. Примеры расположения и количества изменений в

последовательности по изобретению описаны в настоящем документе в другом месте. Природные аминокислоты включают 20 «стандартных» L-аминокислот, обозначенных как G, A, V, L, I, M, P, F, W, S, T, N, Q, Y, C, K, R, H, D, E по их стандартным однобуквенным кодам. Нестандартные аминокислоты включают любые другие остатки, которые могут быть включены в остов полипептида или модифицированы из существующих аминокислотных остатков. Нестандартные аминокислоты могут быть природными или искусственными. В данной области известны несколько природных нестандартных аминокислот, таких как 4-гидроксипролин, 5-гидроксилизин, 3-метилгистидин, N-этилсерин и т.д. (Voet & Voet, 1995, *Biochemistry*, 2nd Edition, (Wiley)). Эти аминокислотные остатки, дериватизированные в их положении N- $\alpha$ , будут располагаться только на N-конце аминокислотной последовательности. Обычно аминокислота по изобретению представляет собой L-аминокислоту, но может быть и D-аминокислотой. Поэтому изменения могут включать модификацию L-аминокислотами или замену L-аминокислот D-аминокислотами. Формилированные, ацетилированные и/или фосфорилированные формы аминокислот известны, и аминокислоты по изобретению могут быть модифицированы как таковые.

Аминокислотные последовательности членов связывания и доменов антител по изобретению могут включать искусственные или нестандартные аминокислоты, описанные выше. Нестандартные аминокислоты (такие как D-аминокислоты) могут быть включены в аминокислотную последовательность во время синтеза или путем модификации или замены «исходных» стандартных аминокислот после синтеза аминокислот.

Использование нестандартных и/или искусственных аминокислот улучшает разнообразие структуры и функции и может повысить потенциал для достижения желаемых свойств связывания и нейтрализации LIF в связывающих элементах по изобретению. Кроме того, было показано, что по сравнению со стандартными L-аминокислотами D-аминокислоты и их аналоги имеют лучшие фармакокинетические свойства из-за деградации полипептидов с L-аминокислотами *in vivo* после введения животным, таким как люди.

Для создания новой области VH или VL с производными от CDR последовательностями по изобретению можно использовать один или более случайных мутагенезов, выбранных из генов VH и/или VL, для получения мутантов во всех вариантных областях. Такой метод описан в Gram et al. (Gram et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 89: 3576-3580), в котором используется ПЦР сниженной точности. В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных замен сделаны во всех вариантных областях или группах CDR.

Другой метод, который можно использовать, представляет собой направленный мутагенез областей CDR генов VH или VL. Такой метод опубликован Barbas et al. (Barbas et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 91: 3809-3813) и Schier et al. (Schier et al., 1996, *J. Mol. Biol.* 263: 551-567).

Все способы, описанные выше, известны в данной области, и специалисты в данной области техники смогут использовать такие способы и адаптировать общепринятые способы в данной области для получения связывающих элементов по изобретению.

Любые варианты аминокислотных последовательностей доменов VH и VL со специфическими последовательностями, раскрытыми в настоящем описании, могут быть использованы в соответствии с изобретением, как обсуждалось. Конкретные варианты могут включать одно или более изменений аминокислотной последовательности (добавления, делеции, замены и/или вставки аминокислотных остатков). В некоторых вариантах осуществления вариант имеет менее примерно 17, менее 9 или менее 5 таких изменений.

Как показано выше, аминокислотная последовательность CDR, по существу такая, как описано в настоящем документе, может быть перенесена в виде CDR в структурную область или большую часть варианта человеческого антитела. Последовательность HCDR3, по существу описанная в настоящем документе, представляет собой вариант осуществления изобретения, каждая из которых может содержаться в виде CDR в области варианта человеческого антитела или большей ее части, необязательно в комбинации с HCDR1, HCDR2, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 по изобретению.

Термин «моноклональное антитело», используемый в настоящем документе, относится к антителу, которое проявляет единственную специфичность связывания и аффинность к определенному эпитопу, или к композиции антител, в которой все антитела проявляют одну специфичность связывания и аффинность к определенному эпитопу. Как правило, такие моноклональные антитела получают из одной клетки, кодирующей антитело, или нуклеиновой кислоты, и их размножают без преднамеренного внесения каких-либо изменений в последовательность. Соответственно, термин «моноклональное антитело человека» относится к моноклональному антителу, имеющему переменные и необязательные константные области, происходящие из иммуноглобулиновых последовательностей зародышевой линии человека. В одном варианте осуществления человеческие моноклональные антитела продуцируются гибридомой, например, полученной путем слияния В-клетки, полученной из трансгенного или трансхромосомного животного, отличного от человека (например, из трансгенной мыши, имеющей геном, содержащий трансген тяжелой цепи человека и трансген легкой цепи), с иммортализованной клеткой. Термин «mAb» относится к моноклональным антителам.

Термин «рекомбинантное человеческое антитело», используемый в настоящем документе, включает все человеческие антитела, которые получают, экспрессируют, продуцируют или выделяют с помощью рекомбинантных средств, таких как (а) антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое является трансгенным или трансхромосомным по генам иммуноглобулина человека, или полученной из нее гибридомой, (b) антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии антитела, например, из трансфектомы, (с) антитела, выделенные из

библиотеки рекомбинантных, комбинаторных антител человека, и (d) антитела, полученные, экспрессированные, произведенные или выделенные любым другим способом, который включает сплайсинг последовательностей генов иммуноглобулинов человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные антитела человека содержат переменные и константные области, которые используют специфические последовательности иммуноглобулина зародышевой линии человека и кодируются генами зародышевой линии, но включают последующие перестройки и мутации, которые происходят, например, во время созревания антитела. Как известно в данной области техники (см., например, Lonberg (2005) *Nature Biotech.* 23(9): 1117-1125), переменная область содержит антигенсвязывающий домен, который кодируется различными генами, которые подвергаются реарранжировке с образованием антитела, специфичного к экзогенному антигену. В дополнение к реарранжировке переменная область может быть дополнительно модифицирована путем множественных замен отдельных аминокислот (называемых соматической мутацией или гипермутацией) для повышения аффинности антитела к экзогенному антигену. Константная область будет изменяться при дальнейшем ответе на антиген (т. е. переключение изотипа). Следовательно, реарранжированные и соматически мутированные последовательности нуклеиновых кислот, которые кодируют полипептиды легкой цепи и тяжелой цепи иммуноглобулина в ответ на антиген, могут не быть идентичными исходным последовательностям зародышевой линии, а вместо этого будут по существу идентичными или сходными (т. е. имеют по меньшей мере 80% идентичности).

«Человеческое» антитело (HuMAb) относится к антителу, имеющему переменные области, в которых как каркасная, так и CDR-области получены из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Кроме того, если антитело содержит константную область, константная область также происходит из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Антитела, описанные в настоящем документе, могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, вызванные случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*). Однако, при использовании в настоящем документе, подразумевается, что термин «человеческое антитело» не включает антитела, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии других видов млекопитающих, таких как мыши, были трансплантированы на человеческие каркасные последовательности. Термины «человеческие» антитела и «полностью человеческие» антитела используются как синонимы.

«Гуманизированное» антитело относится к антителу, в котором некоторые, большинство или все аминокислоты вне доменов CDR нечеловеческого антитела заменены соответствующими аминокислотами, полученными из иммуноглобулинов человека. В одном варианте осуществления антитела в гуманизированной форме, в которых некоторые, большинство или все аминокислоты за пределами доменов CDR были

заменены аминокислотами из иммуноглобулинов человека, тогда как некоторые, большинство или все аминокислоты в пределах одной или более областей CDR не изменились. Небольшие добавления, делеции, вставки, замены или модификации аминокислот допустимы, если они не лишают антитело способности связываться со специфическим антигеном. «Гуманизированное» антитело сохраняет антигенную специфичность, сходную со специфичностью исходного антитела.

«Химерное антитело» относится к антителу, в котором переменные области происходят от одного вида, а константные области происходят от другого вида, например к антителу, в котором переменные области происходят из мышиного антитела, а константные области происходят из человеческого антитела.

Функциональные фрагменты антител по изобретению включают любые функциональные фрагменты, период полужизни которых увеличен за счет химической модификации, такой как пегилирование или включение в липосомы.

Антитела по изобретению включают биспецифические антитела. Биспецифические или бифункциональные антитела образуют моноклональные антитела второго поколения, в которых два различных варианта областей объединены в одну и ту же молекулу (Holliger and Bohlen, 1999 *Cancer and metastasis rev.* 18: 411-419). Из-за их способности задействовать новые эффекторные функции или нацеливаться на некоторые молекулы на поверхности опухолевых клеток было выяснено их применение в области диагностики и лечения. Когда используются биспецифические антитела, например, гибридомы, которые получают химическим путем или получают из гибрида, могут быть обычными биспецифическими антителами, которые можно производить различными способами (Holliger P. & Winter G. *Current Opinion Biotechnol.* 4, 446-449: 1993), или могут представлять собой любой из биспецифических фрагментов антител, упомянутых выше. Эти антитела могут быть получены химическими методами или соматическими методами, но в равной степени и предпочтительно методами генной инженерии, которые позволяют проводить гетеродимеризацию и облегчают процесс очистки полученных антител. Примеры биспецифических антител включают таковые из метода ViTETM, в котором можно использовать связывающие домены двух антител с различной специфичностью и напрямую связывать их коротким гибким пептидом. Это объединяет два антитела на короткой одиночной полипептидной цепи. Диантитело и scFc сконструированы без Fc-области, используется только вариантная область, что потенциально снижает эффект антиидиотипического ответа.

Биспецифические антитела могут быть сконструированы как полные IgG, биспецифические (Fab')<sub>2</sub>, (Fab')PEG, диантитела или другие биспецифические scFv. Кроме того, два биспецифических антитела могут быть связаны с образованием четырехвалентного антитела с использованием обычных способов, известных в данной области.

По сравнению с цельными биспецифическими антителами биспецифические диантитела также особенно полезны, поскольку их можно легко сконструировать и

экспрессировать в *E.coli*. Используя библиотеку фагового дисплея (WO1994/13804), можно легко выбрать диантитела (и многие другие полипептиды, такие как фрагменты антител) с соответствующей специфичностью связывания. Если одно плечо диантитела сохраняется постоянным, то готовят библиотеку, в которой подвергают мутациям другие плечи и выбирают антитела соответствующей специфичности. Биспецифические цельные антитела могут быть получены различными методами конструирования, которые описаны у Ridgeway et al. (Ridgeway, J. B. V. et al., *Protein Eng.* 9, 616-621, 1996) или WO1996/27011, WO1998/50431 и WO2006/028936.

«Константная область модифицированной тяжелой цепи» относится к константной области тяжелой цепи, содержащей константные домены CH1, шарнир, CH2 и CH3, где один или более константных доменов относятся к другому изотипу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4). В некоторых вариантах осуществления модифицированная константная область включает домен CH1 IgG2 человека и шарнир IgG2 человека, слитые с доменом CH2 IgG1 человека и доменом CH3 IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления такие модифицированные константные области также включают аминокислотные модификации в пределах одного или более доменов относительно аминокислотной последовательности дикого типа.

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

«Аллотип» относится к природным вариантам в конкретной группе изотипов, эти варианты отличаются несколькими аминокислотами (см., например, Jefferis et al. (2009) *mAbs* 1:1). Описанные в настоящем документе антитела могут относиться к любому аллотипу.

Если в настоящем документе не указано иное, все номера аминокислот соответствуют индексу EU системы Kabat (Kabat, E.A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242).

Термины «антитело, распознающее антиген» и «антитело, специфическое в отношении антигена», используются в настоящем документе взаимозаменяемо с термином «антитело, которое специфически связывается с антигеном».

Термин «выделенное антитело», используемый в настоящем документе, предназначен для обозначения антитела, которое по существу не содержит других антител, обладающих другой антигенной специфичностью (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с LIF, по существу не содержит антител, которые специфически связываются с антигенами, отличными от LIF). Однако выделенное антитело, которое специфически связывается с эпитопом LIF, может иметь перекрестную реактивность с другими белками LIF других видов.

«Эффекторная функция» относится к взаимодействию Fc-области антитела с Fc-рецептором или лигандом или к биохимическому событию, которое является результатом

этого. Примеры «эффektorных функций» включают связывание C1q, комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC), связывание с Fc-рецептором, FcγR-опосредованные эффекторные функции, такие как ADCC и антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз (ADCP), и отрицательную регуляцию рецептора клеточной поверхности (например, B-клеточный рецептор; BCR). Такие эффекторные функции обычно требуют, чтобы Fc-область была объединена со связывающим доменом (например, переменным доменом антитела).

«Fc-рецептор» или «FcR» представляет собой рецептор, который связывается с Fc-областью иммуноглобулина. FcR, которые связываются с антителом IgG, включают рецепторы семейства FcγR, включая аллельные варианты и формы альтернативного сплайсинга этих рецепторов. Семейство FcγR состоит из трех активирующих рецепторов (FcγRI, FcγRII и FcγRIII у мышей; FcγRIA, FcγRIIA и FcγRIIA у человека) и одного ингибирующего рецептора (FcγRIIB). Различные свойства человеческих FcγR суммированы в Таблице А. Большинство врожденных типов эффекторных клеток совместно экспрессируют один или более активирующих FcγR и ингибирующих FcγRIIB, тогда как клетки-натуральные киллеры (NK) избирательно экспрессируют один активирующий Fc-рецептор (FcγRIII у мышей и FcγRIIA у людей), но не экспрессирует ингибирующий FcγRIIB у мышей и людей. Человеческий IgG1 связывается с большинством Fc-рецепторов человека, и считается, что типы активирующих Fc-рецепторов, с которыми он связывается, эквивалентны мышинному IgG2a.

Таблица А. Свойства FcγR человека

Fcγ	Аллельные варианты	Аффинность к человеческому IgG	Предпочтение изотипа	Клеточное распределение
FcγRI	Не описано	Высокая (KD ~10nM)	IgG1=3>4>>2	Моноциты, макрофаги, активированные нейтрофилы, дендритные клетки
FcγRIIA	H131	От низкой до средней	IgG1>3>2>4	Нейтрофилы, моноциты, макрофаги, эозинофилы, дендритные клетки, тромбоциты
	R131	Низкая	IgG1>3>4>2	
FcγRIIA	V158	Средняя	IgG1=3>>4>2	NK-клетки, моноциты, макрофаги, тучные клетки, эозинофилы, дендритные клетки
	F158	Низкая	IgG1=3>>4>2	
FcγRIIB	I232	Низкая	IgG1=3=4>2	B-клетки, моноциты, макрофаги, дендритные клетки, тучные клетки
	T232	Низкая	IgG1=3=4>2	

Термины «шарнир», «шарнирный домен» или «шарнирная область» или «шарнирная область антитела» относятся к домену константной области тяжелой цепи, который связывает домен CH1 с доменом CH2 и включает верхнюю, среднюю и нижнюю

части шарнира (Roux et al. J. Immunol. 1998 161:4083). Шарнир обеспечивает различные уровни гибкости между связывающей и эффекторной областями антитела, а также обеспечивает сайты для межмолекулярного дисульфидного связывания между двумя константными областями тяжелой цепи.

Термин «шарнир» включает шарниры дикого типа, а также их варианты (например, искусственные петли или модифицированные петли). Например, термин «шарнир IgG2» включает шарнир IgG2 дикого типа и варианты, имеющие 1, 2, 3, 4, 5, 1-3, 1-5, 3-5 и/или по большей мере 5, 4, 3, 2 или 1 мутацию, например, замены, делеции или добавления.

Термин «домен CH1» относится к константной области тяжелой цепи, связывающей переменный домен с шарниром в константной области тяжелой цепи. Термин «домен CH1» включает домены CH1 дикого типа, а также их варианты (например, искусственные домены CH1 или модифицированные домены CH1). Например, термин «домен CH1» включает домены CH1 дикого типа и их варианты, имеющие 1, 2, 3, 4, 5, 1-3, 1-5, 3-5 и/или по большей мере 5, 4, 3, 2 или 1 мутацию, например, замены, делеции или добавления. Примеры доменов CH1 включают домены CH1 с мутациями, которые изменяют биологическую активность антитела, например ADCC, CDC или период полужизни.

Термин «домен CH2» относится к константной области тяжелой цепи, соединяющей шарнир в константном домене тяжелой цепи с доменом CH3. Термин «домен CH2» включает домены CH2 дикого типа, а также их варианты (например, искусственные домены CH2 или модифицированные домены CH2). Например, термин «домен CH2» включает домены CH2 дикого типа и их варианты, имеющие 1, 2, 3, 4, 5, 1-3, 1-5, 3-5 и/или по большей мере 5, 4, 3, 2 или 1 мутацию, например, замены, делеции или добавления. Примеры доменов CH2 включают домены CH2 с мутациями, которые изменяют биологическую активность антитела, такую как ADCC, CDC или период полужизни.

Термин «домен CH3» относится к константной области тяжелой цепи, которая является С-концевой по отношению к домену CH2 в константном домене тяжелой цепи. Термин «домен CH3» включает домены CH3 дикого типа, а также их варианты (например, искусственные домены CH3 или модифицированные домены CH3). Например, термин «домен CH3» включает домены CH3 дикого типа и их варианты, имеющие 1, 2, 3, 4, 5, 1-3, 1-5, 3-5 и/или по большей мере 5, 4, 3, 2 или 1 мутацию, например, замены, делеции или добавления. Примеры доменов CH3 включают домены CH3 с мутациями, которые изменяют биологическую активность антитела, такую как ADCC, CDC или период полужизни.

«Домен CL» относится к константному домену легкой цепи. Термин «домен CL» включает домены CL дикого типа и их варианты.

«Нативная последовательность Fc-области» или «нативная последовательность Fc» содержит аминокислотную последовательность, которая идентична аминокислотной последовательности природной Fc-области. Fc-области человека с нативной

последовательностью включают Fc-область IgG1 человека с нативной последовательностью; Fc-область IgG2 человека с нативной последовательностью; Fc-область IgG3 человека с нативной последовательностью; и Fc-область IgG4 человека с нативной последовательностью, а также их природные варианты. Нативная последовательность Fc включает различные аллотипы Fc (см., например, Jefferis et al. (2009) mAbs 1:1).

Термин «эпитоп» или «антигенная детерминанта» относится к участку на антигене (например, LIF), с которым специфически связывается иммуноглобулин или антитело. Эпитопы внутри белковых антигенов могут быть образованы как из смежных аминокислот (обычно линейный эпитоп), так и из несмежных аминокислот, соединенных третичной укладкой белка (обычно конформационный эпитоп). Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, обычно, но не всегда, сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные в результате третичной укладки, обычно теряются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп обычно включает по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Способы определения того, какие эпитопы связывает данное антитело (т. е. картирование эпитопов) хорошо известны в данной области и включают, например, иммуноблоттинг и анализ иммунопреципитации, где перекрывающиеся или смежные пептиды (например, из LIF) тестируют на реактивность с данным антителом (например, антителом против LIF). Способы определения пространственной конформации эпитопов включают способы, известные в данной области техники, и способы, описанные в настоящем документе, например, рентгеновскую кристаллографию, двумерный ядерно-магнитный резонанс и HDX-MS (см., например, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, GE Morris, Ed. (1996)).

Антитела, которые «конкурируют с другим антителом за связывание с мишенью», относятся к антителам, которые ингибируют (частично или полностью ингибируют) связывание другого антитела с мишенью. Конкурируют ли два антитела друг с другом за связывание с мишенью, т. е. ингибирует ли одно антитело связывание другого антитела с мишенью и в какой степени, можно определить с помощью известных экспериментов по конкуренции, таких как описанные в примерах. В некоторых вариантах осуществления антитело конкурирует с другим антителом и ингибирует по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% связывания. Степень ингибирования или конкуренции может быть различной в зависимости от того, какое антитело является «блокирующим антителом» (т. е. холодное антитело, которое сначала инкубируют с мишенью). Анализы конкуренции можно проводить, как описано, например, в Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harb Protoc; 2006; doi: 10.1101/pdb.prot4277 или в главе 11 «Using Antibodies», Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA 1999. Конкурирующие антитела связываются с одним и тем же эпитопом, перекрывающимся эпитопом или с соседними эпитопами (например, согласно

свидетельствам о стерических затруднениях).

Другие анализы конкурентного связывания включают: твердофазный прямой или непрямой радиоиммуноанализ (РИА), твердофазный прямой или непрямой иммуноферментный анализ (ИФА), сэндвич-конкурентный анализ (см. Stahli et al., *Methods in Enzymology* 9:242 (1983)); твердофазный прямой биотин-авидиновый ИФА (см. Kirkland et al., *J. Immunol.* 137:3614 (1986)); твердофазный анализ с прямым мечением, твердофазный сэндвич-анализ с прямым мечением (см. Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Press (1988)); РИА с прямой меткой в твердой фазе с использованием метки I-125 (см. Morel et al., *Mol. Immunol.* 25(1):7 (1988)); твердофазный прямой биотин-авидиновый ИФА (Cheung et al., *Virology* 176:546 (1990)); и РИА с прямым мечением. (Moldenhauer et al., *Scand. J. Immunol.* 32:77 (1990)).

Термин «Kassoc» или «Ka», используемый в настоящем документе, предназначен для обозначения константы скорости ассоциации взаимодействия специфического антитела с антигеном, тогда как термин «Kdis» или «Kd», используемый в настоящем документе, предназначен для обозначения константы скорости диссоциации специфического взаимодействия антитело-антиген. Термин «KD», используемый в настоящем документе, предназначен для обозначения равновесной константы диссоциации, которую получают из отношения Kd к Ka (т. е. Kd/Ka) и выражается в виде молярной концентрации (M). Значения KD антител можно определить с использованием методов, хорошо известных в данной области. Предпочтительным методом определения KD антитела является анализ с использованием поверхностного плазмонного резонанса, предпочтительно с использованием биосенсорной системы, такой как система поверхностного плазмонного резонанса Biacore®, или проточной цитометрии и метода Скэтчарда.

Термин «EC50» в контексте анализа *in vitro* или *in vivo* с использованием антитела или его антигенсвязывающего фрагмента относится к концентрации антитела или его антигенсвязывающей части, которое индуцирует ответ, составляющий 50% от максимального ответа, т. е. половина между максимальным ответом и исходным уровнем.

Термин «IC50», в функциональном анализе IC50 представляет собой концентрацию элемента связывания, которая может снизить биологический ответ до 50% от его максимального значения, принимая нМ за единицу. В исследованиях связывания лиганда IC50 представляет собой концентрацию, при которой связывание с рецептором снижается до 50% от максимального уровня специфического связывания. IC50 можно рассчитать, нанеся процент максимальной биологической активности в зависимости от логарифма концентрации элемента связывания и используя программное обеспечение, такое как Origin (OriginLab Software Company, Нортгемптон, Массачусетс, США), чтобы аппроксимировать функцию S к данным для генерации значения IC50. Активность определяют или измеряют с использованием одного или более аналитических методов, известных специалистам в данной области и/или описанных или упомянутых в настоящем документе. Нейтрализующая активность элементов связывания может быть выражена как

среднее геометрическое.

Используемый в настоящем описании термин «природный» применительно к объекту относится к тому факту, что объект присутствует в природе. Например, полипептидная или полинуклеотидная последовательность, присутствующая в организме (включая вирусы), которую можно выделить из природного источника и которая не была преднамеренно изменена человеком в лаборатории, является природной.

«Полипептид» относится к цепи, включающей по меньшей мере два последовательно связанных аминокислотных остатка без верхнего предела длины цепи. Один или более аминокислотных остатков в белке могут содержать модификацию, такую как, но не ограничиваясь этим, гликозилирование, фосфорилирование или дисульфидную связь. «Белок» может включать один или более полипептидов.

