

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044934**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.10.12

(21) Номер заявки
202092632

(22) Дата подачи заявки
2019.05.13

(51) Int. Cl. **C07K 16/24** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) **АНТИТЕЛА К LIF И ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ФОРМЫ НА ИХ ОСНОВЕ**

(31) **18382327.7; 18382359.0; 19382208.7;
19382331.7**

(32) **2018.05.14; 2018.05.25; 2019.03.26;
2019.05.03**

(33) **EP**

(43) **2021.04.12**

(86) **PCT/IB2019/000541**

(87) **WO 2019/220204 2019.11.21**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**МЕДИММУН ЛИМИТЕД
(GB); ФУНДАСИО ПРИВАДА
ИНСТИТУТ Д'ИНВЕСТИГАСИО
ОНКОЛЬОХИКА ДЕ ВАЛЬ
ЭБРОН; ФУНДАСИО ПРИВАДА
ИНСТИТУСИО КАТАЛАНА ДЕ
РЕСЕРКА И ЭСТУДИС АВАНКАТС
(ES)**

(72) Изобретатель:
**Сеоане Суарез Жоан, Анидо
Фолгуэйра Джудит (ES)**

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

(56) **JEANNE MAGRAM ET AL.:** "LIF as a novel cancer immunotherapy target: modulating the tumor microenvironment with MSC-1, a humanized anti-LIF monoclonal antibody", INTERNET CITATION, 29 October 2017 (2017-10-29), XP002785420, Retrieved from the Internet: URL:<http://northernbiologics.com/wp-content/uploads/2017/10/AACR-Molecular-targets-2017-poster.pdf> [retrieved on 1077], abstract
DATABASE EMBASE [Online], ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL; 18 April 2018 (2018-04-18), SINCLAIR A. ET AL.: "MSC-1 is a first-in-class humanized monoclonal antibody that modulates the tumor microenvironment by inhibiting a novel cancer immunotherapy target, LIF", XP002795312, Database accession no. EMB-623505072, abstract & **SINCLAIR A. ET AL.:** "MSC-1 is a first-in-class humanized monoclonal antibody that modulates the tumor microenvironment by inhibiting a novel cancer immunotherapy target, LIF", CANCER RESEARCH 20180701 AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH INC. NLD, vol. 78, no. 13, Supplement 1, 1 July 2018 (2018-07-01), ISSN: 1538-7445

DATABASE EMBASE [Online], ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL; 1 May 2018 (2018-05-01), HYMAN D. M. ET AL.: "A phase 1 study of MSC-1, a humanized anti-LIF monoclonal antibody, in patients with advanced solid tumors", XP002795313, Database accession no. EMB-625977303, abstract & **HYMAN D. M. ET AL.:** "A phase 1 study of MSC-1, a humanized anti-LIF monoclonal antibody, in patients with advanced solid tumors", JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY 20180501 AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY NLD, vol. 36, no. 15, Supplement 1, 1 May 2018 (2018-05-01), ISSN: 1527-7755

WO-A1-2017089614

WO-A1-2016040657

WO-A1-2018115960

(57) В изобретении описаны антитела, нацеленные на лейкоз-ингибирующий фактор (LIF). В данном изобретении также описаны варианты применения этих антител для лечения рака и эффективные дозы этих антител.

B1**044934****044934 B1**

Перекрестная ссылка

Настоящая заявка испрашивает приоритет и преимущество по европейской заявке № 18382327.7, поданной 14 мая 2018 г.; европейской заявке № 18382359.0, поданной 25 мая 2018 г.; европейской заявке № 19382208.7, поданной 26 марта 2019 г.; европейской заявке № 19382331.7, поданной 3 мая 2019 г., каждая из которых включена во всей своей полноте.

Предпосылки изобретения

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

Краткое описание настоящего изобретения

В данном документе описаны антитела к LIF, которые оказывают антагонистическое действие на активность LIF или блокируют его. Описанные в данном документе антитела к LIF являются применимыми для лечения рака. В частности, определенные антитела к LIF при введении в терапевтически эффективной дозе обладали превосходной и неожиданной эффективностью в отношении уменьшения объемов опухоли как в моделях рака на мышах, так и в моделях рака на приматах, отличных от человека. Таким образом, настоящим изобретением предусмотрены способы и фармацевтические композиции для лечения рака с применением специфических антител к LIF в определенных дозировках (как при использовании доз, рассчитанных на вес, так и при использовании фиксированных доз).