Предполагается, что термин «молекула нуклеиновой кислоты», используемый в данном документе, включает молекулы ДНК и молекулы РНК. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечной или двухцепочечной и может представлять собой кДНК. Также предложены «консервативные модификации» последовательностей, представленных в SEQ ID NO, описанных в настоящем документе, т. е. модификации нуклеотидной и аминокислотной последовательностей, которые не отменяют связывания антитела, кодируемого нуклеотидной последовательностью или содержащего аминокислотную последовательность, с антигеном. Такие консервативные модификации последовательности включают консервативные замены нуклеотидов и аминокислот, а также добавления и делеции нуклеотидов и аминокислот. Например, модификации могут быть введены в SEQ ID NO, описанные в настоящем документе, стандартными методами, известными в данной области, такими как сайт-направленный мутагенез и мутагенез, опосредованный ПЦР. Консервативные модификации последовательности включают консервативные замены аминокислот, при которых аминокислотный остаток заменяется аминокислотным остатком, имеющим сходную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих похожие боковые цепи, известны в данной области. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислые боковые цепи (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин).

Для нуклеиновых кислот термин «существенная идентичность» означает, что две нуклеиновые кислоты или их обозначенные последовательности при оптимальном выравнивании и сравнении идентичны с соответствующими вставками или делециями нуклеотидов по меньшей мере примерно в 80% нуклеотидов, обычно по меньшей мере примерно от 90% до 95% и более предпочтительно, по меньшей мере, от примерно 98% до 99, 5% нуклеотидов. Альтернативно, существенная идентичность имеет место, когда

сегменты будут гибридизоваться в условиях селективной гибридизации с комплементарной цепью.

Для полипептидов термин «существенная идентичность» означает, что два полипептида или их обозначенные последовательности при оптимальном выравнивании и сравнении идентичны с соответствующими вставками или делециями аминокислот по меньшей мере примерно в 80% аминокислот, обычно по меньшей мере примерно от 90% до 95% и более предпочтительно по меньшей мере примерно от 98% до 99,5% аминокислот.

% идентичности между двумя последовательностями является функцией количества идентичных положений, общих для последовательностей, когда последовательности оптимально выровнены (т. е. % идентичность=количество идентичных положений/общее количество положений  $\times$  100), при этом оптимальное выравнивание определяется с учетом количества пробелов и длины каждого пробела, которые необходимо ввести для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями можно выполнить с использованием математического алгоритма, как описано в приведенных ниже неограничивающих примерах.

Процент идентичности между двумя нуклеотидными последовательностями можно определить с помощью программы GAP в программном пакете GCG (доступно на <http://www.gcg.com>), используя NWSgapdna. Матрица CMP и вес пробела 40, 50, 60, 70 или 80 и вес длины 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Процентная идентичность между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями также может быть определена с использованием алгоритма E. Meyers и W. Miller (CABIOS, 4: 11-17 (1989)), который был включен в программу ALIGN (версия 2. 0), используя таблицу веса остатков PAM120, штраф за длину пробела 12 и штраф за пробел 4. Кроме того, процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями можно определить с помощью алгоритма Нидлмана и Вунша (J. Mol. Biol. (48):444-453 (1970)), который был включен в программу GAP в программном пакете GCG (доступен на <http://www.gcg.com>), используя либо матрицу Blossum 62, либо матрицу PAM250, вес пробела 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и вес длины 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Описанные в настоящем документе последовательности нуклеиновых кислот и белков можно дополнительно использовать в качестве «запросной последовательности» для выполнения поиска в общедоступных базах данных, например, для идентификации родственных последовательностей. Такие поиски можно выполнять с помощью программ NBLAST и XBLAST (версия 2. 0), Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Поиск нуклеотидов BLAST можно проводить с помощью программы NBLAST, балльная оценка=100, длина слова=12, чтобы получить последовательности нуклеотидов, идентичные молекулам нуклеиновой кислоты, описанным в настоящем документе. Поиск белков BLAST можно проводить с помощью программы XBLAST, балльная оценка=50, длина слова=3, чтобы получить аминокислотные последовательности, идентичные

белковым молекулам, описанным в настоящем документе. Чтобы получить выравнивание с пробелами для целей сравнения, можно использовать Gapped BLAST, как описано в Altschul et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST). См. [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

Эти нуклеиновые кислоты могут присутствовать в цельных клетках, в лизате клеток или в частично очищенной или по существу чистой форме. Нуклеиновую кислоту «выделяют» или «делают по существу чистой» при очистке от других клеточных компонентов или других загрязнителей, например, от других нуклеиновых кислот клетки (например, других частей хромосомы) или от белков стандартными способами, включая обработку щелочью/SDS, окрашивание полос CsCl, колоночную хроматографию, электрофорез в агарозном геле и другие, хорошо известные в данной области техники. См. F. Ausubel, et al., ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987).

Нуклеиновые кислоты, например, кДНК может быть подвергнута мутации в соответствии со стандартными методами для получения генных последовательностей. Для кодирующих последовательностей эти мутации могут затрагивать аминокислотную последовательность по желанию. В частности, рассматриваются последовательности ДНК, по существу идентичные природным V, D, J, константным областям, переключателям и другим подобным последовательностям, описанным в настоящем документе, или полученные из них.

Термин «вектор», используемый в настоящем документе, предназначен для обозначения молекулы нуклеиновой кислоты, способной транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Один из типов вектора представляет собой «плазмиду», которая относится к кольцевой двухцепочечной ДНК-петле, в которую могут быть присоединены другие сегменты ДНК. Другой тип вектора представляет собой вирусный вектор, в котором другие сегменты ДНК могут быть связаны с вирусным геномом. Некоторые векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они были введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную последовательность точки начала репликации, и эписомные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина и, таким образом, реплицируются вместе с геномом хозяина. Более того, некоторые векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально связаны. В настоящем описании такие векторы называются «рекомбинантными экспрессирующими векторами» (или просто «экспрессирующими векторами»). Обычно экспрессирующие векторы, используемые в методах рекомбинантной ДНК, часто имеют форму плазмид. В настоящем описании «плазида» и «вектор» могут использоваться взаимозаменяемо, поскольку плазида является наиболее часто используемой формой вектора. Однако также включены другие формы экспрессирующих векторов, такие как вирусные векторы

(например, дефектные по репликации ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые выполняют эквивалентные функции.

Термин «рекомбинантная клетка-хозяин» (или просто «клетка-хозяин»), используемый в настоящем описании, предназначен для обозначения клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, не присутствующую в клетке в естественных условиях, и, возможно, клетки, в которую введен рекомбинантный экспрессирующий вектор. Следует понимать, что такие термины предназначены для обозначения не только конкретной рассматриваемой клетки, но и потомства такой клетки. Поскольку в последующих поколениях могут возникать определенные модификации либо из-за мутации, либо из-за влияния окружающей среды, такое потомство может фактически не быть идентичным родительской клетке, но все же включено в объем термина «клетка-хозяин», как он используется в настоящем описании.

Используемый в настоящем описании термин «антиген» относится к любому природному или синтетическому иммуногенному веществу, такому как белок, пептид или гаптен. Антиген может представлять собой LIF или его фрагмент.

Используемые в настоящем описании термины «ингибирование» или «блокирование» (например, относящиеся к ингибированию/блокированию связывания или активности LIF) используются взаимозаменяемо и охватывают как частичное, так и полное ингибирование/блокирование.

Используемый в настоящем описании термин «рак» относится к широкой группе заболеваний, характеризующихся неконтролируемым ростом аномальных клеток в организме. Поскольку нерегулируемое клеточное деление может привести к образованию злокачественных опухолей или клеток, они будут проникать в соседние ткани и могут метастазировать в отдаленные части тела через лимфатическую систему или кровотоки.

Термины «лечить» и «лечение», используемые в настоящем описании, относятся к любому типу вмешательства или процесса, осуществляемого или вводящего активный агент пациенту с целью обратить вспять, облегчить, улучшить, ингибировать или замедлить, или предотвратить прогрессирование, развитие, тяжесть или рецидив симптома, осложнения, состояния или биохимических признаков, связанных с заболеванием. Профилактика относится к введению пациенту, у которого нет заболевания, для предотвращения возникновения заболевания или сведения к минимуму его последствий, если оно возникает.

Термин «эффективная доза» или «эффективная дозировка» определяется как количество, достаточное для достижения или по меньшей мере частичного достижения желаемого эффекта. «Терапевтически эффективное количество» или «терапевтически эффективная доза» лекарственного средства или терапевтического средства представляет собой любое количество лекарственного средства, которое при применении отдельно или в комбинации с другим терапевтическим средством способствует регрессии заболевания, о чем свидетельствует уменьшение тяжести симптомов заболевания, увеличение частоты и продолжительности бессимптомных периодов заболевания или предотвращение

ухудшения состояния или инвалидности из-за болезни. «Профилактически эффективное количество» или «профилактически эффективная доза» лекарственного средства представляет собой количество лекарственного средства, которое при введении отдельно или в комбинации с другим терапевтическим средством пациенту с риском развития заболевания или страдающему от рецидива заболевания, тормозит развитие или рецидив заболевания. Способность терапевтического или профилактического средства способствовать регрессу заболевания или ингибировать развитие или рецидив заболевания можно оценить с помощью различных способов, известных специалистам в данной области, например, на людях во время клинических испытаний, в модельных системах на животных для прогнозирования эффективности у человека или путем анализа активности агента в анализах *in vitro*.

Термины «пациент» и «объект» относятся к любому человеку или животному, отличному от человека, которое получает либо профилактическое, либо терапевтическое лечение. Например, способы и композиции, описанные в настоящем документе, можно использовать для лечения пациента, имеющего онкологическое заболевание. Термин «животное, отличное от человека» включает всех позвоночных, например, млекопитающих и немлекопитающих, как например, приматы, овцы, собаки, коровы, куры, амфибии, рептилии и т. д.

### **Примеры**

#### **Пример 1. Скрининг и идентификация моноклонального антитела против человеческого LIF.**

1.1 Получение моноклонального антитела 38E10E1C11 против человеческого LIF гибридным методом

В соответствии со способом получения моноклональных антител (Kohler and Milstein (1975) *Nature* 256: 495) для иммунизации мышей BABL/c использовали рекомбинантный белок LIF человека (приобретенный у Sino Biological). 25 мкг рекомбинантного человеческого белка LIF с равным объемом полного адъюванта Фрейнда использовали для начальной иммунизации путем множественных подкожных инъекций в спину. Через четыре недели для второй иммунизации использовали неполный адъювант Фрейнда плюс 25 мкг рекомбинантного человеческого белка LIF. Через 20 дней для определения титра антител использовали непрямой метод ИФА. Через 2-3 недели внутрибрюшинно вводили 50 мкг рекомбинантного человеческого белка LIF для усиления иммунизации. Через 3 дня животных умерщвляли и проводили забор клеток селезенки для сливания.

Клетки мышинной миеломы SP2/0 в логарифмической фазе роста брали для подсчета и готовили суспензию клеток селезенки иммунизированной мыши. Клетки селезенки сливали с клетками SP2/0 с использованием 50% ПЭГ в соответствии со стандартными методами. Слитые клетки добавляли в 96-луночный планшет с клетками трофобластов (6-недельные перитонеальные макрофаги мыши BABL/c), подвергали скринингу и культивировали в среде DMEM с 1% НАТ и 20% эмбриональной бычьей

сыворотки. Когда клон вырос, заняв до 1/3 дна планшета, собирали культуральный супернатант. Планшеты для ИФА покрывали рекомбинантным человеческим белком LIF, а непрямой метод ИФА использовали для детекции антитела против LIF в культуральном супернатанте и скрининга клонов, секретирующих антитело против LIF человека. Кроме того, получали клеточную линию, стабильно секретирующую высокоаффинное моноклональное антитело против LIF человека, с помощью моноклонального антителообразования с использованием лимитирующих разведений, и линию, секретирующую антитело, помечали как 38E10E1C11. Полноразмерные последовательности генов, кодирующие легкую и тяжелую цепи антитела 38E10E1C11, представлены в SEQ ID NO:42 и SEQ ID NO:44, соответственно, и соответствующие полноразмерные аминокислотные последовательности легкой и тяжелой цепей антитела 38E10E1C11 представлены в SEQ ID NO:41 и SEQ ID NO:43, соответственно; последовательности генов, кодирующие переменную область легкой и тяжелой цепей антитела 38E10E1C11, представлены в SEQ ID NO:76 и SEQ ID NO:77 соответственно; и соответствующие аминокислотные последовательности переменных областей легкой и тяжелой цепей антитела 38E10E1C11 представлены в SEQ ID NO:74 и SEQ ID NO:75. Согласно системе Kabat, аминокислотная последовательность LCDR1 антитела 38E10E1C11 представлена в SEQ ID NO:1, аминокислотная последовательность LCDR2 представлена в SEQ ID NO:2, аминокислотная последовательность LCDR3 представлена в SEQ ID NO:3, аминокислотная последовательность HCDR1 представлены в SEQ ID NO:4, аминокислотная последовательность HCDR2 представлены в SEQ ID NO:45, а аминокислотная последовательность HCDR3 представлены в SEQ ID NO:6. Идентифицировали тип и подтип иммуноглобулина антитела 38E10E1C11 (результат - подтип IgG1, легкая цепь к-типа).

После получения гибридомной клеточной линии, способной стабильно секретировать антитело, клетки культивировали с помощью бессывороточной среды CDHybridoma thermo fisher и адаптировали к бессывороточной суспензионной культуре со встряхиванием, а затем антитело экспрессировали и очищали с использованием бессывороточной среды.

1.2 Получение моноклонального антитела P36-033 против человеческого LIF с помощью технологии фагового дисплея

Рекомбинантный человеческий белок LIF использовали для иммунизации мышей линии BABL/c. 25 мкг рекомбинантного человеческого белка LIF с равным объемом полного адьюванта Фрейнда использовали для начальной иммунизации путем множественных подкожных инъекций в спину. Через четыре недели неполный адьювант Фрейнда плюс 25 мкг рекомбинантного человеческого белка LIF использовали для второй иммунизации. Непрямой метод ИФА использовали для определения титра антител через 20 дней. Через 2-3 недели внутрибрюшинно вводили 50 мкг рекомбинантного человеческого белка LIF для усиления иммунизации. Через 3 дня животных умерщвляли и проводили забор клеток селезенки для слияния. Тотальную РНК из клеток селезенки

экстрагировали с использованием реагента TRIZOL от Invitrogen и подвергали обратной транскрипции в кДНК с использованием набора для обратной транскрипции кДНК Invitrogen. Ген антитела амплифицировали с помощью вырожденных праймеров варибельной области легкой и тяжелой цепи мыши и конструировали в вектор фагового дисплея, после чего конструировали фаговую библиотеку антител. Термоавтоматическую систему сортировки на магнитных микросферах использовали для исключения и селекции фаговой библиотеки антител, а фаговый ИФА использовали для селекции клона E. coli, способного связывать рекомбинантный белок LIF человека, и определяли последовательность антитела. Кроме того, антитело P36-033 было получено с помощью ИФА и идентификации жизнеспособности клеток. Полноразмерные последовательности генов легкой цепи и тяжелой цепи P36-033 представлены в SEQ ID NO:55 и SEQ ID NO:57, соответственно, а соответствующие полноразмерные аминокислотные последовательности легкой и тяжелой цепи антитела P36-033 представлены в SEQ ID NO:54 и SEQ ID NO:56, соответственно; последовательности генов, кодирующие варибельную область легкой цепи и тяжелой цепи антитела P36-033, представлены в SEQ ID NO:72 и SEQ ID NO:73, соответственно, и соответствующие аминокислотные последовательности варибельной области легкой и тяжелой цепи антитела P36-033 представлены в SEQ ID NO:82 и SEQ ID NO:83. По системе Kabat аминокислотная последовательность LCDR1 антитела P36-033 представлена в SEQ ID NO:66, аминокислотная последовательность LCDR2 представлена в SEQ ID NO:67, аминокислотная последовательность LCDR3 представлена в SEQ ID NO:68, аминокислотная последовательность HCDR1 представлена в SEQ ID NO:69, аминокислотная последовательность HCDR2 представлена в SEQ ID NO:70, аминокислотная последовательность HCDR3 представлена в SEQ ID NO:71.

### 1.3 Экспрессия и очистка антитела положительного контроля 5D8

Согласно данным патентного документа WO 2018/115960 A1, антитело 5D8 представляет собой антитело, которое ингибирует связывание белка LIF и GP130. Согласно патентному документу было синтезировано множество последовательностей генов по изобретению, и разные легкие и тяжелые цепи спарены в разных комбинациях для конструирования полноразмерных антител в форме IgG1 человека, и в результате было обнаружено одно из них с лучшим связыванием с белком LIF, и в то же время оно было способно блокировать связывание рекомбинантного человеческого белка LIF с человеческим GP130 и блокировать фосфорилирование STAT3 в клетках HCT116 рекомбинантным человеческим белком LIF посредством идентификации жизнеспособности клеток, в связи с чем в изобретении оно получило название 5D8 в качестве антитела положительного контроля в последующем испытании. Полноразмерные последовательности генов, кодирующие тяжелую цепь и легкую цепь антитела 5D8 представлены в SEQ ID NO:63 и SEQ ID NO:65, соответственно, и соответствующие полноразмерные аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкая цепь антитела 5D8 представлены в SEQ ID NO:62 и SEQ ID NO:64, соответственно;

последовательности генов, кодирующие вариабельную область антитела 5D8 представлены в SEQ ID NO:80 и SEQ ID NO:81, соответственно, и соответствующие аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи и легкой цепи 5D8 представлены SEQ ID NO:78 и SEQ ID NO:79, соответственно.

**Пример 2. Эксперимент по связыванию антитела против LIF человека с человеческим белком LIF**

Рекомбинантный белок LIF человека разбавляли до 1 мкг/мл, наносили на планшет с ферментной меткой, добавляли по 100 мкл белка в каждую лунку и инкубировали в течение ночи при 4°C. Планшеты с ферментной меткой извлекали на следующий день, жидкость удаляли, трижды промывали PBST и блокировали 2% BSA в PBS в течение 1 ч при комнатной температуре, затем трижды промывали PBST и добавляли антитело против LIF человека 38E10E1C11, 5D8 и P36-033 в разных концентрациях и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Жидкость сливали, а планшеты четыре раза промывали PBST. В планшеты добавляли HRP-меченное козье антитело против мышинового Fab или козье антитело против человеческого FC и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем жидкость сливали, а планшеты четыре раза промывали PBST и инкубировали с окрашенным раствором TMB в течение 10 минут при комнатной температуре. Останавливают проявление окраски добавлением 2 моль/л H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, и поглощения при 450 нм количественно определяли с помощью автоматического планшетного фотометра, и результаты показаны на Фигуре 1. Результаты показывают, что связывание антитела 38E10E1C11 и антитела P36-033 с человеческим белком LIF сильнее, чем связывание антитела 5D8 с человеческим белком LIF.

**Пример 3. Эксперимент по связыванию антитела против LIF человека с белком LIF мыши.**

Рекомбинантный мышинный белок LIF (приобретенный у ACRO Biosystems) разбавляли до 1 мкг/мл и наносили на планшет с ферментной меткой, в каждую лунку добавляли 100 мкл белка и инкубировали в течение ночи при 4°C. Планшеты с ферментной меткой извлекали на следующий день, жидкость удаляли, трижды промывали PBST и блокировали 2% BSA в PBS в течение 1 ч при комнатной температуре, затем трижды промывали PBST и добавляли антитело против LIF человека 38E10E1C11, 5D8 и P36-033 в разных концентрациях и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Жидкость сливали, а планшеты четыре раза промывали PBST. В планшеты добавляли HRP-меченное козье антитело против мышинового Fab или козье антитело против человеческого FC и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем жидкость сливали, а планшеты четыре раза промывали PBST и инкубировали с окрашенным раствором TMB в течение 10 минут при комнатной температуре. Останавливали проявление окраски добавлением 2 моль/л H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, и значение поглощения при 450 нм будет количественно определяли с использованием автоматического планшетного фотометра, и результаты показаны на Фигуре 2. Результаты показывают, что антитело 38E10E1C11 не обладает активностью связывания с белком LIF мыши, а

антитело P36-033 обладает активностью связывания с белком LIF мыши, которая ниже, чем у антитела 5D8.

#### **Пример 4. Эксперимент по связыванию антитела против LIF человека с белком Machin LIF**

Рекомбинантный белок machin LIF (приобретенный у Sinobiology) разбавляли до 0,5 мкг/мл и наносили на планшет с ферментной меткой, в каждую лунку добавляли 100 мкл белка и инкубировали в течение ночи при 4 °С. Планшеты с ферментной меткой извлекали на следующий день, жидкость удаляли, трижды промывали PBST и блокировали 2% BSA в PBS в течение 1 ч при комнатной температуре, затем трижды промывали PBST и добавляли антитело против LIF человека 38E10E1C11, 5D8 и P36-033 в разных концентрациях и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Жидкость сливали, а планшеты четыре раза промывали PBST. В планшеты добавляли HRP-меченное козье антитело против мышинового Fab или козье антитело против человеческого FC и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем жидкость сливали, а планшеты четыре раза промывали PBST и инкубировали с окрашенным раствором TMB в течение 10 минут при комнатной температуре. Останавливали проявление окраски путем добавления 2 моль/л H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, а значение поглощения при 450 нм определяли количественно с использованием автоматического планшетного фотометра, и результаты показаны на Фигуре 3. Результаты показывают, что активность связывания 38E10E1C11 и P36-033 лучше, чем активность связывания 5D8.

#### **Пример 5. Анализ аффинности антител против LIF человека.**

Аффинность очищенных моноклональных антител к рекомбинантному белку LIF человеку определяли с помощью KinExA 4000. 200 мг твердых шариков из PMMA добавляли к 30 мкг антитела 38E10E1C11 и дополнительно добавляли раствор для покрытия к 1 мл. Буферный состав представляет собой 1×PBS, pH 7,4, 0,02% NaN<sub>3</sub>. И убедитесь, что микросферы полностью суспендированы в растворе, и вращались в течение 2 часов при комнатной температуре. Микросферы осаждали естественным образом или быстро центрифугировали на низкой скорости. Супернатант удаляли, а гранулы блокировали PBS, содержащим 1% BSA. Готовили 15 мл 300 пМ раствора антигена и 15 мл 240 пМ раствора Ab2 (38E10E1C11). 0,6 мл 300 пМ антигена и 0,6 мл 240 пМ антитела Ab2 (38E10E1C11) помещали в разные пробирки для образцов по отдельности. Образцы в двух пробирках хорошо перемешивали и объединяли в одну пробирку, концентрация антигена составляла 150 пМ, а концентрация антитела Ab2 (38E10E1C11) составляла 120 пМ в это время, и раствор помещали в соответствующее положение в штативе пробирок. Было подготовлено 16 групп, и время инкубации каждой группы было разным. В каждую группу добавляли 1 мкг/л белка стрептавидина, раствор DyLight 650, и детектировали на месте для инкубации в течение 24 часов. В программном обеспечении KinExatm Pro равновесная константа диссоциации (K<sub>d</sub>) для анализа n-кривой была рассчитана с помощью модели неизвестного лиганда, и результаты показаны на Фигуре 4. Результаты показывают, что аффинность mAb 38E10E1C11 к человеческому белку LIF

равна  $4,52 \times 10^{-12} \text{M}$ .

**Пример 6. mAb P36-033 и mAb 38E10E1C11 конкурируют с LIFR за связывание с человеческим белком LIF.**

Рекомбинантный белок LIF человека наносили на планшет с ферментной меткой в концентрации 1 мкг/мл, белок LIFR (экспрессированный слитым с FC человека) в концентрации 0, 6125 мкг/мл (50 мкл на лунку) и одновременно отдельно добавляли в разных концентрациях (50 мкл на лунку) антитела против человеческого LIF 38E10E1C11, P36-033 и 38E10E1C11R, которые рекомбинантно экспрессируются клетками CHO (SEQ ID NO: 41 и 43), и инкубировали 2 часа при комнатной температуре. После четырехкратной промывки PBST инкубировали с вторичным HRP-меченым козым антителом против мышинового FC в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем планшеты промывали четыре раза PBST и добавляли окрашенный раствор ТМВ в течение 10 минут. Величину поглощения при 450 нм количественно определяли с использованием измерительного прибора для мечения ферментов, а данные анализировали и наносили на график с использованием программного обеспечения Origin pro 9. Результаты представлены на Фигуре 5. Результаты показывают, что mAb 38E10E1C11 и 38E10E1C11 могут ингибировать связывание LIF человека с LIFR человека, в то время как mAb P36-033 не может ингибировать связывание LIF человека с LIFR человека.

**Пример 7 mAb P36-033 и mAb 38E10E1C11 конкурируют с GP130 за связывание с человеческим белком LIF.**

Рекомбинантный белок LIF человека наносили на планшеты с ферментной меткой в концентрации 1 мкг/мл, добавляли белок GP130 (экспрессированный слитым с FC человека) в концентрации 20 мкг/мл (50 мкл на лунку) и антитела против человеческого LIF P36-033 и 38E10E1C11 одновременно в разных концентрациях добавляли по отдельности (50 мкл/лунку) и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре. Одновременно ставили контрольные лунки с добавлением антител и без белка GP130. Инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре. После четырехкратной промывки PBST инкубировали с вторичным HRP-меченым козым антителом против мышинового FC в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем планшеты промывали четыре раза PBST и добавляли окрашенный раствор ТМВ на 10 минут. Величину поглощения при 450 нм количественно определяли с использованием измерительного прибора для мечения ферментов, а данные анализировали и наносили на график с использованием программного обеспечения Origin pro 9. Результаты представлены на Фигуре 6. Результаты показывают, что P36-033 и 38E10E1C11 могут ингибировать связывание LIF человека с белком GP130 человека.

**Пример 8 Определение специфичности mAb 38E10E1C11.**

Человеческий LIF, человеческий IL-6, человеческий OSM, человеческий CNTF (приобретенный у Sino bio) наносили на планшет с меткой фермента в концентрации 1 мкг/мл по отдельности, а антитела против человеческого LIF 38E10E1C11, P36-033 и 5D8 при разных концентрациях добавляли отдельно и инкубировали в течение 1 часа при

комнатной температуре. Затем планшеты четыре раза промывали PBST и инкубировали с HRP-меченым козым антителом против мышиноного FC в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем планшеты промывали четыре раза PBST и добавляли окрашенный раствор TMB для проявления окраски при комнатной температуре в течение 10 минут. Величину поглощения при 450 нм количественно определяли с помощью измерительного прибора для мечения ферментов, данные анализировали и наносили на график с использованием программного обеспечения Origin pro 9. Результаты представлены на Фигуре 7. Результаты показывают, что mAb 38E10E1C11 и mAb P36-033 только связывались с человеческим белком LIF и не связывались с IL-6 человека, OSM человека и CNTF человека, в то время как антитело 5D8 связывалось с белком OSM человека и CNTF человека.

**Пример 9 Определение методом вестерн-блоттинга того, что mAb 38E10E1C11 можно использовать для белка LIF человека.**

Рекомбинантный белок LIF человека разбавляли до концентрации, показанной на Фигуре 8. Клеточный супернатант клеток CT26 и C26-hLIF, культивируемых в течение трех дней с загрузочным буфером 5XSDS-PAGE, кипятили в течение 10 минут. Образец объемом 10 мкл брали для электрофореза в SDS-PAGE, а затем полосу электрофореза переносили на мембрану PVDF для детекции Вестерн-блоттингом, первичное антитело, используемое для детекции, представляет собой антитело 38E10E1C11 в концентрации 1 мкг/мл, инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре и промывали три раза буфером TBST. Затем добавляли разбавленное 1:3000 HRP-меченое вторичное козые антитело против мышиноного белка и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре, инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре и трижды промывали буфером TBST. Затем инкубировали раствором для усиления хемилюминесценции (Pierce) и детектировали и фотографировали с помощью сверхчувствительного многофункционального устройства формирования изображений Amersham Imager 600. Результаты представлены на Фигуре 8. Результаты показывают, что mAb 38E10E1C11 можно использовать для детекции белка LIF человека методом вестерн-блоттинга.

**Пример 10 Анализ клеточной активности антитела против человеческого LIF.**

**10.1 Детектирование ингибирования активации STAT3 в клетках НСТ116**

Клетки НСТ116 расщепляли и центрифугировали, затем клетки ресуспендировали и высевали на 12-луночный планшет в объеме 1 мл с  $5 \times 10^5$  клеток/лунку. Затем клетки инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение ночи. Исходную среду удаляли на следующий день, добавляли среду для культивирования клеток, содержащую 100 нг/мл рекомбинантного белка LIF человека и антитела к LIF в различных концентрациях, и инкубировали в течение 30 минут при 37 °C, при этом устанавливали контрольные лунки, не содержащие рекомбинантный белок LIF человека и содержащие только рекомбинантный белок LIF человека без антител. Затем среду удаляли и в каждую лунку 12-луночного планшета добавляли 100 мкл 1xлизата, и клетки лизировали на льду в

течение 30 мин. Лизат переносили в 1,5мл-центрифужную пробирку, и пробирку с лизатом центрифугировали при 13000 об/мин в течение 10 мин и собирали супернатант. Супернатант брали для детекции фосфорилирования STAT3 с использованием вестерн-блоттинга. Результаты показаны на части А Фигуры 9 и на Фигуре 11. Из результатов было обнаружено, что антитело 38E10E1C11 и антитело P36-033 могут ингибировать фосфорилирование STAT3 в клетках HCT116, индуцированное человеческим белком LIF.

#### **10.2 Детектирование активности антител против человеческого LIF посредством теста ингибирования активации STAT3 в клетках KP4**

Клетки KP4 гидролизовали и центрифугировали, клетки ресуспендировали и высевали на 12-луночный планшет в объеме 1 мл с  $5 \times 10^5$  клеток/лунку. Затем клетки инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение ночи. Исходную среду удаляли на следующий день, добавляли среду для культивирования клеток, содержащую 50 нг/мл рекомбинантного человеческого белка LIF и антитела против LIF в различных концентрациях, и инкубировали в течение 30 минут при 37 °C, одновременно устанавливали контрольные лунки, не содержащие рекомбинантный белок LIF человека и только рекомбинантный белок LIF человека без антител. Затем среду удаляли и в каждую лунку 12-луночного планшета добавляли 100 мкл 1х лизата, и клетки лизировали на льду в течение 30 мин. Лизат переносили в 1,5мл-центрифужную пробирку, и пробирку с лизатом центрифугировали при 13000 об/мин в течение 10 мин и собирали супернатант. Супернатант брали для детекции фосфорилирования STAT3 с использованием вестерн-блоттинга. Результаты показаны на части В Фигуры 9, они показывают, что антитело 38E10E1C11 может ингибировать фосфорилирование STAT3 в клетках KP4, индуцированное человеческим белком LIF.

#### **10.3 Детектирование активности антител против человеческого LIF посредством теста ингибирования активации STAT3 в клетках KP4**

Клетки KP4 гидролизовали и центрифугировали, клетки ресуспендировали и высевали на 12-луночный планшет в объеме 1 мл с  $5 \times 10^5$  клеток/лунку. Затем клетки инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение ночи. На следующий день исходную среду удаляли, добавляли антитела против LIF в разных концентрациях и среду для культивирования клеток CT26-hLIF в объемном соотношении 1:1 и инкубировали в течение 30 минут при 37 °C, и в то же время устанавливали контрольные лунки, содержащие культуральный супернатант CT26. Затем среду удаляли и к клеткам добавляли 100 мкл 1х лизата, и клетки лизировали на льду в течение 30 мин. Лизат переносили в 1,5мл-центрифужную пробирку, и пробирку с лизатом центрифугировали при 13000 об/мин в течение 10 мин и собирали супернатант. Супернатант брали для детекции фосфорилирования STAT3 с использованием вестерн-блоттинга. На Фигуре 10 показано, что антитело 38E10E1C11 может ингибировать фосфорилирование STAT3 в клетках KP4, индуцированное человеческим белком LIF, секретлируемым клетками CT26-hLIF.

#### **10.4 Детектирование активности антител против LIF с помощью теста на**

### **пролиферацию клеток M1**

Клетки M1 центрифугировали и дважды промывали средой RPMI1640, клетки M1 высевали в 96-луночный планшет в объеме 100 мкл клеток на лунку при плотности  $2 \times 10^5$  клеток/мл. Среду для культивирования клеток, содержащую 10 нг/мл рекомбинантного белка LIF человека и антитела против LIF в различных концентрациях, добавляли до тех пор, пока объем каждой лунки окончательно не достигал 200 мкл, и инкубировали в течение 72 часов при 37°C в инкубаторе. Параллельно устанавливали контрольные лунки без белка LIF человека. ССК-8 добавляли для измерения пролиферации клеток. Результаты показаны на Фигуре 12, и результаты показывают, что как mAb 38E10E1C11, так и mAb P36-033 могут реверсировать ингибирование пролиферации клеток M1, индуцированное человеческим белком LIF.

### **Пример 11 Детектирование противоопухолевой активности антитела против человеческого LIF in vivo.**

Антитело 38E10E1C11 не давало перекрестной реакции с мышинным белком LIF по данным анализа ИФА. Для проведения оценки активности in vivo необходимо было сконструировать клеточную линию CT26, сверхэкспрессирующую белок LIF человека. Согласно публикациям белок LIF человека способен связываться с LIFR и GP130 на поверхности клеток мыши, тем самым активируя сигнал ниже по сигнальному пути. Следовательно, предполагалось, что белок LIF человека, секретируемый клетками CT26, которые в высокой степени экспрессируют белок LIF человека, может ингибировать иммунную систему мышей, а белок против LIF может высвобождать ингибирующий эффект и, таким образом, оказывать противоопухолевое действие.

#### **11.1 Создание клеточной линии CT26, сверхэкспрессирующей человеческий LIF**

Клеточную линию клеток рака толстой кишки мыши CT26 инфицировали сконструированным лентивирусом, содержащим человеческий ген LIF. Экспрессию белка LIF детектировали через 48 часов. Клеточную линию клонировали методом лимитирующих разведений и добавляли среду с пуромицином в конечной концентрации 1 мкг/мл для герметичного скрининга. Наконец, получали клеточную линию CT26, стабильно и высоко экспрессирующую белок LIF человека.

#### **11.2 Противоопухолевая активность антитела против LIF человека, детектированная на модели подкожной имплантации CT26-hLIF BABL/C**

Клетки CT26-hLIF культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки, собирая клетки в логарифмической фазе роста, ресуспендировали в PBS до  $10^7$  клеток/мл и подкожно инокулировали мышам BABL/c. Через день после инокуляции мышей разделяли на группы и им инъецировали контрольный носитель, антитело против LIF человека, соответственно, концентрация введения составила 15 мг/кг массы тела, два раза в неделю, в течение 4 последовательных недель, объем опухоли измеряли дважды в неделю, строили кривую роста опухоли и рассчитывали скорость ингибирования опухоли. Результаты представлены на Фигуре 13.

Результаты показывают, что mAb 38E10E1C11 может ингибировать пролиферацию клеток CT26-hLIF у мышей BABL/c.

### **11.3 Измерение чувствительности различных клеточных линий клеток рака поджелудочной железы к стимуляции белка LIF**

Клетки клеточной линии рака поджелудочной железы человека Panc02. 03, KP4, MIA paca2 инокулировали в 6-луночный планшет с плотностью  $10^6$  клеток/лунку по отдельности. Среду заменяли свежей средой после инкубации в течение ночи и добавляли 50 нг/мл рекомбинантного человеческого белка LIF и антитела 38E10E1C11, при этом устанавливали контрольные лунки без белка LIF. Лунки для обработки и контрольные лунки инкубировали при 37°C в течение 30 минут. Затем среду удаляли и к клеткам добавляли 200 мкл 1xлизата по 200 мкл на каждую лунку, и клетки лизировали на льду в течение 30 мин. Лизат переносили в 1,5мл-центрифужную пробирку, и пробирку с лизатом центрифугировали при 13000 об/мин в течение 10 мин и собирали супернатант. Супернатант брали для детекции фосфорилирования STAT3 с использованием вестерн-блоттинга. Результаты представлены на Фигуре 14. Результаты показывают, что клеточная линия KP4 наиболее чувствительна к стимуляции белка LIF человека.

#### **Пример 12 Рекомбинантная экспрессия и верификация mAb 38E10E1C11 и mAb P36-033**

Ген легкой цепи и ген тяжелой цепи mAb 38E10E1C11 и mAb P36-033 конструировали в эукариотическом экспрессирующем векторе pCDNA3. 1+ с помощью идентичной методики рекомбинации. Рекомбинантные антитела экспрессировали с помощью системы экспрессии Thermo'sExpriCHO, и рекомбинантные антитела очищали с помощью аффинной хроматографии с Протеином G. Удаление эндотоксина из очищенных антител осуществляли с помощью микросфер для удаления эндотоксина производства компании Smart-lifesciences. Конкретный экспериментальный метод относится к Примеру 10.2. На Фигуре 15 показано, что антитело 38E10E1C11 (обозначенное как 38E10E1C11R), рекомбинантно экспрессированное клетками CHO, было способно ингибировать фосфорилирование STAT3 в клетках KP4, индуцированное человеческим белком LIF.

#### **Пример 13. Идентификация эпитопа, распознаваемого антителом 38E10E1C11.**

Предварительные эксперименты подтвердили, что антитело 38E10E1C11 (SEQ ID NO: 41 и 43) распознает линейный эпитоп на поверхности белка LIF человека (SEQ ID NO: 58). Антитело не могло распознавать мышинный белок LIF и могло блокировать связывание человеческого белка LIF и человеческого белка LIFR. В соответствии с этими тремя пунктами, в сочетании с анализом различных онлайн-программ для прогнозирования линейных эпитопов белка, было высказано предположение, что эпитоп распознавания антитела был расположен в аминокислотной последовательности 160-202 белка LIF, поэтому в изобретении синтезировали следующий гетерозиготный белок LIF. Mut3 (SEQ ID NO: 59) представляет собой замену аминокислотной последовательности 182-202 белка LIF человека на последовательность мышинового белка LIF, mut4 (SEQ ID NO: 60) представляет собой замену аминокислотной последовательности 166-202 белка

LIF человека на белок LIF мыши. Плазмиды, содержащие mut3, mut4 и полноразмерный белок LIF человека, трансфецировали в клетки 293Т. После трех дней культивирования супернатант клеток 293Т брали для электрофореза в SDS-PAGE и вестерн-блоттинга. Супернатант культуры клеток 293Т использовали в качестве отрицательного контроля, 38E10E1C11 в качестве первичного антитела и HRP-меченое козье антитело против мышинового Fab в качестве вторичного антитела. В то же время эксперимент по пролиферации клеток M1 использовали для детекции активности гибридного белка и верификации нейтрализующей активности 38E10E1C11 по отношению к гибриднему белку. Одновременно устанавливали несколько групп контрольных лунок, контрольные лунки с добавлением человеческого рекомбинантного белка LIF (rhLIF, приобретенный у Yiqiao Shenzhou, номер продукта: 14890-HNAH), контрольные лунки с добавлением rhLIF и 38E10E1C11 и контрольные лунки без добавления rhLIF и антитела против LIF. Результаты показали, что антитело 38E10E1C11 может распознавать денатурированный полноразмерный белок LIF и белок mut3, но не может распознавать белок mut4 (часть А на Фигуре 16). Эксперимент по пролиферации клеток M1 показывает, что антитело 38E10E1C11 может реверсировать ингибирование полноразмерного белка LIF и белка Mut3 в отношении пролиферации клеток M1, но не может реверсировать ингибирующее действие белка Mut4 (часть В на Фигуре 16). Таким образом, эпитоп распознавания антитела 38E10E1C11 был расположен в аминокислотной последовательности 167-181 человеческого белка LIF, то есть в аминокислотной последовательности TYGPDTSKGKDVFQKK (SEQ ID NO:61).

#### **Пример 14 Дизайн, экспрессия и очистка гуманизированного антитела против LIF**

Моноклональное антитело 38E10E1C11, полученное в результате иммунизации мышей, гуманизировали. Гуманизацию проводили стандартным методом трансплантации CDR. Области тяжелой и легкой цепи клонировали из гибридомы 38E10E1C11 стандартными методами молекулярного клонирования и секвенировали методом Сэнгера. Затем выполняли поиск BLAST на переменных последовательностях тяжелой и легкой цепи человека, и три или четыре последовательности выбирали в качестве каркасов рецептора для гуманизации. CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой и легкой цепи 38E10E1C11 были клонированы в три различных каркаса рецептора тяжелой цепи (H1-H3) и четыре различных каркаса легкой цепи (L1-L4), в то время как HCDR2 38E10E1C11 (аминокислотная последовательность до мутации как представлено в SEQ ID NO:45) была подвергнута точечной мутации (мутированная аминокислотная последовательность, как представлено в SEQ ID NO:5), изоформа IgG1 человека была выбрана для константной области тяжелой цепи, а каппа-цепь человека была выбрана для константной области легкой цепи. Клетки 293S котрансфецировали экспрессирующими векторами, содержащими ген тяжелой цепи гуманизированного антитела и легкой цепи гуманизированного антитела. Последовательности генов переменной области тяжелой и легкой цепи, аминокислотная последовательность переменной области, полноразмерная

последовательность гена и полноразмерная аминокислотная последовательность представлены в Таблице 1. Затем исследовали уровни экспрессии, антигенсвязывающую способность и термостабильность двенадцати различных комбинаций антител в клетках 293S. Химерное антитело 38E10E1C11 (Chimeric) использовали в качестве положительного контроля, и все химерные антитела 38E10E1C11 обозначали аббревиатурой 38E химерное антитело или 38E Chimeric (SEQ ID NO:52 и SEQ ID NO:50) в последующих анализах. Среду собирали и уровни экспрессии IgG в ней определяли количественно с помощью Gator (аналогично Octet) и корректировали с помощью ИФА. Антигенсвязывающую способность различных комбинаций сравнивали с помощью ИФА (Таблица 2, Таблица 3).

#### Иммуноферментный анализ (ИФА):

На каждую лунку наносили покрытие 100 мкл 0,5 мкг/мл антигена и инкубировали в течение ночи при 4°C, и планшеты трижды промывали 300 мкл промывочного буфера. Планшеты закрывали с использованием 200 мкл закрывающего буфера (2% бычий сывороточный альбумин) на 60 мин при комнатной температуре. Планшеты трижды промывали 300 мкл промывочного буфера. В каждую лунку добавляли 100 мкл разбавленного антитела против LIF в различных концентрациях и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Планшеты промывали 4 раза 300 мкл промывочного буфера. Добавляли 100 мкл HRP-меченого вторичного козьего антитела против человеческого Fc в разведении 1:5000 и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Планшеты промывали 6 раз 300 мкл промывочного буфера. 100 мкл раствора для проявления цвета H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Amplx добавляли для проявления цвета в течение 10 минут при комнатной температуре в темных условиях. Значение OD 450 считывали с помощью ферментного маркера. Термическая обработка: экспрессионную среду нагревали на ПЦР-аппарате при 70°C в течение 5 мин, а затем быстро охлаждали до комнатной температуры. Выполняли последующие анализы ИФА, как указано выше.

**Таблица 1 Уровни экспрессии различных комбинаций гуманизированных легких и тяжелых цепей в клетках 293S**

No.		Последовательность гена варибельной области гуманизованного антитела	Аминокислотная последовательность варибельной области гуманизованного антитела	Полноразмерная последовательность гена гуманизованного антитела	Полноразмерная аминокислотная последовательность гуманизованного антитела	Концентрация антитела в супернатанте культуры (мкг/мл)
H1L 1	тяжелая цепь	SEQ ID NO:24 (VH1,nt)	SEQ ID NO:23 (VH1,aa)	SEQ ID NO:26 (полноразмерная тяжелая цепь 1,nt)	SEQIDNO: 25 (полноразмерная тяжелая цепь 1,aa)	95.5

	легкая цепь	SEQ ID NO:8 (VL1,nt)	SEQ ID NO: 7 (VL1,aa)	SEQ ID NO:10 (полноразмерная легкая цепь 1,nt)	SEQ ID NO:9 (полноразмерная легкая цепь 1,aa)	
H2L 1	тяжелая цепь	SEQ ID NO:28 (VH2,nt)	SEQ ID NO:27 (VH2,aa)	SEQ ID NO:30 (полноразмерная тяжелая цепь 2,nt)	SEQ ID NO: 29 (полноразмерная тяжелая цепь 2,aa)	120
	легкая цепь	SEQ ID NO:8 (VL1,nt)	SEQ ID NO: 7 (VL1,aa)	SEQ ID NO:10 (полноразмерная легкая цепь 1,nt)	SEQ ID NO: 9 (полноразмерная легкая цепь 1,aa)	
H3L 1	тяжелая цепь	SEQ ID NO:32 (VH3,nt)	SEQ ID NO: 31 (VH3,aa)	SEQ ID NO:34 (полноразмерная тяжелая цепь 3,nt)	SEQ ID NO: 33 (полноразмерная тяжелая цепь 3,aa)	108
	легкая цепь	SEQ ID NO:8 (VL1,nt)	SEQ ID NO: 7 (VL1,aa)	SEQ ID NO:10 (полноразмерная легкая цепь 1,nt)	SEQ ID NO: 9 (полноразмерная легкая цепь 1,aa)	
H1L 2	тяжелая цепь	SEQ ID NO:24 (VH1,nt)	SEQ ID NO:23 (VH1,aa)	SEQ ID NO:26 (полноразмерная тяжелая цепь 1,nt)	SEQ ID NO: 25 (полноразмерная тяжелая цепь 1,aa)	110
	легкая цепь	SEQ ID NO:12 (VL2,nt)	SEQ ID NO: 11 (VL2,aa)	SEQ ID NO:14 (полноразмерная легкая цепь 2,nt)	SEQ ID NO: 13 (полноразмерная легкая цепь 2,aa)	
H2L 2	тяжелая цепь	SEQ ID NO:28 (VH2,nt)	SEQ ID NO:27 (VH2,aa)	SEQ ID NO:30 (полноразмерная тяжелая цепь 2,nt)	SEQ ID NO: 29 (полноразмерная тяжелая цепь 2,aa)	89.4
	легкая цепь	SEQ ID NO:12 (VL2,nt)	SEQ ID NO: 11 (VL2,aa)	SEQ ID NO:14 (полноразмерная легкая цепь 2,nt)	SEQ ID NO:13 (полноразмерная легкая цепь 2,aa)	
H3L 2	тяжелая цепь	SEQ ID NO:32 (VH3,nt)	SEQ ID NO: 31 (VH3,aa)	SEQ ID NO:34 (полноразмерная тяжелая цепь 3,nt)	SEQ ID NO: 33 (полноразмерная тяжелая цепь 3,aa)	95.3

	легкая цепь	SEQ ID NO:12 (VL2,nt)	SEQ ID NO: 11 (VL2,aa)	SEQ ID NO:14 (полноразмерная легкая цепь 2,nt)	SEQ ID NO: 13 (полноразмерная легкая цепь 2,aa)	
H1L3	тяжелая цепь	SEQ ID NO:24 (VH1,nt)	SEQ ID NO:23 (VH1,aa)	SEQ ID NO:26 (полноразмерная тяжелая цепь 1,nt)	SEQ ID NO: 25 (полноразмерная тяжелая цепь 1,aa)	115
	легкая цепь	SEQ ID NO:16 (VL3,nt)	SEQ ID NO: 15 (VL3,aa)	SEQ ID NO:18 (полноразмерная легкая цепь 3,nt)	SEQ ID NO: 17 (полноразмерная легкая цепь 3,aa)	
H2L3	тяжелая цепь	SEQ ID NO:28 (VH2,nt)	SEQ ID NO:27 (VH2,aa)	SEQ ID NO:30 (полноразмерная тяжелая цепь 2,nt)	SEQ ID NO: 29 (полноразмерная тяжелая цепь 2,aa)	123
	легкая цепь	SEQ ID NO:16 (VL3,nt)	SEQ ID NO: 15 (VL3,aa)	SEQ ID NO:18 (полноразмерная легкая цепь 3,nt)	SEQ ID NO: 17 (полноразмерная легкая цепь 3,aa)	
H3L3	тяжелая цепь	SEQ ID NO:32 (VH3,nt)	SEQ ID NO: 31 (VH3,aa)	SEQ ID NO:34 (полноразмерная тяжелая цепь 3,nt)	SEQ ID NO: 33 (полноразмерная тяжелая цепь 3,aa)	97.6
	легкая цепь	SEQ ID NO:16 (VL3,nt)	SEQ ID NO: 15 (VL3,aa)	SEQ ID NO:18 (полноразмерная легкая цепь 3,nt)	SEQ ID NO: 17 (полноразмерная легкая цепь 3,aa)	
H1L4	тяжелая цепь	SEQ ID NO:24 (VH1,nt)	SEQ ID NO:23 (VH1,aa)	SEQ ID NO:26 (полноразмерная тяжелая цепь 1,nt)	SEQ ID NO: 25 (полноразмерная тяжелая цепь 1,aa)	183
	легкая цепь	SEQ ID NO:20 (VL4,nt)	SEQ ID NO: 19 (VL4,aa)	SEQ ID NO:22 (полноразмерная легкая цепь 4,nt)	SEQ ID NO: 21 (полноразмерная легкая цепь 4,aa)	
H2L4	тяжелая цепь	SEQ ID NO:28 (VH2,nt)	SEQ ID NO:27 (VH2,aa)	SEQ ID NO:30 (полноразмерная тяжелая цепь 2,nt)	SEQ ID NO: 29 (полноразмерная тяжелая цепь 2,aa)	155

	легкая цепь	SEQ ID NO:20 (VL4,nt)	SEQ ID NO: 19 (VL4,aa)	SEQ ID NO:22 (полноразмерная легкая цепь 4,nt)	SEQ ID NO: 21 (полноразмерная легкая цепь 4,aa)	
H3L4	тяжелая цепь	SEQ ID NO:32 (VH3,nt)	SEQ ID NO: 31 (VH3,aa)	SEQ ID NO:34 (полноразмерная тяжелая цепь 3,nt)	SEQ ID NO: 33 (полноразмерная тяжелая цепь 3,aa)	172
	легкая цепь	SEQ ID NO:20 (VL4,nt)	SEQ ID NO: 19 (VL4,aa)	SEQ ID NO:22 (полноразмерная легкая цепь 4,nt)	SEQ ID NO: 21 (полноразмерная легкая цепь 4,aa)	
38E химерное	тяжелая цепь	SEQ ID NO:49 (Химерное 38E VH, nt)	SEQ ID NO: 48 (Химерное 38E VH, aa)	SEQ ID NO:53 (Химерное 38E полноразмерная тяжелая цепь,nt)	SEQ ID NO: 52 (Химерное 38E полноразмерная тяжелая цепь,aa)	97.4
	легкая цепь	SEQ ID NO:47 (Химерное 38E VL, nt)	SEQ ID NO: 46 (Химерное 38E VL, aa)	SEQ ID NO:51 (Химерное 38E полноразмерная легкая цепь,nt)	SEQ ID NO: 50 (Химерное 38E полноразмерная легкая цепь,aa)	

**Таблица 2. Результаты ИФА различных комбинаций гуманизированных легких и тяжелых цепей с использованием супернатанта экспрессии клеток 293S (без нагревания)**

Клон No./ не Нагревали	Концентрация антитела(мкг/мл)			
	1	0,2	0,04	0
H1L1	11840	10574	6849	2134
H2L1	11953	10737	6369	
H3L1	11367	10041	6222	
H1L2	12118	11246	6682	
H2L2	11699	10321	6517	
H3L2	11266	10575	6599	
H1L3	11846	10790	6435	
H2L3	11967	11286	6266	
H3L3	11280	10978	6755	

H1L4	11929	10931	7321	
H2L4	11821	10859	6877	
H3L4	11918	11226	7055	
38E химерный	11353	10414	6783	

**Таблица 3 Результаты ИФА различных комбинаций гуманизированных легких и тяжелых цепей через супернатант экспрессии клеток 293S (с нагреванием)**

Клон No./нагревали	Концентрация антитела(мкг/мл)			
	1	0,2	0,04	0
H1L1	9796	9007	5970	27,7
H2L1	9647	8560	5442	
H3L1	9131	7903	5192	
H1L2	9833	8925	5493	
H2L2	9779	8716	5259	
H3L2	9448	8775	5065	
H1L3	9627	8748	4978	
H2L3	9731	9153	4866	
H3L3	9543	8898	5393	
H1L4	10526	9705	5670	
H2L4	10572	9234	5702	
H3L4	9948	9061	5299	
38E химерный	10567	8845	4727	

**Пример 15 Характеризация выбранных гуманизированных антител-кандидатов с использованием очищенных образцов IgG.**

На основании данных об аффинности связывания, проценте гуманизации, уровне экспрессии антител и термостабильности следующие пять антител-кандидатов были выбраны для следующего этапа характеризации: H1L1, H1L4, H2L4, H3L2, H3L4, и пять антител-кандидатов были перенумерованы как 38E. HuH1L1 (SEQ ID NO: 25 и 9), 38E HuH1L4 (SEQ ID NO: 25 и 21), 38E HuH2L4 (SEQ ID NO: 29 и 21), 38E HuH3L2 (SEQ ID NO: 33 и 13) и 38E HuH3L4. (SEQ ID NO: 33 и 21). Затем выбранные плазмиды VH/VL котрансфецировали с клетками 293S, собирали супернатант клеточной культуры и очищали антитело с помощью аффинной хроматографии с протеином А. Очищенное антитело использовали для анализа связывания ИФА для сравнения способности специфического связывания гуманизированных антител с химерным антителом 38E. В изобретении также проводили некоторые предварительные анализы для сравнения их термической стабильности и неспецифического связывания. Результаты показали, что

очищаемые антитела-кандидаты и химерное антитело 38E имели очень сходные антигенсвязывающие свойства (Фигура 17А, 17С). После обработки при 70°C в течение 5 мин все пять гуманизированных антител показали сходную связывающую способность с химерными антителами (Фигура 17В, 17D).

#### **Пример 16 Оценка неспецифического связывания гуманизированных антител-кандидатов**

FACS LIF-негативных клеток НЕК293 использовали для предварительного анализа для оценки риска потенциального неспецифического связывания антитела.

Клетки НЕК293 гидролизовали трипсином, дважды промывали PBS, содержащим 1% FBS, ресуспендировали, доводили до плотности клеток  $1,5-2 \times 10^6$  клеток/мл и добавляли в 96-луночный U-образный планшет. Концентрацию детектируемого антитела доводили до 20 мкг/мл, а затем выполняли 3-кратное градиентное разведение, всего 8 концентраций, и устанавливали пустой контроль и отрицательный контроль (ритуксан). Разбавленное антитело и пустой контроль добавляли к клеткам в 96-луночные планшеты, и в каждую лунку добавляли по 100 мкл антитела. Клетки инкубировали при 4°C в течение 1 часа, центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 минут, супернатант осторожно удаляли и дважды промывали PBS, содержащим 1% FBS, и, наконец, ресуспендировали в 200 мкл PBS, содержащем 1% FBS, наконец, ресуспендировали клетки с 200 мкл PBS, содержащим 1% FBS, и проводили анализ проточной цитометрии. В FACS-анализе неспецифического связывания клеток НЕК293 38E HuH1L1, 38E HuH3L2, 38E HuH3L4, 38E HuH1L4, 38E химерное антитело и отрицательный контроль (ритуксан) имели аналогичную неспецифическую аффинность связывания с клетками НЕК293, в то время как 38E HuH2L4 обладали более высокой неспецифической аффинностью связывания с клетками НЕК293 (часть А и В на Фигуре 18).

#### **Пример 17 Анализ чистоты антител методом CE-SDS.**

Рабочая концентрация анализа CE-SDS составляла 1 мг/мл, образцы антител разводили до заданной концентрации загрузочным буфером.

Приготовление невозстановленных образцов для электрофореза CE-SDS: брали 95 мкл разбавленного раствора образца, добавляли 5 мкл 0, 8М водного раствора йодоацетата аммония и 5 мкл внутреннего стандарта, встряхивали и хорошо перемешивали. Брали 95 мкл пустого контроля, добавляли 5 мкл 0, 8М водного раствора йодоацетата аммония и 5 мкл внутреннего стандарта, встряхивали и хорошо перемешивали для невозстановленного пустого контроля. Затем нагревали на металлической бане при 70°C в течение 5 минут, охлаждали до комнатной температуры и центрифугировали при 6000 об/мин в течение 1 минуты.

Приготовление восстановленного раствора образца: брали 95 мкл разбавленного раствора образца, добавляли 5 мкл раствора 2-меркаптоэтанола и 5 мкл внутреннего стандарта, встряхивали и хорошо перемешивали. Брали 95 мкл пустого контроля, добавляли 5 мкл раствора 2-меркаптоэтанола и 5 мкл внутреннего стандарта, встряхивали и хорошо перемешивали для восстановленного пустого контроля. Затем нагревали в

металлической бане при 70°C в течение 15 минут, охлаждали до комнатной температуры и центрифугировали при 6000 об/мин в течение 1 минуты.

Анализ образца: в пробирку добавляли 75 мкл образца и помещали пробирку в тигель. Тигель осторожно вставляли в кювету для инъекций, и запускали программу испытаний с продолжительностью ввода восстановленного образца 30 секунд и продолжительностью ввода невосстановленного образца 40 секунд, температурой капилляра 20°C, температурой образца 20°C, напряжение фокусировки 15 кВ, время фокусировки 40 минут, и данные собирали с помощью детектора PDA при 214 нм. Результаты CE представлены в Таблице 4, Таблице 5.

Таблица 4 Результаты восстановленного CE-SDS

	Пик#	Размер(кДа)	Площадь пика (%)	Пик ID
38E химерный	1	27,77	35,5	LC
	2	62,43	64,5	HC
38E HuH1L1	1	25,6	0,57	LMC
	2	27,85	32,02	LC
	3	36,03	1,41	LMC
	4	61,41	66	HC
38E HuH3L2	1	27,41	31,7	LC
	2	33,84	0,35	LMC
	3	62,49	67,95	HC
38E HuH3L4	1	27	34,93	LC
	2	62,06	65,07	HC

Таблица 5 Результаты невосстановленного CE-SDS

	Размер(кДа)	Площадь пика (%)	Пик ID
38E химерное	166,39	>99	интактное АВ
38E HuH1L1	165,93	92,46	интактное АВ
38E HuH3L2	167,63	93,01	интактное АВ
38E HuH3L4	166,37	98,82	интактное АВ

**Пример 18 Анализ термостабильности методом дифференциальной сканирующей флуоресценции (DSF)/статического светорассеяния (SLS).**

Образцы были отправлены в UNcle Systems (Unchained Labs) для анализа. Температурный диапазон от 25°C до 95°C контролировали для DSF и SLS со скоростью 1°C/мин. UNcle измерил SLS при 266 нм и 473 нм. Tm и Tagg рассчитывали и анализировали с использованием программного обеспечения для анализа UNcle.

IgG имеет несколько структурных доменов, каждый из которых имеет свою температуру плавления (Tm. ) Структурный домен CH2 обычно имеет Tm примерно 70°C в PBS, а CH3 более стабилен с Tm примерно 80°C. Fab имеют более широкий диапазон Tm примерно 50-85°C из-за их более вариабельных последовательностей. Поэтому значения Tm, измеренные с помощью различных аналитических методов, обычно являются «кажущимися» температурами перехода, а не истинными значениями Tm каждого структурного домена. Понятно, что даже этот анализ DSF может дать более одного значения Tm, только Tm1 используется для оценки термостабильности

терапевтических антител. Tagg - это температура, при которой SLS начинает детектировать агрегацию. Tagg266 измеряет SLS на длине волны 266 нм, что является более чувствительным и более подходящим для обнаружения более мелких агрегированных частиц. Tagg473 измеряет SLS на длине волны 473 нм, что больше подходит для детекции более крупных частиц.

Как показано в Таблице 6, все три гуманизованных антитела-кандидата имеют более высокую температуру плавления ( $T_m1$ ) и меньший риск агрегации, чем химерное антитело 38E.

Таблица 6: Результаты анализа дифференциальной сканирующей флуоресценции (DSF)/статического светорассеяния (SLS)

Образец	DSF(°C)			SLS(°C)	
	$T_m1$	$T_m2$	$T_m3$	Tagg 266	Tagg 473
38E химерное	69,3			68,5	69,8
38E HuH1L1	72,7	82,8		72,5	73,6
38E HuH3L2	72	82,4		73,3	73,7
38E HuH3L4	71,5	82,1		69,8	70,9

#### Пример 19 Анализ склонности антител к агрегации с использованием метода динамического рассеяния света (DLS)

DLS выполняли на системе UNcle (Unchained Labs). DLS измеряли при 25°C. Данные рассчитывали и анализировали с использованием программного обеспечения для анализа UNcle. Динамическое рассеяние света (DLS) используется для обнаружения агрегации в образцах антител. «Диаметр моды» относится к диаметру белковой частицы, а «массовый процент» относится к проценту каждой фракции размера частиц. «PDI» относится к показателю полидисперсности, чем выше показатель, тем более полидисперсным является образец. Если PDI не больше 0,25, образец можно считать монодисперсным. Как показано в Таблице 7, все четыре образца антител имели основной «пик» (массовая доля более 99%), при этом 38E HuH3L4 имел лучший PDI, чем химерное антитело, 38E HuH3L2 был подобен химерному антителу, а 38E HuH1L1 имел хуже PDI, чем химерное антитело.

Таблица 7: Результаты анализа метода динамического рассеяния света (DLS)

Образец	Пик1			Пик2		
	Диаметр моды (нм)	Массовое процентное содержание (%)	PDI	Диаметр моды (нм)	Массовое процентное содержание (%)	
38E химерное	10,41	99,9	0,229			
38E HuH1L1	9,68	99,15	0,383	101,16	0,96	
38E HuH3L2	10,41	99,62	0,28	99,18	0,38	
38E HuH3L4	10,41	100	0,043			

#### Пример 20 Анализ аффинности антител

Аффинность антитела против LIF к человеческому белку LIF определяли с помощью Gator. Антитело против человеческого LIF сначала разбавляли до 5 мкг/мл с помощью PBS, а затем добавляли в лунки А-Е во второй колонке 96-луночного планшета (200 мкл на лунку). Концентрации белка LIF человека градиентно разбавляли PBS до 100, 50, 25, 12,5 и 6,25 мкг/мл, соответственно, и разбавленный белок LIF добавляли в лунки А-Е лунок четвертой колонки 96-луночного планшета (100 мкл на лунку), а PBS добавляли в лунку F в качестве пустого контроля. В лунки А-Е в первой и третьей колонках добавляли PBS (200 мкл на лунку). 96-луночные планшеты помещали в прибор и детектировали с помощью биосенсора против Fc человека. Результаты представлены в Таблице 8, которая показывает, что аффинность трех гуманизированных антител была близка к аффинности химерных антител.

Таблица 8: Анализ аффинности гуманизированного антитела против LIF

Образец	Koff (1/с)	Kon (1/мс)	KD (M)
38E HuH1L1	4,65E-05	5,69E+05	8,17E-11
38E HuH3L2	3,39E-05	6,31E+05	5,38E-11
38E HuH3L4	4,44E-05	5,79E+05	7,66E-11
38E химерное	1,57E-05	6,77E+05	2,33E-11

#### **Пример 21 Экспрессия и очистка гуманизированных антител и антител 38E10E1C11**

Вариабельные области легкой и тяжелой цепей гуманизированных антител 38E HuH3L2 и 38E HuH3L4 были связаны с константными областями мышиных антител (константная область тяжелой цепи представляла собой мышиный IgG1, константная область легкой цепи представляла собой каппа-цепь) и клонированы в pCDNA.3.4, соответственно, названный 38E HuH3L2-m (полноразмерные последовательности генов, кодирующие тяжелую и легкую цепи антител 38E HuH3L2-m, представлены в SEQ ID NO:36 и SEQ ID NO:38, соответственно; и соответствующие полноразмерные аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепи антитела 38E HuH3L2-m представлены в SEQ ID NO:35 и SEQ ID NO:37, соответственно) и 38E HuH3L4-m (полноразмерные последовательности генов тяжелой и легкой цепи представлены в SEQ ID NO:36 и SEQ ID NO:40, соответственно, а соответствующие полноразмерные аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепи антитела 38E HuH3L4-m представлены в SEQ ID NO:35. и SEQ ID NO:39, соответственно). Трансфекцию генов и экспрессию антител проводили с использованием набора Expi CHO Expression Kit от thermo fisher. Собирали супернатант клеточной культуры и антитело очищали с использованием колонки для аффинной хроматографии с протеином G. Очищенное антитело концентрировали и заменяли ультрафильтрацией с использованием пробирок для ультрафильтрации Amicon® Ultra, и, наконец, антитело растворяли в PBS с pH 7,4. Антитело 38E10E1C11 также экспрессировали и очищали таким же образом.

#### **Пример 22 Гуманизированное антитело против LIF конкурирует с LIFR за связывание с человеческим белком LIF.**

Рекомбинантный человеческий белок LIF наносили в виде покрытия в

концентрации 1 мкг/мл на планшеты, меченные ферментом, и добавляли 50 мкл/лунку рекомбинантного человеческого белка LIFR в концентрации 0. 6125 мкг/мл (слитый белок, экспрессированный с человеческим Fc, приобретенный у ACRO, артикул: LIR-N4252), при этом добавляли 100 мкл/лунку различных антител против LIF 38E HuH3L2-m (SEQ ID NO: 35 и 37), 38E HuH3L4- m (SEQ ID NO: 35 и 39), 38E10E1C11 (SEQ ID NO: 41 и 43), P36-033 (SEQ ID NO: 54 и 56) в различных концентрациях. Антитело против CD3 использовали в качестве отрицательного контроля (приобретено у BioLegend, № 317326). Планшеты инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре и четыре раза промывали PBST, добавляли HRP-меченные козы антитела против Fc человека, и планшеты инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре и четыре раза промывали PBST. Добавляли окрашенный раствор ТМВ, и окрашивание проявляли в течение 10 мин при комнатной температуре. Величину поглощения при 450 нм считывали с помощью ферментного маркера. Данные анализировали и строили график с использованием программного обеспечения Origin pro 9. Результаты подробно представлены на Фигуре 19. Результаты показали, что 38E10E1C11, 38E HuH3L2-m, 38E HuH3L4-m были способны ингибировать связывание рекомбинантного человеческого LIF с человеческим LIFR с IC50, равным 0. 074 мкг/мл, 0. 145 мкг/мл и 0. 103 мкг/мл, соответственно. P36-033 обладал слабым ингибирующим эффектом, и антитело против CD3 отрицательного контроля не могло ингибировать связывание рекомбинантного человеческого LIF с человеческим LIFR.

### **Пример 23 Гуманизированное антитело против LIF не конкурирует с GP130 за связывание человеческого белка LIF**

Рекомбинантный человеческий белок LIF наносили в виде покрытия в концентрации 1 мкг/мл на планшет, меченный ферментом, и добавляли 50 мкл/лунку рекомбинантного человеческого белка GP130 в концентрации 12 мкг/мл (слитый белок, экспрессированный с человеческим Fc, приобретенным у YijiaoShenzhou, артикул: 10974-N03H), тем временем добавляли 100 мкл/лунку LIF-антител 38E HuH3L2-m ((SEQ ID NO: 35 и 37), 38E HuH3L4-m (SEQ ID NO: 35 и 39) и P36-033 (SEQ ID NO: 56 и 54) в различных концентрациях, антитело против CD28 использовали в качестве отрицательного контроля (приобретено у BioLegend, арт. 302914). Планшеты инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре и четыре раза промывали PBST. Добавляли HRP-меченные козы антитела против Fc человека и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре и четыре раза промывали PBST. Добавляли окрашенный раствор ТМВ, и окрашивание проявляли в течение 10 мин при комнатной температуре. Величину поглощения при 450 нм считывали с помощью ферментного маркера. Данные анализировали и строили график с использованием программного обеспечения Origin pro 9. Результаты подробно представлены на Фигуре 20. Результаты показали, что гуманизированные антитела 38E HuH3L2-m, 38E HuH3L4-m и антитело отрицательного контроля против CD28 не ингибируют связывание рекомбинантного человеческого LIF с человеческим белком GP130, а P36-033 может ингибировать связывание рекомбинантного

человеческого LIF с человеческим белком GP130.

#### **Пример 24 Анализ специфичности распознавания антигена гуманизированным антителом против LIF**

Человеческий LIF, человеческий IL-6, человеческий OSM и человеческий CNTF (все четыре белка были приобретены у YijiaoShenzhou, артикульные номера 14890-HNAH; 10395-HNAE; 10452-HNAH; 11841-H07E, соответственно) наносили в виде покрытия в концентрации 1 мкг/мл на планшеты, меченные ферментом, и различные концентрации антител против LIF 38E10E1C11, 38E huH3L2-m, 38E huH3L4-m инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. После четырехкратной промывки PBST добавляли HRP-меченые вторичные козы антигена против мышинного Fab и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. После четырехкратной промывки PBST добавляли окрашенный раствор TMB, и окрашивание проявляли в течение 10 минут при комнатной температуре. Значение поглощения при 450 нм считывалось ферментным маркером. Данные анализировали и строили график с использованием программного обеспечения Origin pro 9. Результаты представлены на Фигуре 21, результаты показывают, что антитела 38E10E1C11, 38E huH3L2-m и 38E huH3L4-m связываются только с человеческим белком LIF, но не с IL-6, OSM и CNTF человека.

#### **Пример 25 Идентификация эпитопов, распознаваемых гуманизированным антителом против LIF**

В предыдущих экспериментах изобретение обнаружило, что антитело 38E10E1C11 распознает линейный эпитоп белка LIF, поэтому в первую очередь необходимо проверить, распознает ли гуманизированное антитело 38E линейный эпитоп белка LIF. Брали супернатант клеток 293Т, трансфицированных последовательностью полноразмерного гена LIF человека, через 3 дня культивирования брали белковые последовательности Mut3 и Mut4 и отрицательный контроль супернатанта культуры клеток 293Т, добавляли загрузочный буфер 5xSDS-PAGE и кипятили в течение 10 минут. Затем брали 10 мкл образца для электрофореза в SDS-PAGE, а затем электрофоретические полосы переносили на мембрану PVDF для детекции вестерн-блоттингом. Первичным антителом для обнаружения было антитело 38E huH3L2 или 38E huH3L4 в концентрации 1 мкг/мл, и его инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре. Затем трижды промывали в буфере PBST и добавляли разбавленное HRP-меченое вторичное антитело овцы против Fc человека в соотношении 1:3000, инкубировали со вторичным антителом в течение 2 часов при комнатной температуре, трижды промывали в буфере PBST и добавляли усиленный Хемилюминесцентный раствор (Pierce, арт. 34079) и инкубировали. Для детекции и фотографирования использовали сверхчувствительное многофункциональное устройство визуализации Amersham Imager 600. Результаты показаны на части А Фигуры 22, результаты показывают, что оба гуманизированных антитела могут распознавать денатурированный белок LIF человека и белок Mut3, но не белок Mut4. Такие же результаты были получены в анализе пролиферации клеток M1, и результаты подробно

представлены на части В Фигуры 22. Следовательно, последовательности эпитопов, распознаваемые антителами 38E huH3L2 и 38E huH3L4, были определены как TYGPDTSKGKDVVFQKK (SEQ ID NO:61).

**Пример 26 Анализ ингибирования активации STAT3 клеток KP4 для определения активности гуманизованного антитела против LIF**

После гидролиза и центрифугирования клеток KP4 клетки ресуспендировали и высевали в 12-луночные планшеты по 1 мл,  $5 \times 10^5$  клеток/лунку. Планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение ночи. На следующий день исходную среду удаляли, добавляли клеточную среду, содержащую 50 нг/мл рекомбинантного человеческого белка LIF и различные концентрации гуманизованных антител против LIF, соответственно. Устанавливали контрольные лунки без рекомбинантного человеческого белка LIF и только с рекомбинантным человеческим белком LIF и без антител, и планшеты инкубировали в течение 30 мин при 37°C в инкубаторе. Затем среду удаляли, в каждую лунку добавляли 100 мкл 1х раствора для лизиса клеток и смесь лизировали в течение 30 мин на льду. Лизат переносили в 1.5 мл-центрифужную пробирку и центрифугировали при 13000 об/мин в течение 10 мин, супернатант собирали. Супернатант брали для вестерн-блоттинга для детекции фосфорилирования STAT3. Результаты показали, что гуманизованные антитела 38E huH3L4 и 38E huH3L2 были способны ингибировать индуцированное белком LIF фосфорилирование STAT3 (Фигура 23).

**Пример 27 Анализ пролиферации клеток M1 для определения активности гуманизованного антитела против LIF**

После центрифугирования M1 дважды промывали средой RPMI1640 и инокулировали 96-луночные планшеты с плотностью  $2,5 \times 10^5$  клеток/мл. В каждую лунку инокулировали по 80 мкл клеток и добавляли среду, содержащую 4 нг/мл рекомбинантного белка LIF человека и различные концентрации антител против LIF, чтобы довести конечный объем каждой лунки до 160 мкл. Между тем, контрольные лунки без LIF устанавливали и инкубировали при 37°C в течение 72 часов, и путем добавления ССК-8 детектировали пролиферацию. Результаты подробно представлены на Фигуре 24. Результаты показывают, что оба гуманизованных антитела, 38E huH3L4-m и 38E huH3L2-m, были способны реверсировать ингибирование пролиферации клеток M1 человеческим белком LIF с EC50, равной 6,52 мкг/мл и 8,93 мкг/мл, соответственно.

**Пример 28: Эффект ингибирования LIF-индуцированного фосфорилирования STAT3 антителом против LIF**

100000 клеток KP4 инокулировали в 96-луночные планшеты; и градиентно разбавленное антитело LIF инкубировали с 20-100 нг/мл белка LIF при комнатной температуре в течение 0,5-1 ч для образования смеси LIF-Ab. Смесь LIF-Ab добавляли в лунки с клетками и стимулировали в течение 5-30 мин при 37°C. Определение уровня экспрессии белка P-STAT3 и Total-STAT3 в соответствии с инструкциями наборов P-STAT3(TYR705) (Cisbio) и Total-STAT3 (Cisbio). Соотношение сигналов эмиссии донора и акцептора для каждой лунки рассчитывали: отношение=сигнал 665 нм/сигнал 620 нм

\*10<sup>4</sup>. Программное обеспечение Prism использовали для создания графиков данных и подсчета степени ингибирования антитела LIF. Результаты показали, что антитело 38E HuH3L4 к LIF обладает эффектом ингибирования фосфорилирования STAT3, индуцированного LIF, как показано на Фигуре 25, с IC50, равной 3,415 нМ.

#### **Пример 29: Детектирование активности ADCC антитела LIF**

LIF связывается с GP130 и LIFR, тогда как гуманизированное антитело против LIF блокирует связывание LIF с LIFR, но не связывание LIF с GP130. Детектирование того, имеет ли место опосредованное LIF связывание гуманизированного антитела против LIF с клеточной поверхностью, и, таким образом, функционирования ADCC. Антитела Эрбитукс (Epiduo®, Merck Serono, положительный контроль) и IgG2 человека (Cat#HG2K, Sino, отрицательный контроль) последовательно разбавляли ADCC-буфером (RPMI-1640+1% FBS); затем антитело 38E huH3L4 разбавляли в трех экземплярах и восьми градиентах ADCC-буфером, содержащим белок LIF, и откладывали. Клетки DLD-1 гидролизуют трипсином (кат#25200072, GIBCO) и после терминации реакции клетки разбивали и собирали в центрифужную пробирку, центрифугировали при 1500 об/мин в течение 3 мин. Супернатант удаляли, клетки повторно суспендировали в ADCC-буфере и подсчитывали. Доводили концентрацию клеток и откладывали. Клетки PBMC (кат#SLB-HP010B, Shanghai SAILYBIO Ltd.) восстанавливали и добавляли 10 мл ADCC-буфера, центрифугировали при 2000 об/мин в течение 10 минут и отбрасывали супернатант. Клетки PBMC повторно суспендировали в буфере ADCC и подсчитывали. Концентрацию клеток доводили и откладывали; и брали 96-луночный планшет для культивирования клеток с U-образным дном, по очереди добавляли 50 мкл клеток-мишеней DLD-1, 50 мкл антител и 50 мкл эффекторных клеток PBMC. Соотношение эффекторных клеток PBMC и клеток-мишеней составляло 30:1. Реакцию проводили в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> при 37°C в течение 6 часов. LDH определяли с помощью набора для анализа нерадиоактивной цитотоксичности Cyto Tox96 (кат#G1780, Promega), а значения поглощения измеряли при 490 нм с использованием ферментного маркера.

Средние значения поглощения для каждой параллельной лунки рассчитывали таким образом, что средние значения поглощения всех экспериментальных лунок, лунок спонтанного высвобождения LDH клеток-мишеней (TCR) и лунок спонтанного высвобождения LDH эффекторных клеток (ECR) вычитали из средних значений поглощения пустой среды (CMB). Среднее значение поглощения лунок с максимальным высвобождением LDH из клеток-мишеней (TCM) вычитали из среднего значения поглощения контрольных лунок с поправкой на объем (VCC). Цитотоксичность (%) для каждой концентрации антитела рассчитывали с использованием приведенных выше скорректированных значений по следующей формуле.

$$\text{Цитотоксичность (\%)} = (A - B - C) / (D - C) \times 100\%$$

A: среднее значение поглощения после коррекции экспериментальных лунок.

B: среднее значение поглощения скорректированных лунок спонтанного высвобождения LDH эффекторными клетками.

C: среднее значение поглощения скорректированных лунок спонтанного высвобождения LDH клеткой-мишенью.

D: среднее значение поглощения скорректированной лунки максимального высвобождения LDH клетки-мишени.

Как показано на Фигуре 26, антитело 38E huH3L4 не обладало ADCC-активностью.

Список литературы:

1.Nicola NA, Babon JJ. Leukemia inhibitory factor (LIF). *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015; 26(5):533-44.

2.Pastuschek J, Poetzsch J, Morales-Prieto DM, Schlußner E, Markert UR, Georgiev G. Stimulation of the JAK/STAT pathway by LIF and OSM in the human granulosa cell line COV434. *J. Reprod. Immunol.* 2015; 108:48-55.

3.Liu SC, Tsang NM, Chiang WC, Chang KP, Hsueh C, Liang Y, Juang JL, Chow KP, Chang YS. Leukemia inhibitory factor promotes nasopharyngeal carcinoma progression and radioresistance. *J. Clin. Invest.* 2013; 123(12):5269-83.

4.Shi Y, Gao W, Lytle NK, Huang P, Yuan X, Dann AM, et al. Targeting LIF-mediated paracrine interaction for pancreatic cancer therapy and monitoring. *Nature.* 2019; 569(7754):131-135.

5.Cartwright P, McLean C, Sheppard A, Rivett D, Jones K, Dalton S. LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development* 2005; 132:885-96.

6.Kuphal S, Wallner S, Bosserhoff AK. Impact of LIF (leukemia inhibitory factor) expression in malignant melanoma. *Exp Mol Pathol* 2013; 95:156-65.

7.Liu B, Lu Y, Li J, Liu Y, Liu J, Wang W. Leukemia inhibitory factor promotes tumor growth and metastasis in human osteosarcoma via activating STAT3. *APMIS* 2015;123:837-46.

8.Morton SD, Cadamuro M, Brivio S, Vismara M, Stecca T, Massani M, et al. Leukemia inhibitory factor protects cholangiocarcinoma cells from drug induced apoptosis via a PI3K/AKT-dependent Mcl-1 activation. *Oncotarget.* 2015;6:26052-64.

9.Kamohara H, Ogawa M, Ishiko T, Sakamoto K, Baba H. Leukemia inhibitory factor functions as a growth factor in pancreas carcinoma cells: involvement of regulation of LIF and its receptor expression. *Int J Oncol.* 2007;30:977-83.

10.Shin JE, Park SH, Jang YK. Epigenetic up-regulation of leukemia inhibitory factor (LIF) gene during the progression to breast cancer. *Mol Cells* 2011; 31:181-9.

11.Li X, Yang Q, Yu H, Wu L, Zhao Y, Zhang C, Yue X, Liu Z, Wu H, Haffty BG, Feng Z, Hu W. LIF promotes tumorigenesis and metastasis of breast cancer through the AKT-mTOR pathway. *Oncotarget.* 2014; 5(3):788-801.

12.Liu SC, Hsu T, Chang YS, Chung AK, Jiang SS, OuYang CN, Yuh CH, Hsueh C, Liu YP, Tsang NM. Cytoplasmic LIF reprograms invasive mode to enhance NPC dissemination through modulating YAP1-FAK/PXN signaling. *Nat Commun.* 2018; 9(1):5105.

13.Viswanadhapalli S, Luo Y, Sareddy GR, Santhamma B, Zhou M, et al. EC359: A First-in-Class Small-Molecule Inhibitor for Targeting Oncogenic LIFR Signaling in Triple-

Negative Breast Cancer. *Mol Cancer Ther.* 2019; 18(8):1341-1354.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с эпитопом, представленным аминокислотной последовательностью TYGPDTSKGKDVFQKK (SEQ ID NO: 61) человеческого белка LIF, или с эпитопом соответствующей аминокислотной последовательности другого вида млекопитающих.

2. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее:

(a) LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 или 66 и их консервативных модификаций;

(b) LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 или 67 и их консервативных модификаций;

(c) LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3 или 68 и их консервативных модификаций;

(d) HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4 или 69 и их консервативных модификаций;

(e) HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 45 или 70 и их консервативных модификаций; и

(f) HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6 или 71 и их консервативных модификаций.

3. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 2, содержащее:

(a) LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и ее консервативных модификаций;

(b) LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и ее консервативных модификаций;

(c) LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3 и ее консервативных модификаций;

(d) HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4 и ее консервативных модификаций;

(e) HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5 или 45 и их консервативных модификаций;

(f) HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6 и ее консервативных модификаций.

4. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 2 или 3, содержащее:

1) (a) LCDR1, содержащую SEQ ID NO: 1, (b) LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 2, (c) LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 3, (d) HCDR1, содержащую SEQ ID NO: 4, (e) HCDR2, содержащую SEQ ID NO: 5, и (f) HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 6;

2) (a) LCDR1, содержащую SEQ ID NO: 1, (b) LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 2, (c) LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 3, (d) HCDR1, содержащую SEQ ID NO: 4, (e) HCDR2, содержащую SEQ ID NO: 45, и (f) HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 6; или

3) (a) LCDR1, содержащую SEQ ID NO: 66, (b) LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 67, (c) LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 68, (d) HCDR1, содержащую SEQ ID NO: 69, (e) HCDR2, содержащую SEQ ID NO: 70, и (f) HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 71.

5. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 4, содержащее:

(a) LCDR1, содержащую SEQ ID NO: 1, (b) LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 2, (c) LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 3, (d) HCDR1, содержащую SEQ ID NO: 4, (e) HCDR2, содержащую SEQ ID NO: 5 и (f) HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 6.

6. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 4, содержащее:

(a) LCDR1, содержащую SEQ ID NO: 1, (b) LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 2, (c) LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 3, (d) HCDR1, содержащую SEQ ID NO: 4, (e) HCDR2, содержащую SEQ ID NO: 45 и (f) HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 6.

7. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 4, содержащее:

(a) LCDR1, содержащую SEQ ID NO: 66, (b) LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 67, (c) LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 68, (d) HCDR1, содержащую SEQ ID NO: 69, (e) HCDR2, содержащую SEQ ID NO: 70 и (f) HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 71.

8. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 2-7, содержащее:

(i) переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 11, 15, 19, 46, 74 или 82, и их консервативных модификаций; и

(ii) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23, 27, 31, 48, 75 или 83, и их консервативных модификаций.

9. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 2-8, содержащее:

(i) переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 11, 15, 19 или 46, и их консервативных модификаций; и

(ii) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23, 27, 31 или 48, и их консервативных модификаций.

10. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 2-9, где выделенное антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую





15) вариабельную область легкой цепи (VL), которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 82, и вариабельную область тяжелой цепи (VH), которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 83.

12. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 2-11, содержащее вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с вариабельной областью легкой цепи и вариабельной областью тяжелой цепи, выбранным из последовательностей 1)-15) по п. 11, соответственно.

13. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 11, содержащее:

вариабельную область легкой цепи (VL), которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7, и вариабельную область тяжелой цепи (VH), которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 23.

14. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 11, содержащее:

вариабельную область легкой цепи (VL), которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7, и вариабельную область тяжелой цепи (VH), которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 27.

15. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 11, содержащее:

вариабельную область легкой цепи (VL), которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7, и вариабельную область тяжелой цепи (VH), которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 31.

16. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 11, содержащее:

вариабельную область легкой цепи (VL), которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 11, и вариабельную область тяжелой цепи (VH), которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 23.





меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 13, 17, 21, 37, 39, 50 или 54, и их консервативных модификаций; и

(II) тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 29, 33, 35, 52 или 56, и их консервативных модификаций.

29. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 2-28, содержащее легкую и тяжелую цепь, где:

(I) легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 13, 17, 21, 37, 39 или 50, и их консервативных модификаций; и

(II) тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 29, 33, 35 или 52, и их консервативных модификаций.

30. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 2-29, содержащее легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с легкой цепью, выбранной из (I) последовательностей по п. 28 или 29, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с тяжелой цепью, выбранной из (II) последовательностей по п. 28 или 29.

31. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 2-30, содержащее:

1) легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9, и тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 25;

2) легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9, и тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 29;

3) легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9, и тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 33;



имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 37, и тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью. SEQ ID NO: 35;

14) легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 39, и тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью. SEQ ID NO: 35;

15) легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 50, и тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью. SEQ ID NO: 52; или

16) легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 54, и тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 56.

32. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 2-31, содержащее легкую и тяжелую цепь, где легкая и тяжелая цепь содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с переменными областями легкой и тяжелой цепи, выбранными из последовательностей 1)-16) по п. 31, соответственно.

33. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 31, содержащее:

легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9, и тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 25.

34. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 31, содержащее:

легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9, и тяжелую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 29.

35. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 31, содержащее:

легкую цепь, которая содержит аминокислотную последовательность, имеющую





меньшей мере 85% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 56.

49. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее: (a) LCDR1, содержащую SEQ ID NO: 1, (b) LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 2, (c) LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 3, (d) HCDR1, содержащую SEQ ID NO: 4, (e) HCDR2, содержащую SEQ ID NO: 5, и (f) HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 6.

50. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее: (a) LCDR1, содержащую SEQ ID NO: 1, (b) LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 2, (c) LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 3, (d) HCDR1, содержащую SEQ ID NO: 4, (e) HCDR2, содержащую SEQ ID NO: 45, и (f) HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 6.

51. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее переменную область легкой цепи (VL), представленную SEQ ID NO: 7, и переменную область тяжелой цепи (VH), представленную SEQ ID NO: 23.

52. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее переменную область легкой цепи (VL), представленную SEQ ID NO: 11, и переменную область тяжелой цепи (VH), представленную SEQ ID NO: 31.

53. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее переменную область легкой цепи (VL), представленную SEQ ID NO: 19, и переменную область тяжелой цепи (VH), представленную SEQ ID NO: 31.

54. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-53, где выделенное антитело представляет собой IgG.

55. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-54, где выделенное антитело представляет собой IgG1, IgG2 или IgG4.

56. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-55, где выделенное антитело представляет собой моноклональное антитело, химерное антитело, гуманизованное антитело, сконструированное человеческое антитело, человеческое антитело, биспецифическое антитело, Fv, одноцепочечное антитело (scFv), Fab, Fab', Fab'-SH или F(ab')<sub>2</sub>.

57. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-56, которое представляет собой антагонист фактора, ингибирующего лейкоз (LIF).

58. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-56, которое способно ингибировать экспрессию LIF и/или блокировать активность LIF.

59. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-56, которое способно конкурировать или перекрестно конкурировать за связывание с LIF.

60. Нуклеотидная композиция, содержащая молекулу нуклеотида, кодирующего выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-59.

61. Нуклеотидная композиция по п. 60, содержащая:

(i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую ДНК, кодирующую переменную область легкой цепи (VL), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7, 11, 15, 19, 46 или 82; и

(ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую ДНК, кодирующую переменную область тяжелой цепи (VH), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 23, 27, 31, 48 или 83.

62. Нуклеотидная композиция по п. 60 или 61, содержащая:

(i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую ДНК, кодирующую переменную область легкой цепи (VL), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7, 11, 15, 19 или 46; и

(ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую ДНК, кодирующую переменную область тяжелой цепи (VH), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 23, 27, 31 или 48.

63. Нуклеотидная композиция по любому из пп. 60-62, содержащая:

(i) первую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую ДНК, кодирующую переменную область легкой цепи (VL), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7, 11, 15 или 19; и

(ii) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую ДНК, кодирующую переменную область тяжелой цепи (VH), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 23, 27 или 31.

64. Нуклеотидная композиция по любому из пп. 60-63, содержащая:

1) первую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую ДНК, кодирующую переменную область легкой цепи (VL), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7, и вторую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую ДНК, кодирующую переменную область тяжелой цепи (VH), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 23;

2) первую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую ДНК, кодирующую переменную область легкой цепи (VL), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7, и вторую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую ДНК, кодирующую переменную область тяжелой цепи (VH), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 27;

3) первую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую ДНК, кодирующую переменную область легкой цепи (VL), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7, и вторую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую ДНК, кодирующую переменную область тяжелой цепи (VH), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 31;

4) первую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую ДНК, кодирующую переменную область легкой цепи (VL), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 11, и вторую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую ДНК, кодирующую переменную область тяжелой цепи (VH), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 23;

5) первую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую ДНК, кодирующую переменную область легкой цепи (VL), представленную аминокислотной



последовательностью SEQ ID NO: 46, и вторую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую ДНК, кодирующую переменную область тяжелой цепи (VH), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 48;

14) первую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую ДНК, кодирующую переменную область легкой цепи (VL), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 74, и вторую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую ДНК, кодирующую переменную область тяжелой цепи (VH), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 75; или

15) первую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую ДНК, кодирующую переменную область легкой цепи (VL), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 82, и вторую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую ДНК, кодирующую переменную область тяжелой цепи (VH), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 83.

65. Нуклеотидная композиция по любому из пп. 60-64, где ДНК, кодирующая переменную область легкой цепи (VL), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7, соответствует SEQ ID NO: 8.

66. Нуклеотидная композиция по любому из пп. 60-65, где ДНК, кодирующая переменную область легкой цепи (VL), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 11, соответствует SEQ ID NO: 12.

67. Нуклеотидная композиция по любому из пп. 60-66, где ДНК, кодирующая переменную область легкой цепи (VL), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 15, соответствует SEQ ID NO: 16.

68. Нуклеотидная композиция по любому из пп. 60-67, где ДНК, кодирующая переменную область легкой цепи (VL), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 19, соответствует SEQ ID NO: 20.

69. Нуклеотидная композиция по любому из пп. 60-68, где ДНК, кодирующая переменную область легкой цепи (VL), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 46, соответствует SEQ ID NO: 47.

70. Нуклеотидная композиция по любому из пп. 60-69, где ДНК, кодирующая переменную область легкой цепи (VL), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 74, соответствует SEQ ID NO: 76.

71. Нуклеотидная композиция по любому из пп. 60-70, где ДНК, кодирующая переменную область легкой цепи (VL), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 82, соответствует SEQ ID NO: 72.

72. Нуклеотидная композиция по любому из пп. 60-71, где ДНК, кодирующая переменную область тяжелой цепи (VH), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 23, соответствует SEQ ID NO: 24.

73. Нуклеотидная композиция по любому из пп. 60-72, где ДНК, кодирующая переменную область тяжелой цепи (VH), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 27, соответствует SEQ ID NO: 28.

74. Нуклеотидная композиция по любому из пп. 60-73, где ДНК, кодирующая переменную область тяжелой цепи (VH), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 31, соответствует SEQ ID NO: 32.

75. Нуклеотидная композиция по любому из пп. 60-74, где ДНК, кодирующая переменную область тяжелой цепи (VH), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 48, соответствует SEQ ID NO: 49.

76. Нуклеотидная композиция по любому из пп. 60-75, где ДНК, кодирующая переменную область тяжелой цепи (VH), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 75, соответствует SEQ ID NO: 77.

77. Нуклеотидная композиция по любому из пп. 60-76, где ДНК, кодирующая переменную область тяжелой цепи (VH), представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 83, соответствует SEQ ID NO: 73.

78. Нуклеотидная композиция по любому из пп. 60-77, содержащая:

(I) первую последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую ДНК, кодирующую легкую цепь, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9, 13, 17, 21, 37, 39, 50 или 54; и

(II) вторую последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую ДНК, кодирующую тяжелую цепь, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 25, 29, 33, 35, 52 или 56.

79. Нуклеотидная композиция по любому из пп. 60-78, содержащая:

(I) первую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую ДНК, кодирующую легкую цепь, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9, 13, 17, 21, 37, 39 или 50; и

(II) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую ДНК, кодирующую тяжелую цепь, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 25, 29, 33, 35 или 52.

80. Нуклеотидная композиция по любому из пп. 60-79, содержащая:

(I) первую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую ДНК, кодирующую легкую цепь, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9, 13, 17 или 21; и

(II) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую ДНК, кодирующую тяжелую цепь, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 25, 29 или 33.

81. Нуклеотидная композиция по любому из пп. 60-80, содержащая:

1) первую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую ДНК, кодирующую легкую цепь, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9, и вторую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую ДНК, кодирующую тяжелую цепь, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 25;

2) первую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую ДНК, кодирующую легкую цепь, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9, и





тяжелую цепь, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 25, соответствует SEQ ID NO: 26.

90. Нуклеотидная композиция по любому из пп. 78-89, где ДНК, кодирующая тяжелую цепь, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 29, соответствует SEQ ID NO: 30.

91. Нуклеотидная композиция по любому из пп. 78-90, где ДНК, кодирующая тяжелую цепь, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 33, соответствует SEQ ID NO: 34.

92. Нуклеотидная композиция по любому из пп. 78-91, где ДНК, кодирующая тяжелую цепь, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 35, соответствует SEQ ID NO: 36.

93. Нуклеотидная композиция по любому из пп. 78-92, где ДНК, кодирующая тяжелую цепь, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 52, соответствует SEQ ID NO: 53.

94. Нуклеотидная композиция по любому из пп. 78-93, где ДНК, кодирующая тяжелую цепь, представленную аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 56, соответствует SEQ ID NO: 57.

95. Вектор, содержащий нуклеотидную композицию по любому из пп. 60-94.

96. Вектор по п. 95, представляющий собой эукариотический экспрессирующий вектор, прокариотический экспрессирующий вектор или вирусный вектор.

97. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п. 95 или 96.

98. Клетка-хозяин по п. 97, где клетку-хозяин, содержащую вектор, получают трансформацией вектора.

99. Клетка-хозяин по пп. 97 или 98, представляющая собой бактерию, дрожжевую клетку или клетку млекопитающего.

100. Клетка-хозяин по любому из пп. 97-99, представляющая собой *Escherichia coli*, дрожжи *Pichia*, клетки яичника китайского хомяка или эмбриональные клетки почки человека 293.

101. Способ получения выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-59, включающий экспрессию антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в клетке-хозяине по любому из пп. 97-100 и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

102. Фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-59 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

103. Реагент для детекции LIF в биологических образцах, содержащий выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-59.

104. Реагент по п. 103, где биологические образцы представляют собой кровь, сыворотку, мочу, материалы биопсии, опухоль или любые ткани, предположительно имеющие аномальный уровень LIF.

105. Способ ингибирования экспрессии LIF и/или блокирования активности LIF, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-59, и/или фармацевтической композиции по п. 102.

106. Применение выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-59 и/или фармацевтической композиции по п. 102 в получении лекарственного средства, применяемого для ингибирования экспрессии LIF и/или блокирования активности LIF.

107. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-59 и/или фармацевтическая композиция по п. 102 для применения для ингибирования экспрессии LIF и/или блокирования активности LIF.

108. Способ детектирования LIF в биологических образцах, включающий (i) получение образца ткани или жидкости пациента, (ii) воздействие на образец ткани или жидкости выделенным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-59 или реагентом по п. 103 или 104; и (iii) сравнение связывания LIF с образцом ткани или жидкости из (ii) со связыванием LIF с контрольным образцом, где увеличение количества связанного LIF по сравнению с контрольным образцом демонстрирует аномальный уровень продуцирования, экспрессии или активации LIF.

109. Способ по п. 108, где образец ткани или жидкости содержит кровь, сыворотку, мочу, материалы биопсии, опухоль или любые ткани, предположительно имеющие аномальный уровень LIF.

110. Способ лечения заболевания или состояния, связанного с LIF, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-59 и/или фармацевтической композиции по п. 102.

111. Способ по п. 110, где заболевание или состояние, связанное с LIF, представляет собой опухоль.

112. Способ по п. 111, где опухоль представляет собой солидную опухоль.

113. Способ по п. 112, где солидная опухоль включает глиобластому, рак легкого, рак яичников, колоректальный рак, рак поджелудочной железы или рак предстательной железы.

114. Применение выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-59 и/или фармацевтической композиции по п. 102 в получении лекарственного средства для лечения заболевания или состояния, связанного с LIF.

115. Применение по п. 114, где заболевание или состояние, связанное с LIF, представляет собой опухоль.

116. Применение по п. 115, где опухоль представляет собой солидную опухоль.

117. Применение по п. 116, где солидная опухоль включает глиобластому, рак легкого, рак яичников, колоректальный рак, рак поджелудочной железы или рак предстательной железы.

118. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-59 и/или фармацевтическая композиция по п. 102 для применения при лечении заболевания или состояния, связанного с LIF.

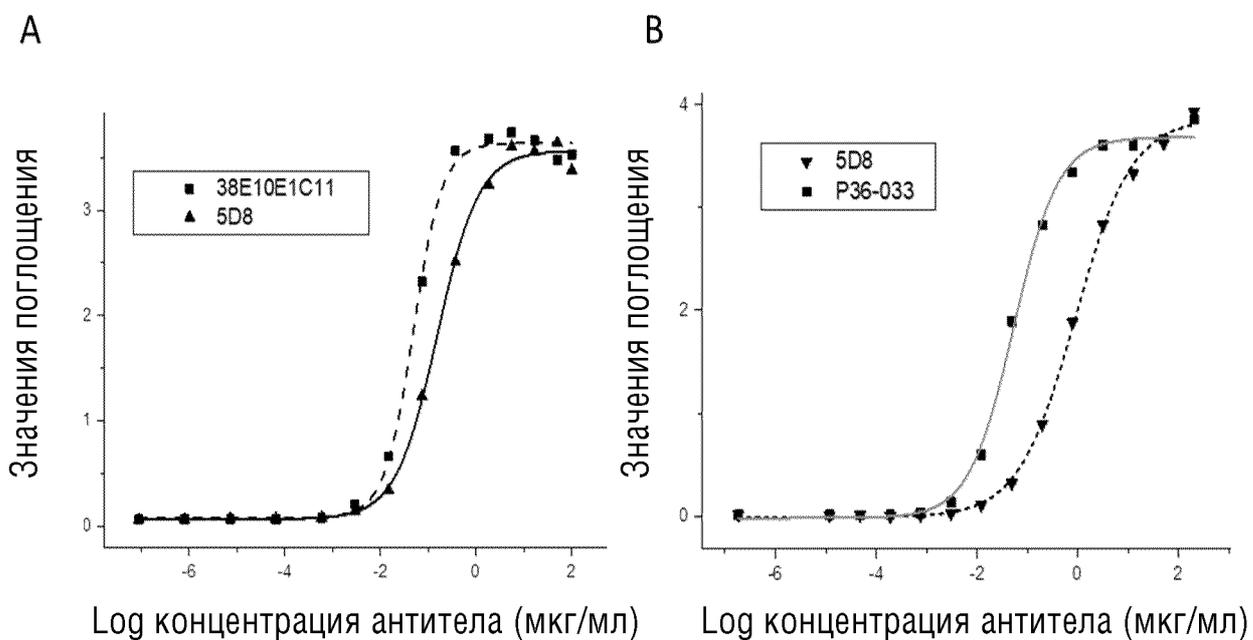
119. Применение по п. 118, где заболевание или состояние, связанное с LIF, представляет собой опухоль.

120. Применение по п. 119, где опухоль представляет собой солидную опухоль.

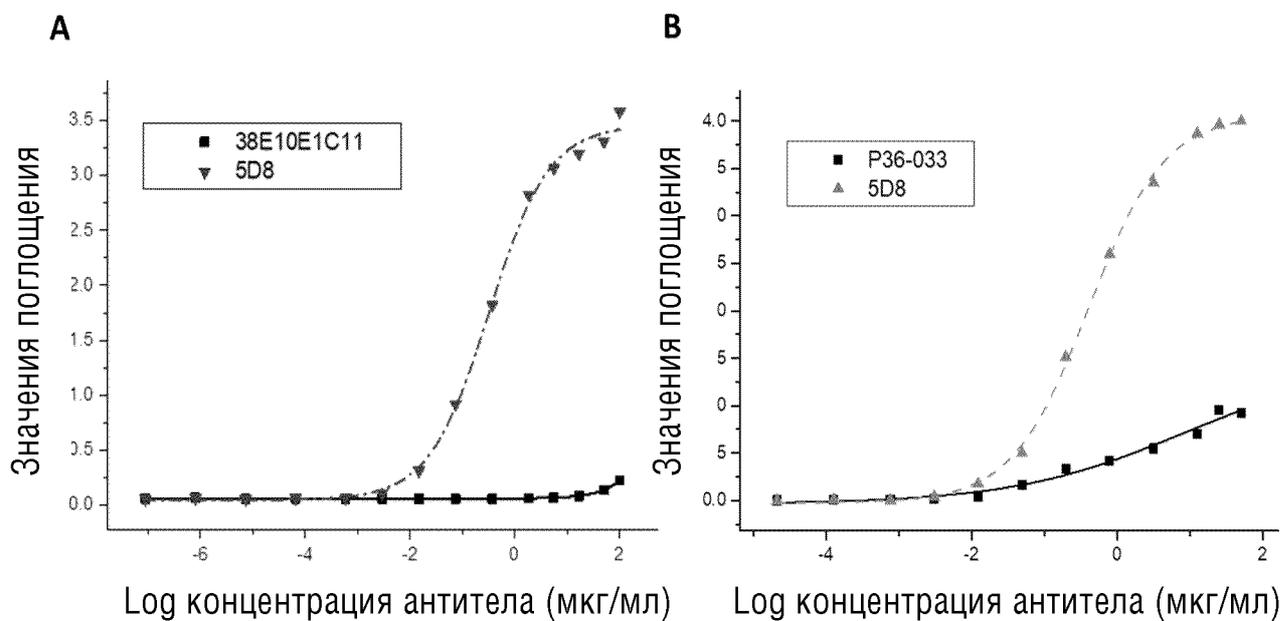
121. Применение по п. 120, где солидная опухоль включает глиобластому, рак легкого, рак яичников, колоректальный рак, рак поджелудочной железы или рак предстательной железы.

По доверенности

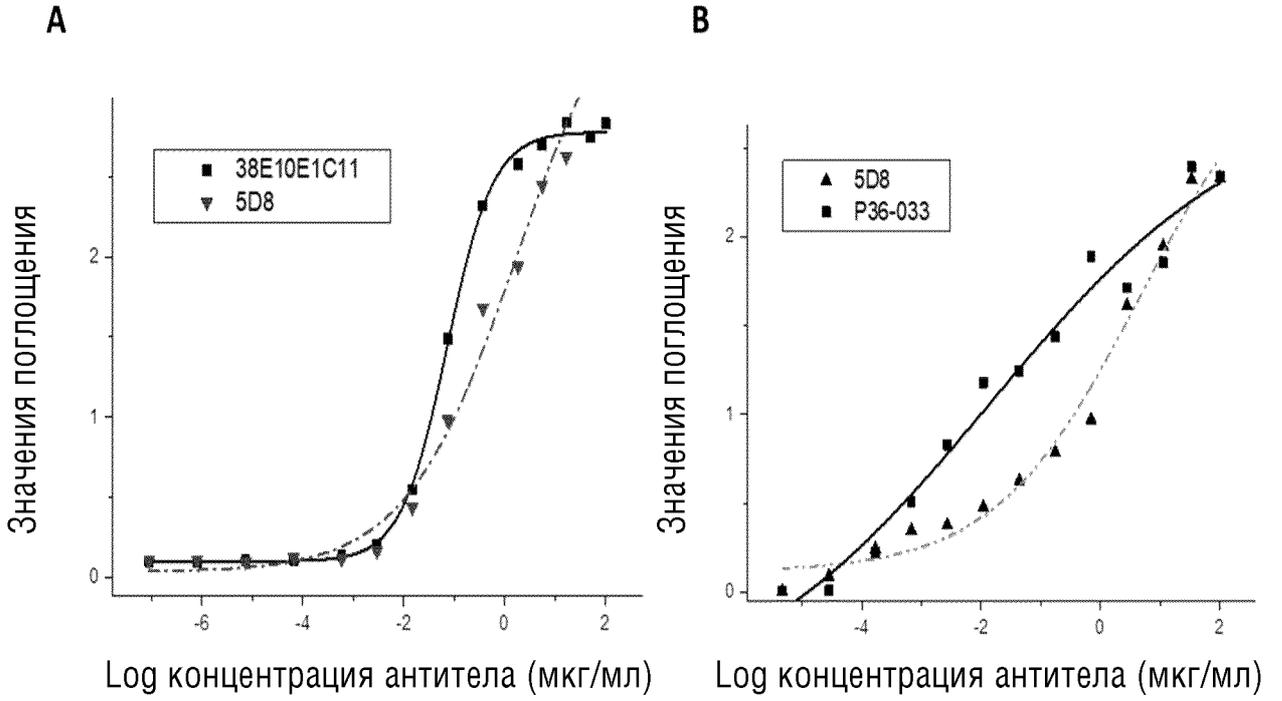
ФИГ.1



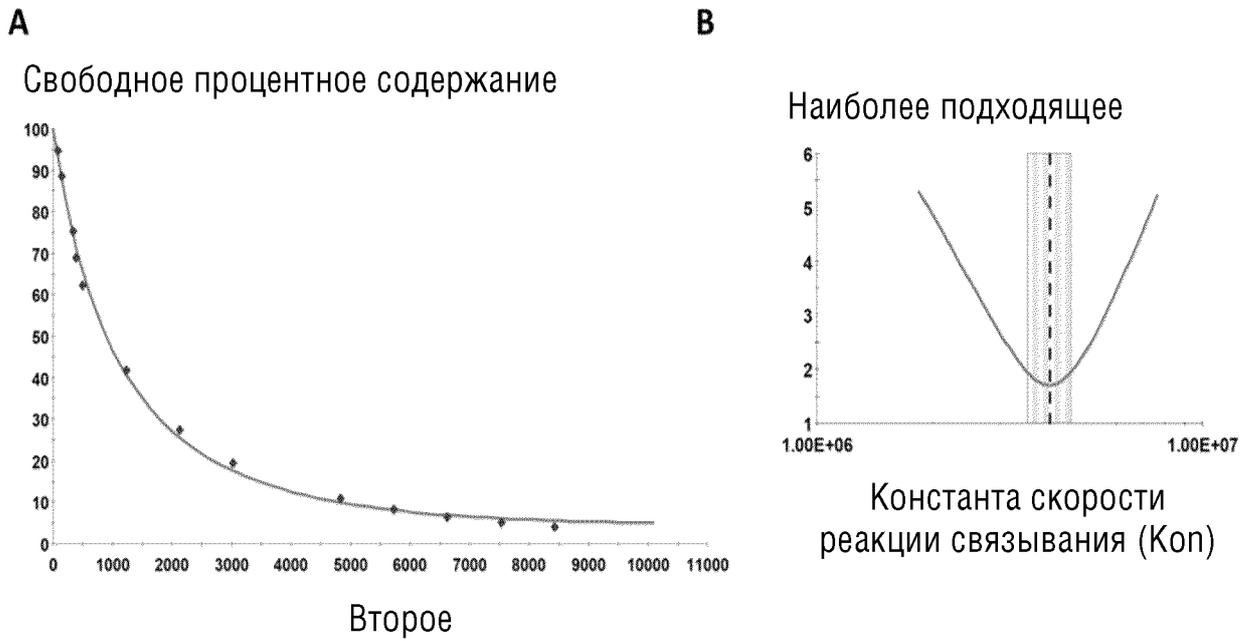
ФИГ.2



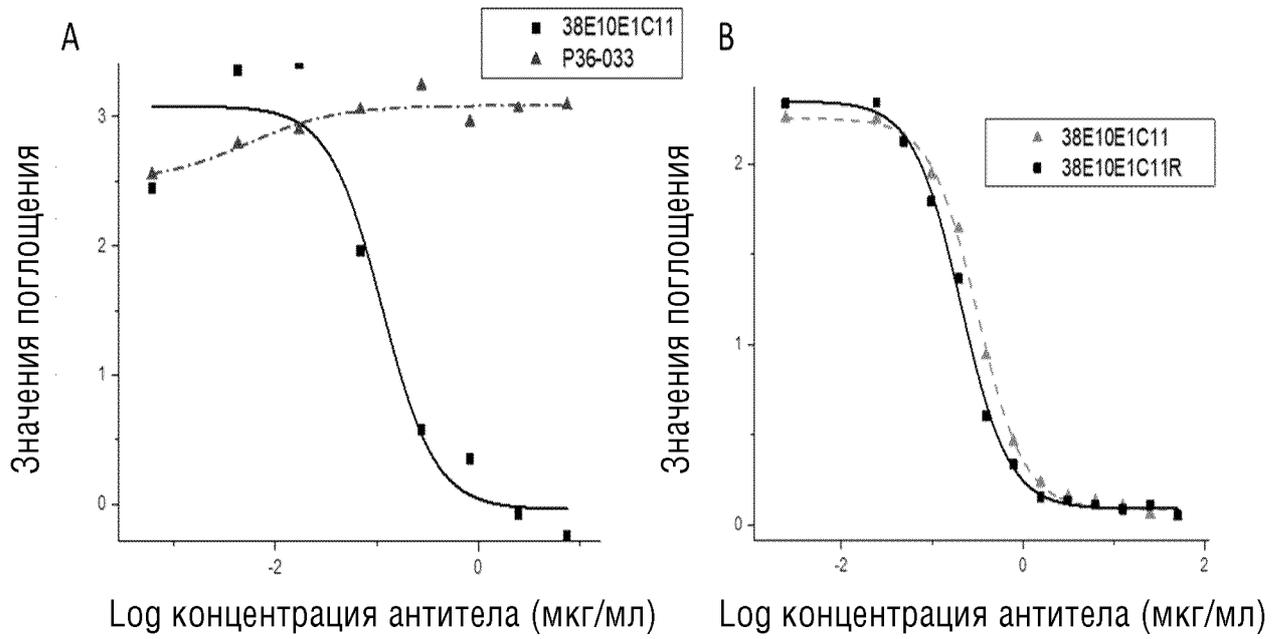
ФИГ.3



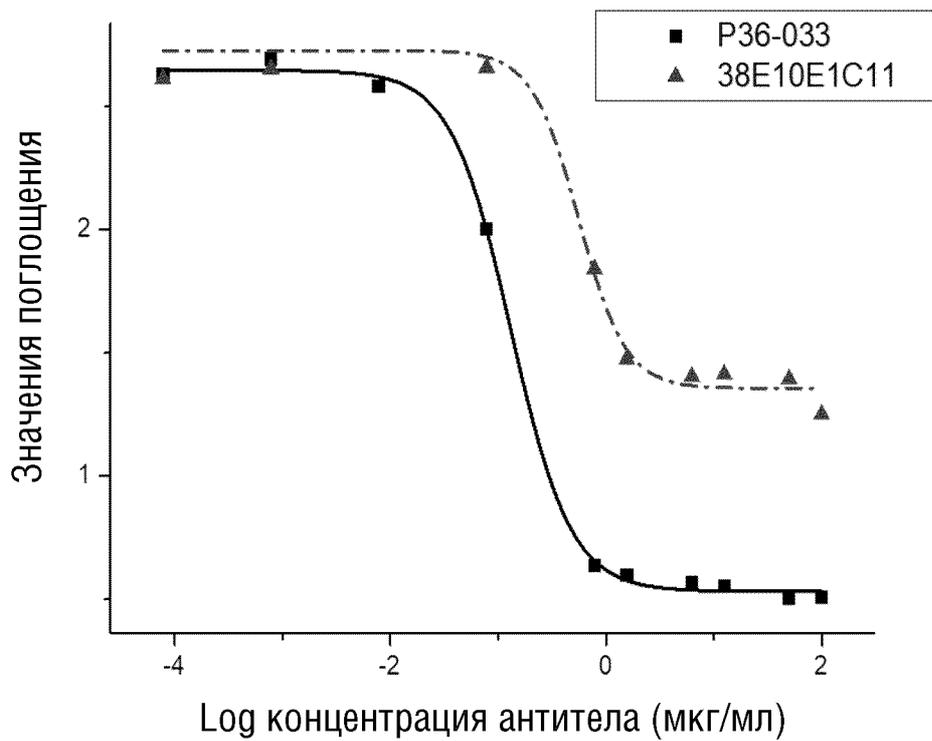
ФИГ.4



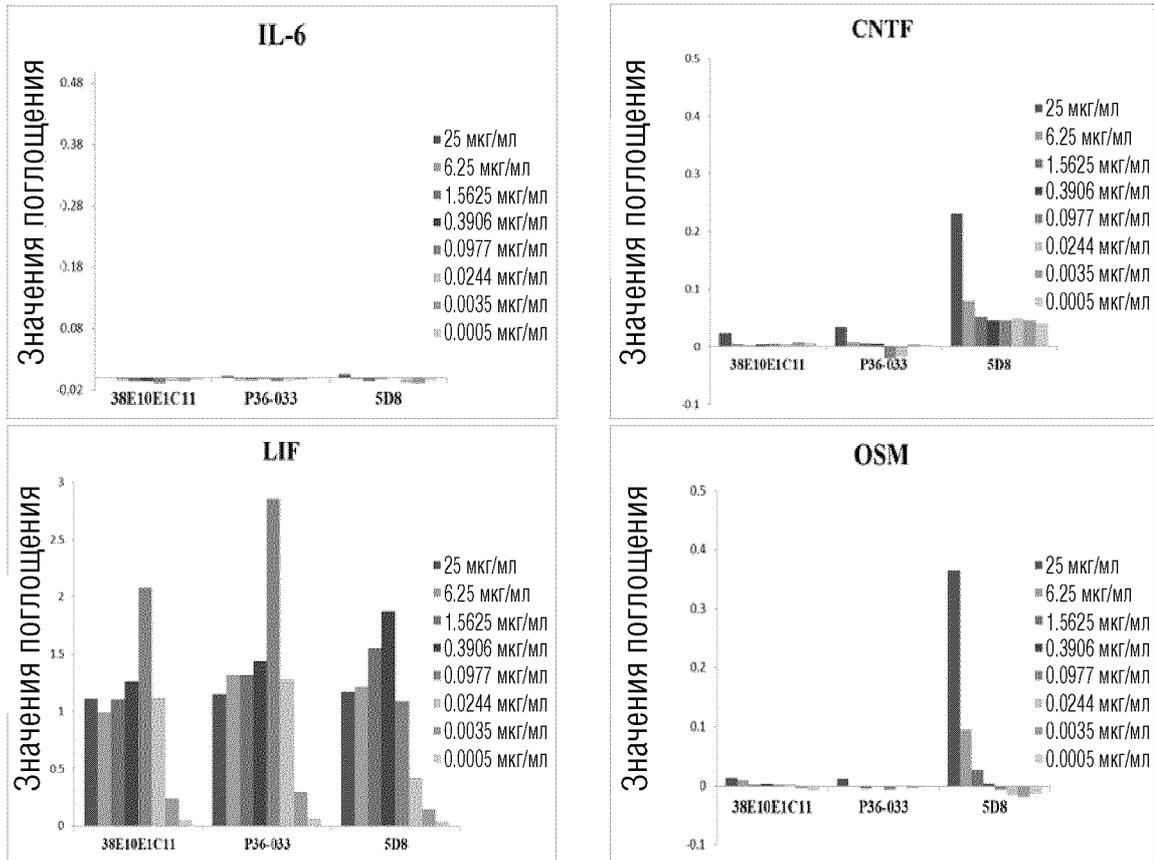
ФИГ.5



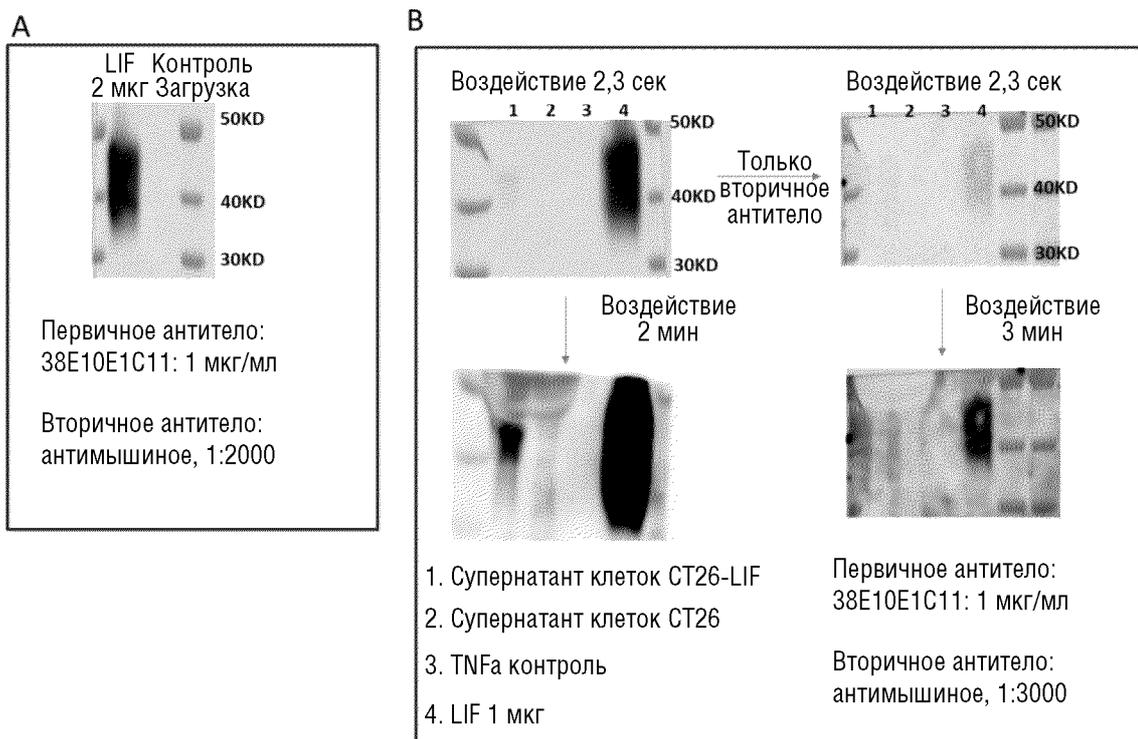
ФИГ.6



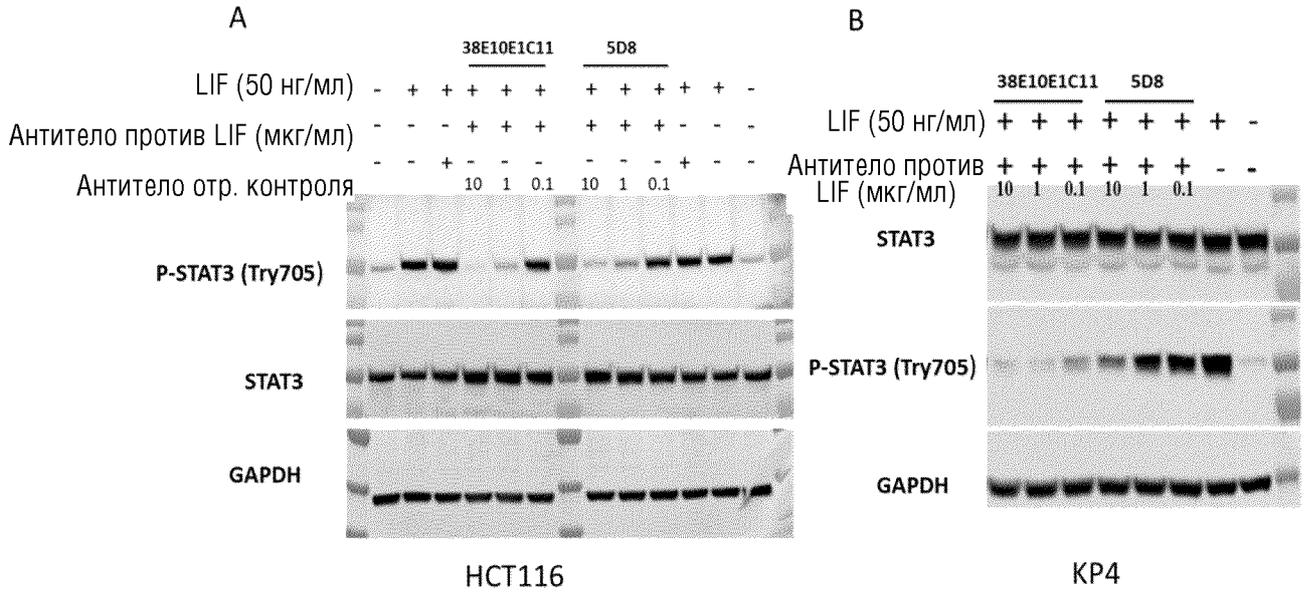
ФИГ.7



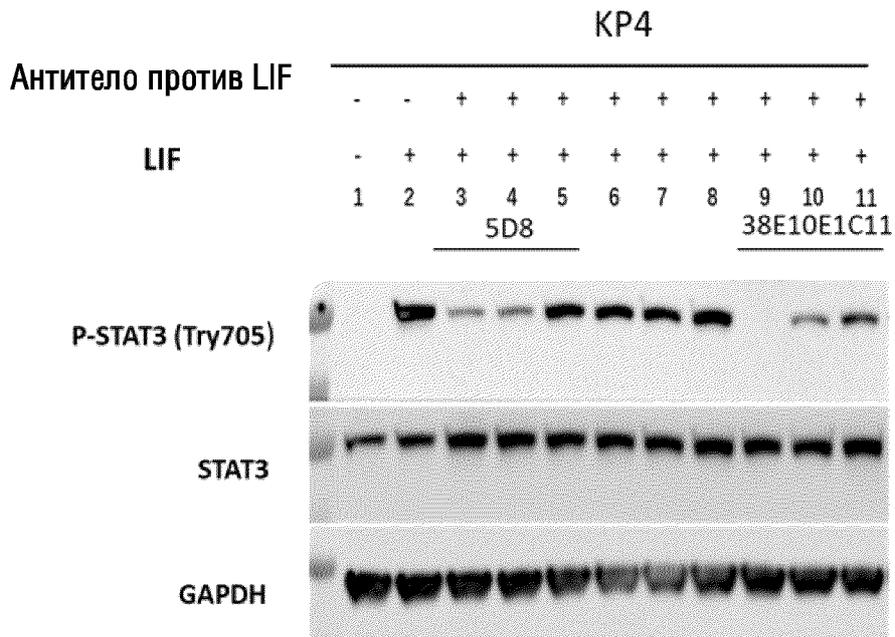
ФИГ.8



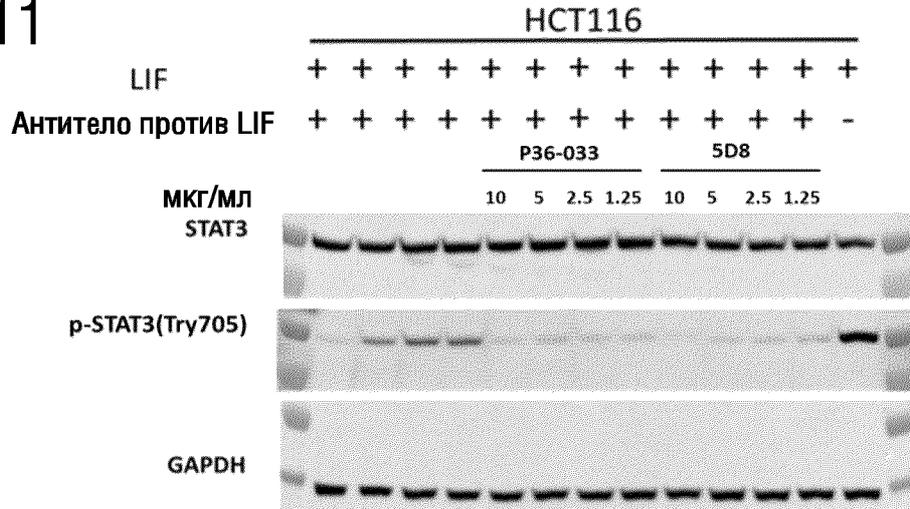
ФИГ.9



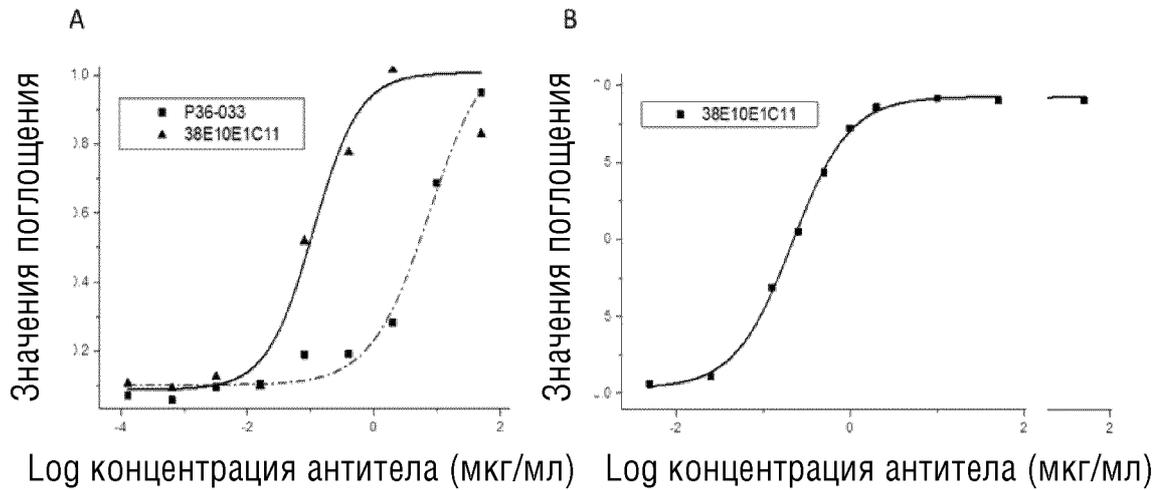
ФИГ.10



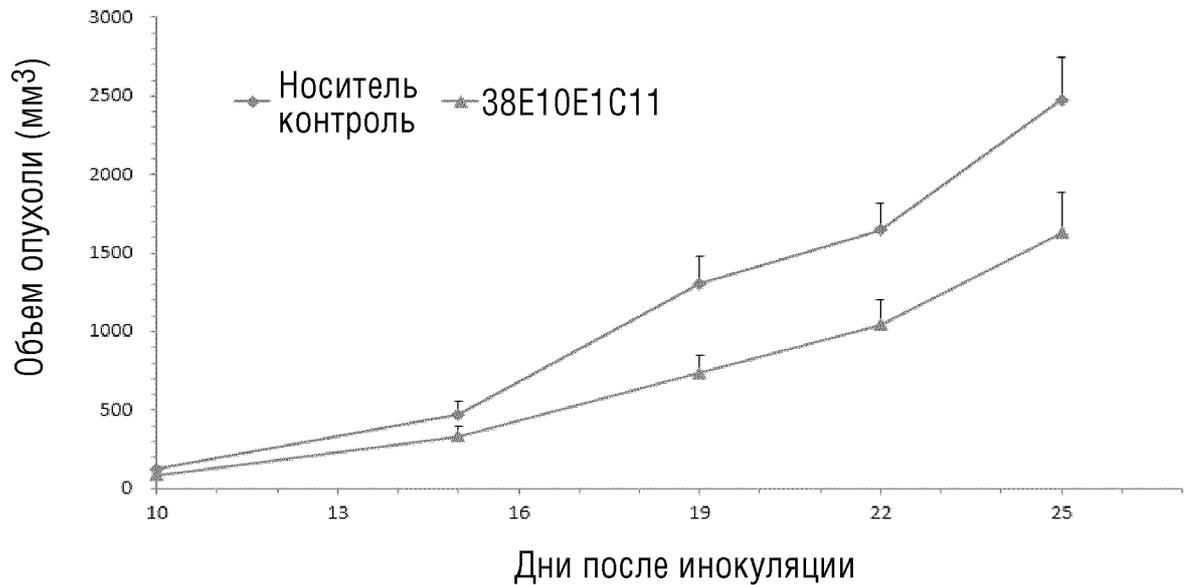
ФИГ.11



ФИГ.12

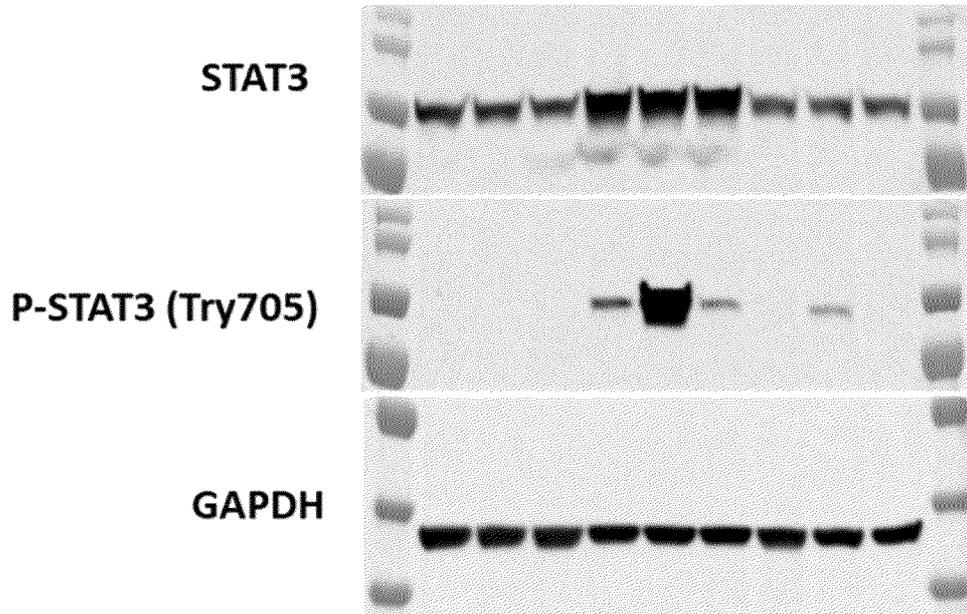


ФИГ.13



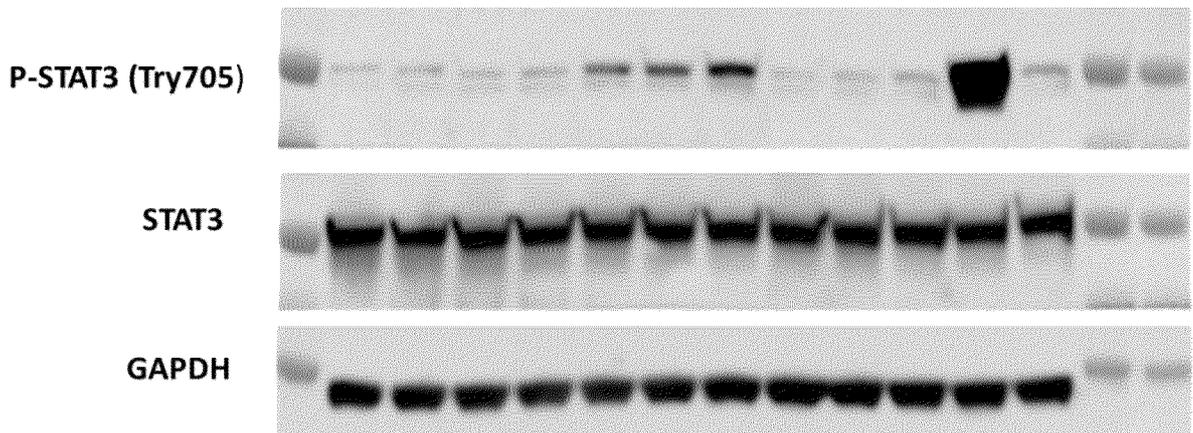
## ФИГ.14

	Panc02.03			KP4			MIA-PaCa-2		
LIF (50 нг/мл)	-	+	+	-	+	+	-	+	+
Антитело против LIF (мкг/мл)	-	-	+	-	-	+	-	-	+



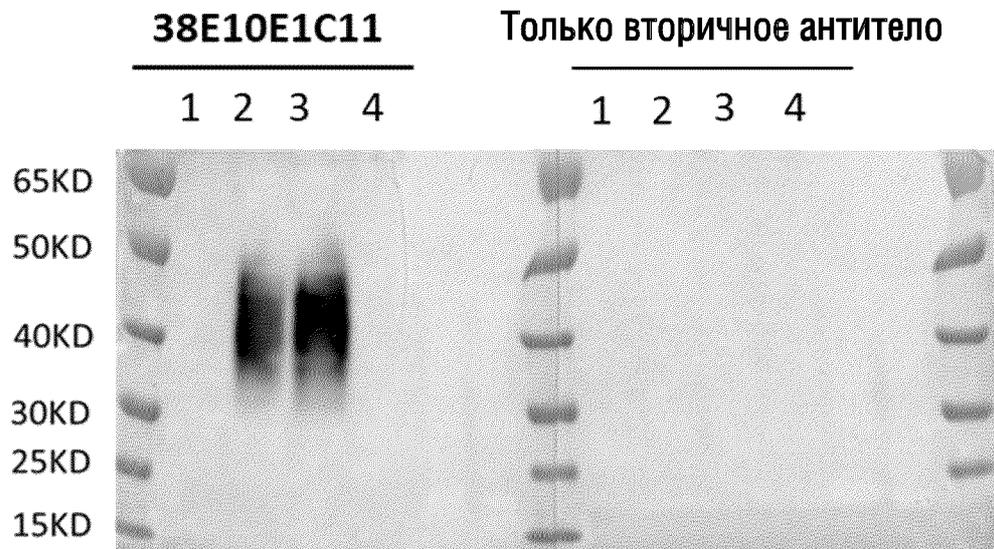
## ФИГ.15

	KP4											
LIF (50 нг/мл)	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Ат против LIF (мкг/мл)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	5D8		38E1E1C11R		5D8		38E1E1C11R					
	10	5	10	5	10	5	2.5	10	5	2.5		



## ФИГ.16

А



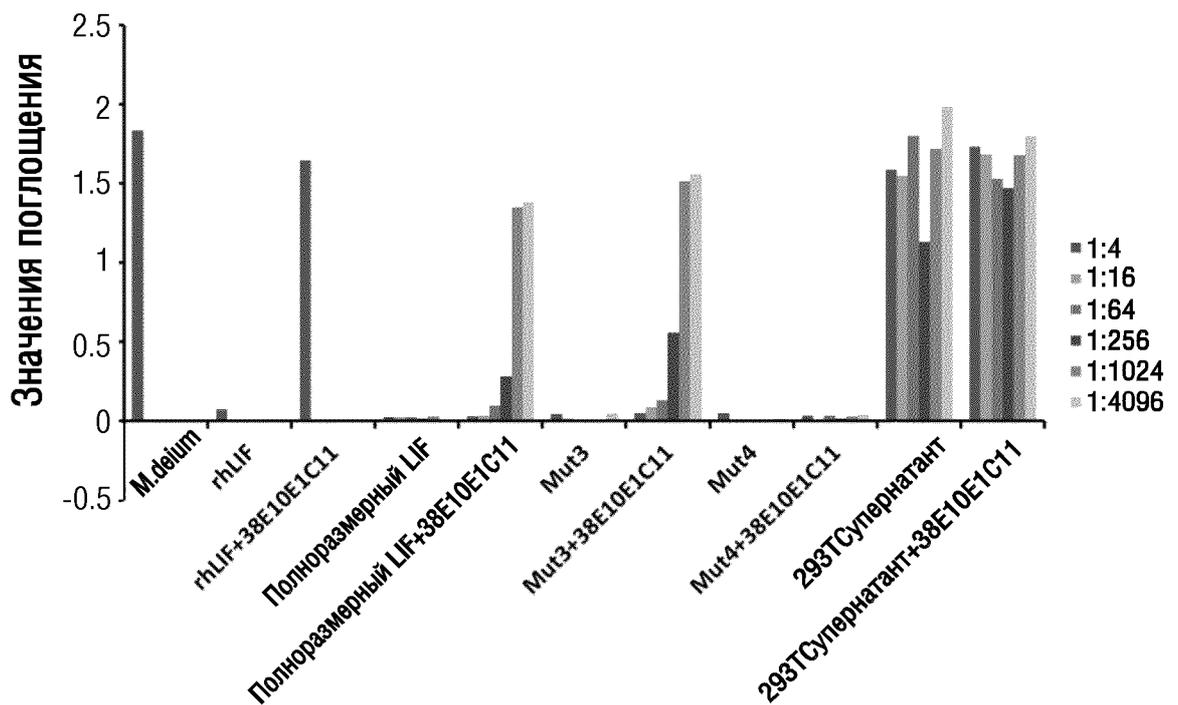
Дорожка 1: Отрицательный контроль

Дорожка 2: Полноразмерный белок LIF

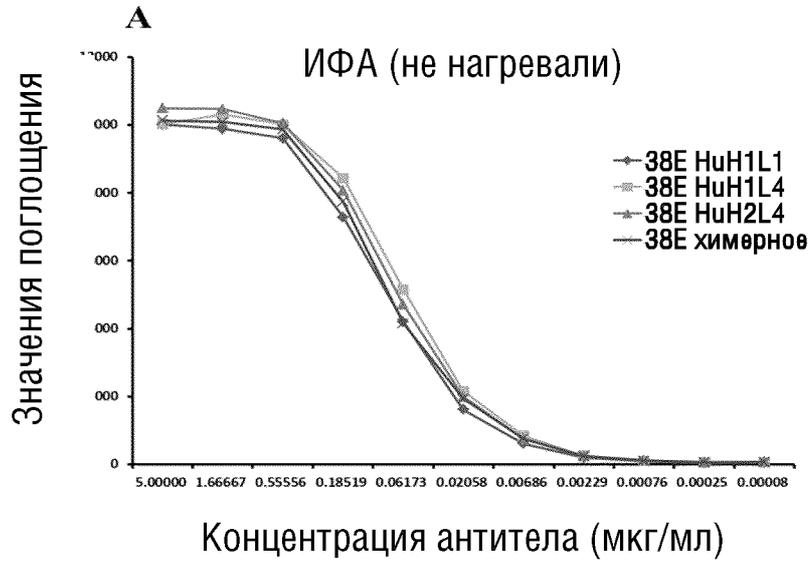
Дорожка 3: белок Mut3

Дорожка 4: белок Mut4

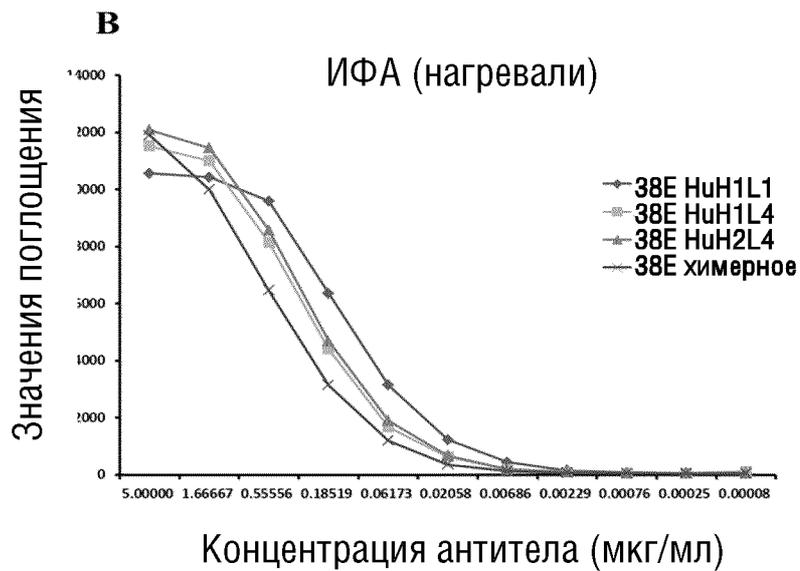
В



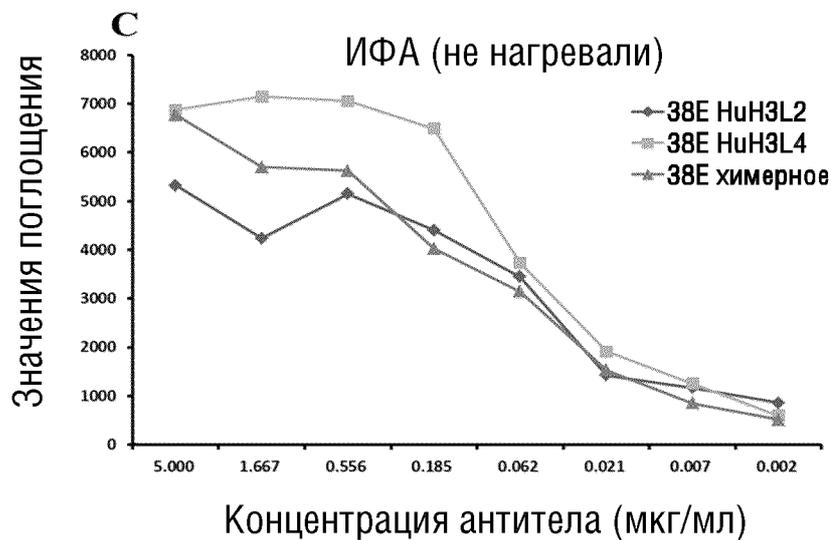
ФИГ.17А



ФИГ.17В

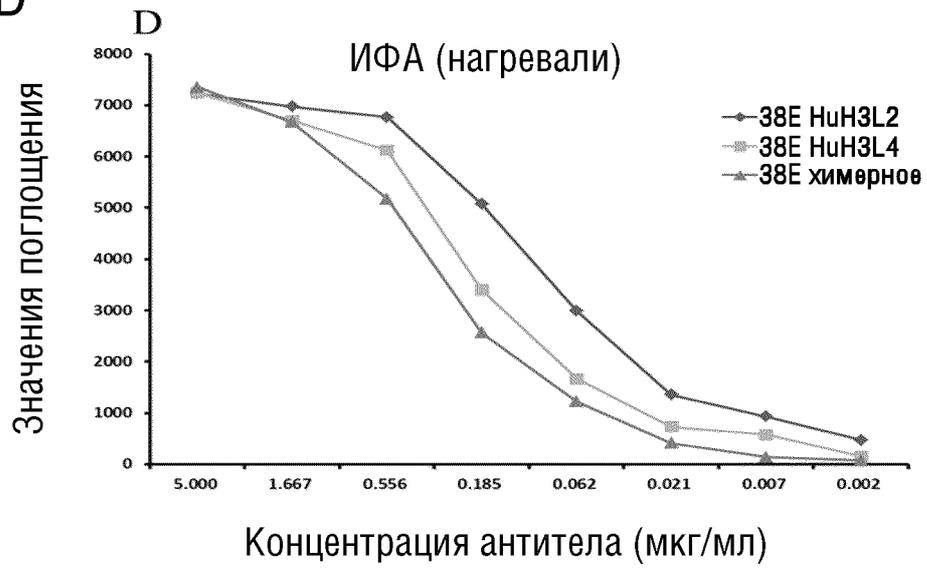


ФИГ.17С

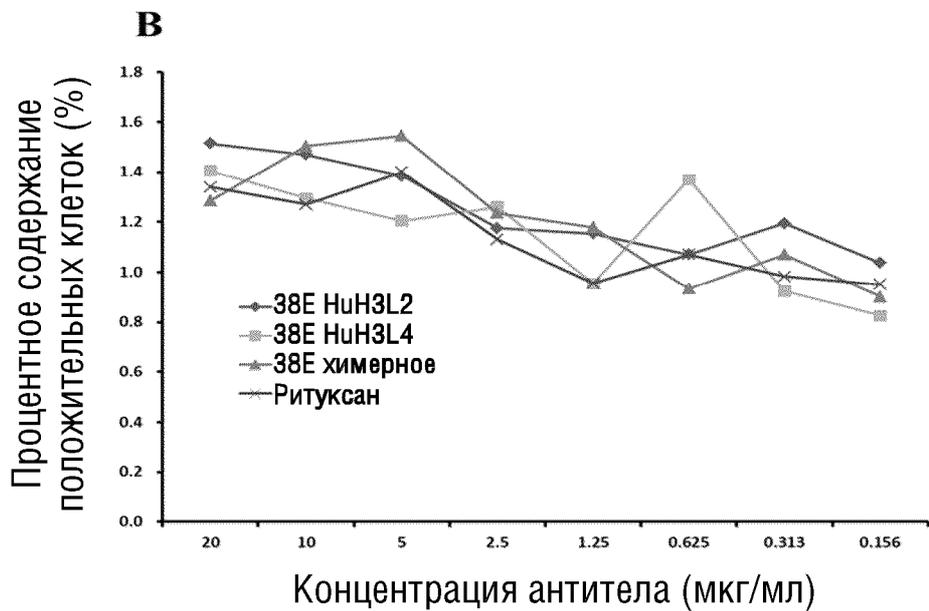
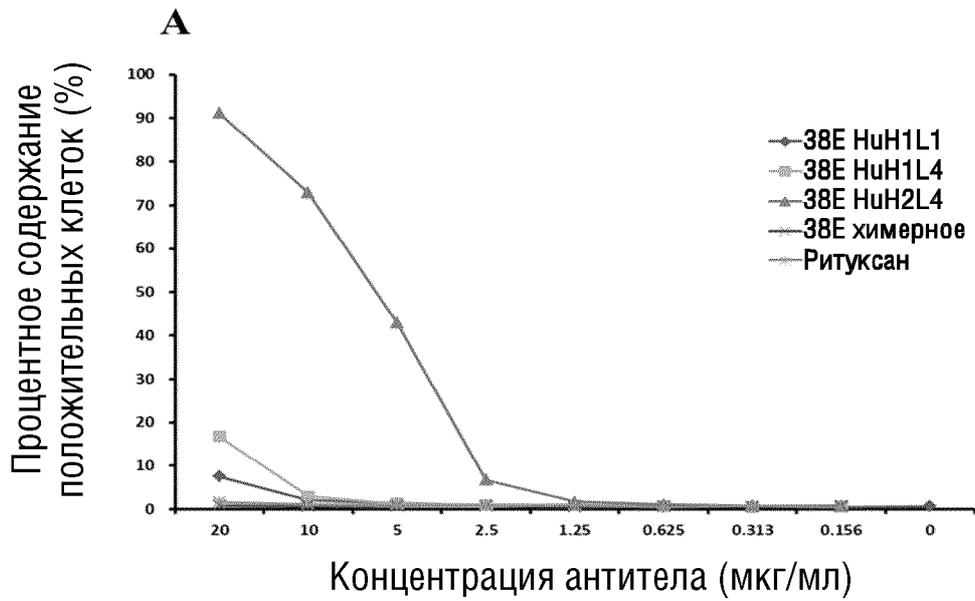


ФИГ.17D

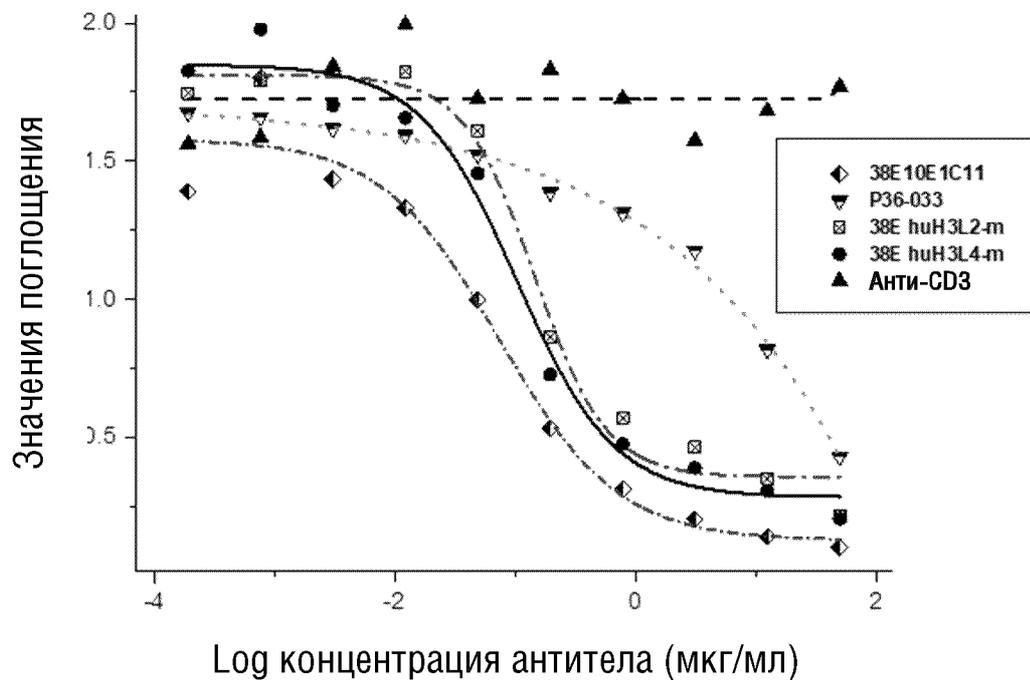
10/15



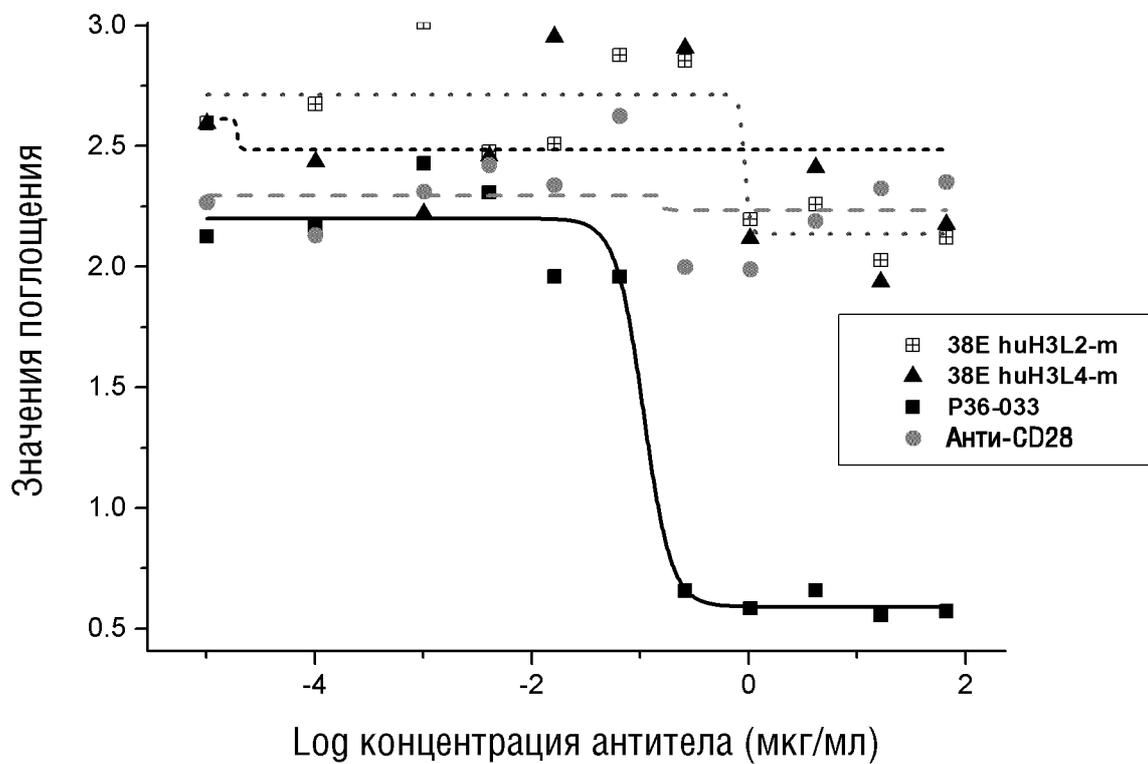
ФИГ.18



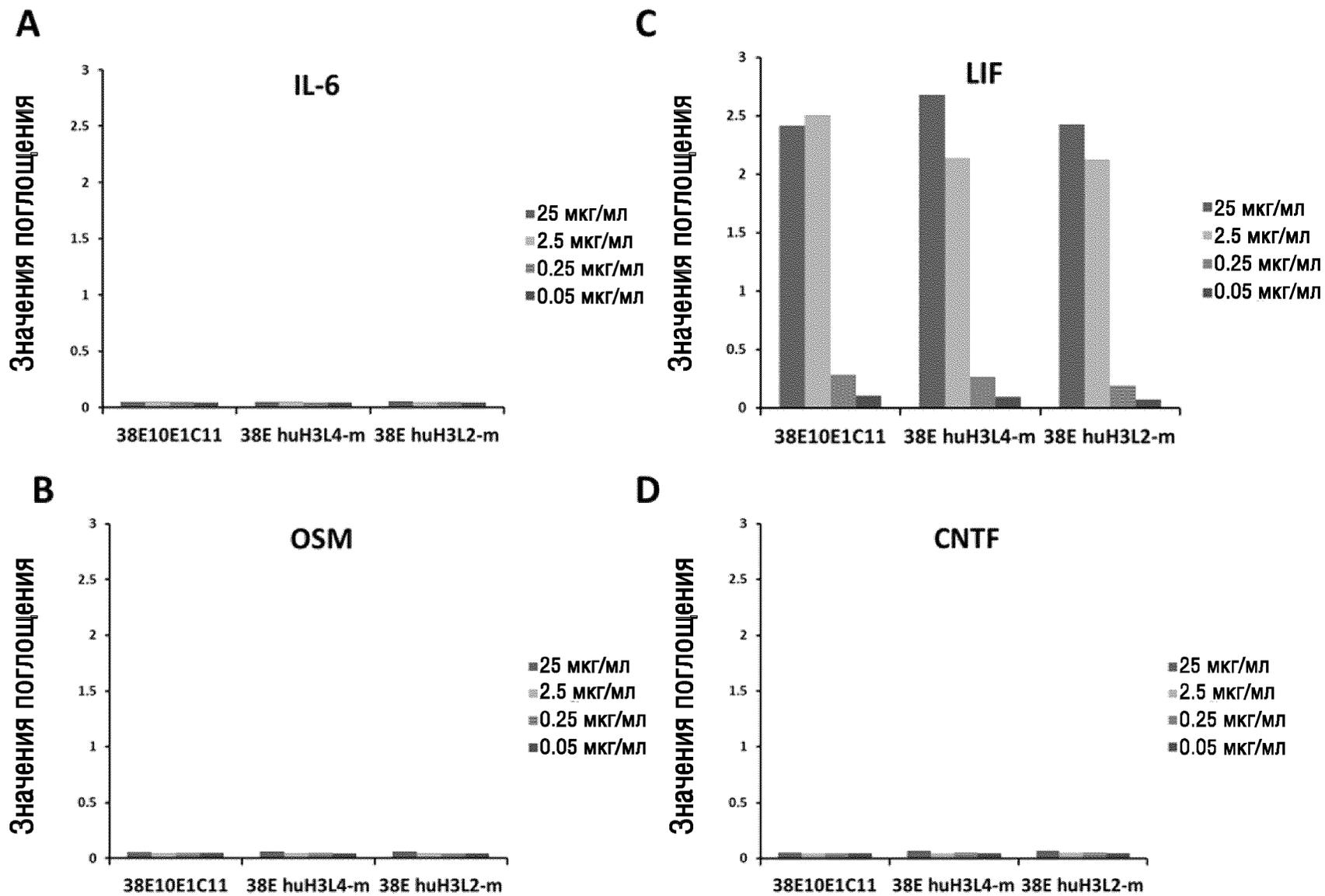
ФИГ.19



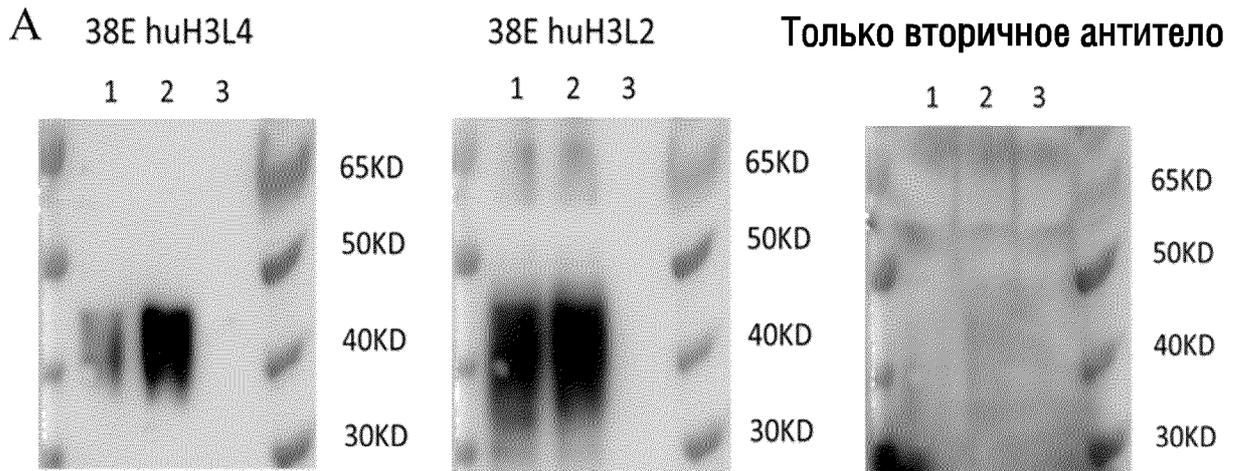
ФИГ.20



ФИГ.21



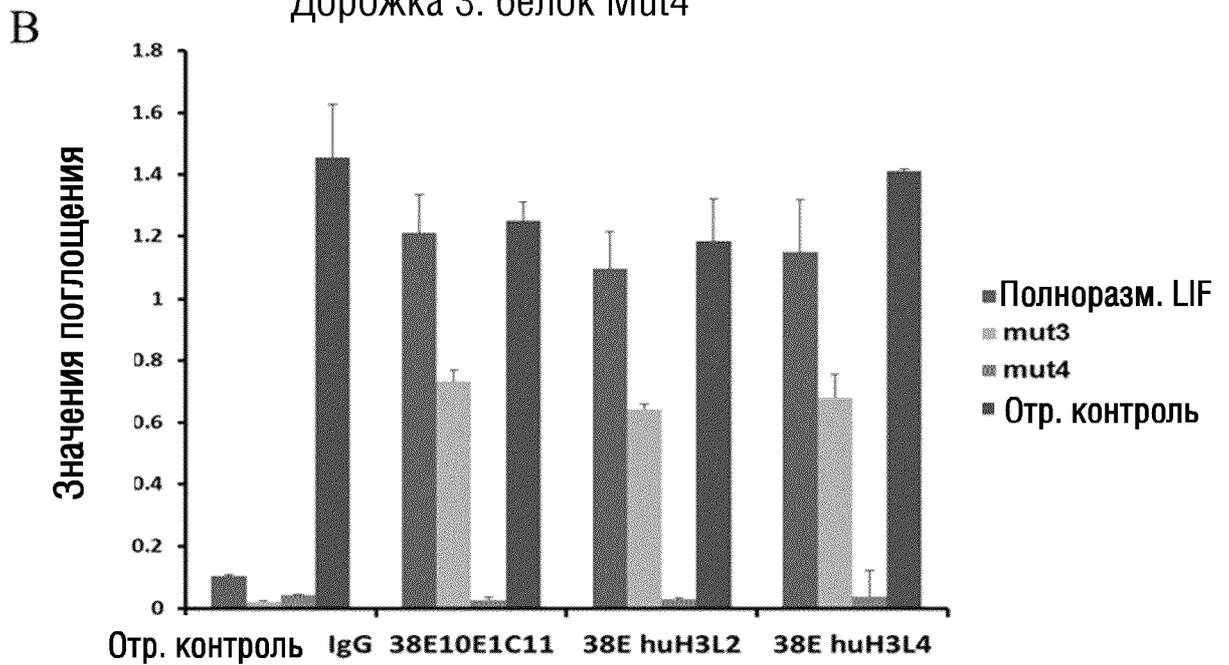
## ФИГ.22



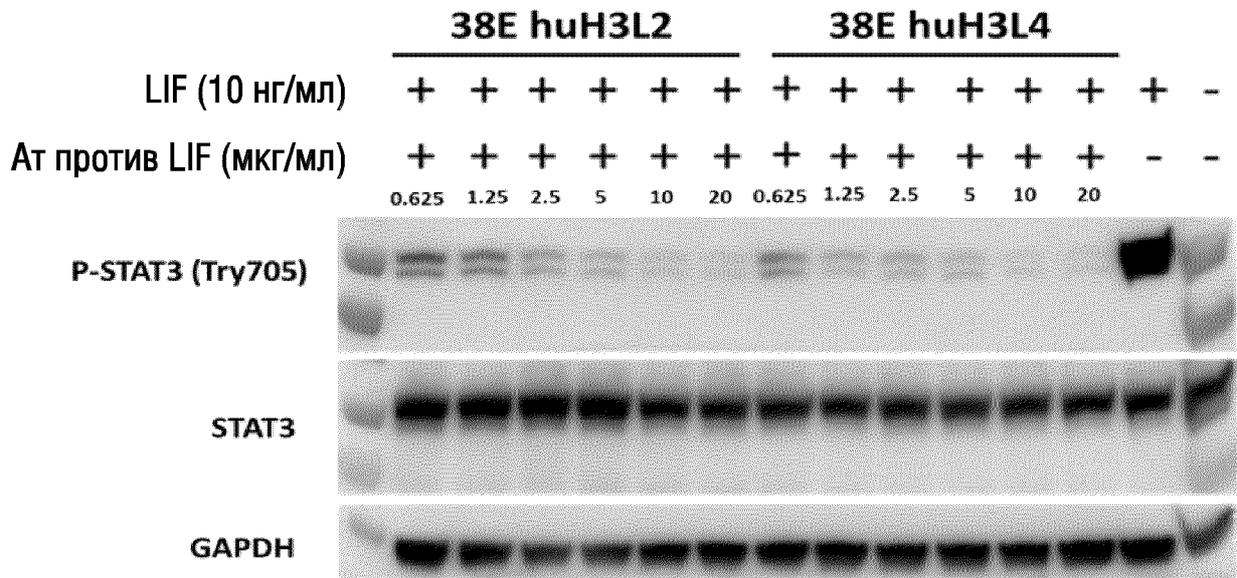
Дорожка 1: Полноразмерный белок LIF

Дорожка 2: белок Mut3

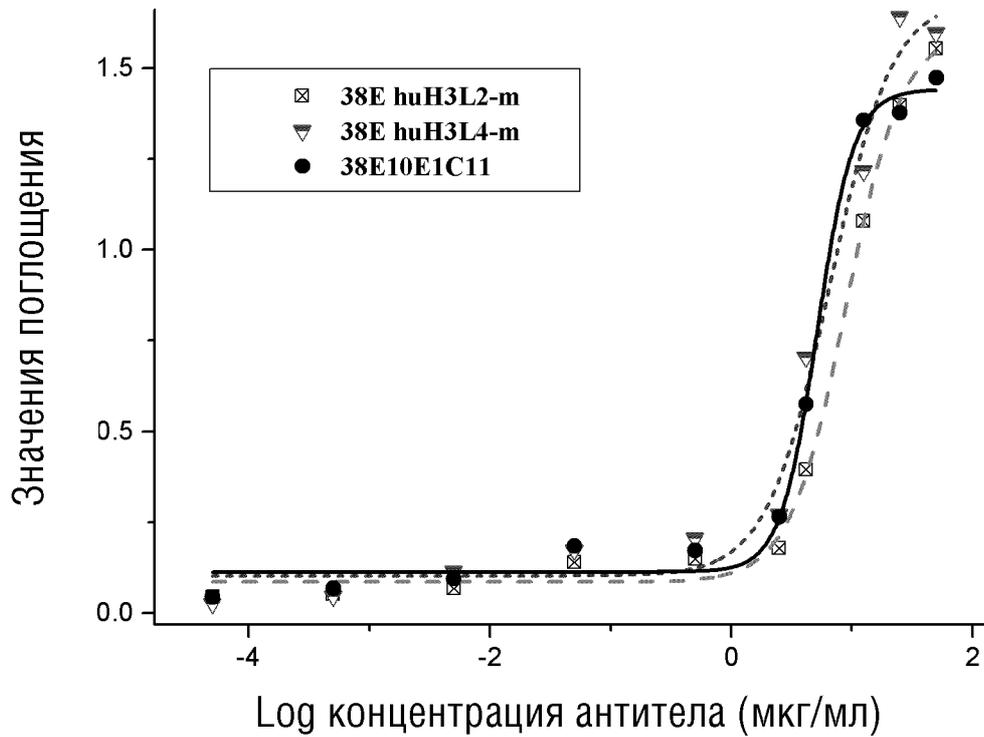
Дорожка 3: белок Mut4



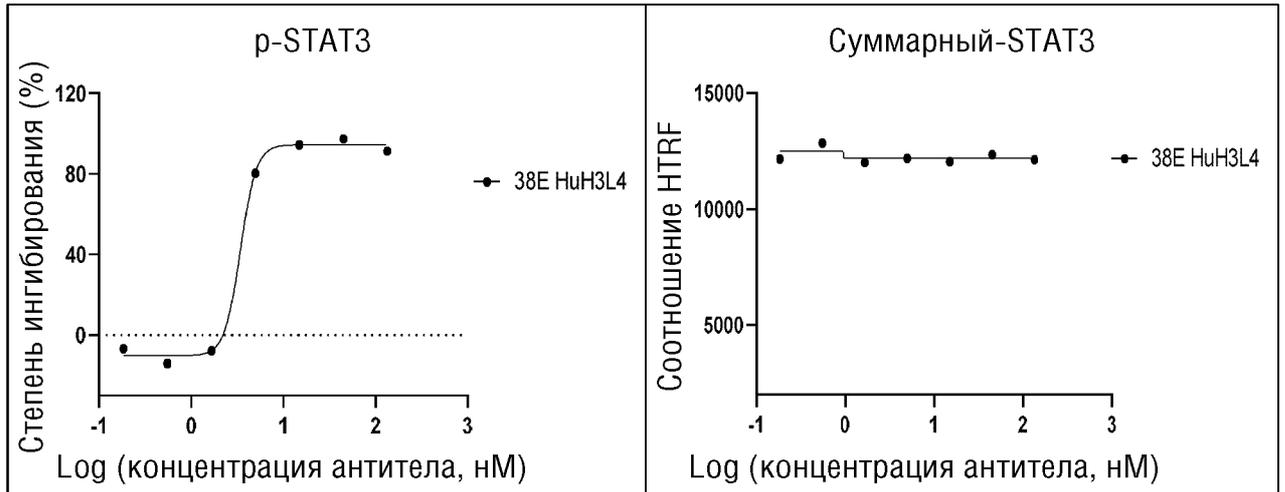
ФИГ.23



ФИГ.24



ФИГ.25



ФИГ.26