В другом аспекте в данном документе описан способ лечения индивидуума, страдающего от рака, включающий введение индивидууму рекомбинантного антитела, которое специфически связывает лейкоз-ингибирующий фактор (LIF), содержащего: (а) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 1-3; (b) определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 4 или 5; (c) определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 6-8; (d) определяющую комплементарность область 1 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 9 или 10; (e) определяющую комплементарность область 2 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 11 или 12; и (5) определяющую комплементарность область 3 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13; при этом рекомбинантное антитело вводят индивидууму в дозе от приблизительно 75 до приблизительно 2000 миллиграммов. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело связывается с гликозилированным LIF. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело содержит по меньшей мере одну каркасную область, полученную из каркасной области человеческого антитела. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело является гуманизированным. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело является деиммунизированным. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело содержит две тяжелые цепи иммуноглобулина и две легкие цепи иммуноглобулина. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело представляет собой антитело IgG. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело представляет собой Fab, F(ab)₂, однодоменное антитело, однопочечный варибельный фрагмент (scFv) или наноантитело. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело специфически связывается с LIF с константой диссоциации (K_D), составляющей менее приблизительно 200 пикомоль/л. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело специфически связывается с LIF с константой диссоциации (K_D), составляющей менее приблизительно 100 пикомоль/л. В определенных вариантах осуществления VH-CDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 1 (GFTFSHAWMH), VH-CDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4 (QIKAKSDDYATYYAESVKG), VH-CDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 6 (TCWEWDLDF), VL-CDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 9 (RSSQSLLDSGDGHTYLN), VL-CDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 11 (SVSNLES) и VL-CDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13 (MQATHAPRYT). В определенных вариантах осуществления VH-CDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 2 (GFTFSHAW), VH-CDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 5 (IKAKSDDYAT), VH-CDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 6 (TCWEWDLDF), VL-CDR1 содержит аминокис-

головы и шеи, рак печени, рак почки, рак пищевода, рак яичника, рак толстой кишки, рак легкого, лимфому или рак мягких тканей. В определенных вариантах осуществления рак включает немелкоклеточный рак легкого, эпителиальную карциному яичника или аденокарциному поджелудочной железы. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят в качестве компонента фармацевтического состава, при этом фармацевтический состав содержит рекомбинантное антитело и дополнительно содержит фармацевтически приемлемое фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, носитель или разбавитель. В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав характеризуется значением pH приблизительно 6,0. В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав содержит приблизительно 25 мМ гистидина, приблизительно 6% сахарозы и приблизительно 0,01% полисорбата 80, при этом рекомбинантное антитело включено в концентрации приблизительно 20 мг/мл. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят внутривенно. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят один раз в неделю. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят приблизительно один раз в две недели. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят приблизительно один раз в три недели. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят приблизительно один раз в четыре недели. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят в дозе приблизительно 75 мг. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят в дозе приблизительно 225 мг. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят в дозе приблизительно 750 мг. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят в дозе приблизительно 1125 мг. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят в дозе приблизительно 1500 мг. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят в дозе приблизительно 2000 мг.

В другом аспекте в данном документе описан способ лечения индивидуума, страдающего от рака, включающий введение индивидууму рекомбинантного антитела, которое специфически связывает лейкоз-ингибирующий фактор (LIF), содержащего: (а) последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 41, 42, 44 или 66; и (б) последовательность вариабельной области легкой цепи (VL) иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 45-48; при этом рекомбинантное антитело вводят индивидууму в дозе от приблизительно 75 до приблизительно 2000 мг. В определенных вариантах осуществления последовательность VH на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 42; и последовательность VL на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46. В определенных вариантах осуществления последовательность VH идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 42; и последовательность VL идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело содержит две тяжелые цепи иммуноглобулина и две легкие цепи иммуноглобулина. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело представляет собой антитело IgG. В определенных вариантах осуществления рак включает распространенную солидную опухоль, глиобластому, рак желудка, рак кожи, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичка, рак щитовидной железы, рак головы и шеи, рак печени, рак почки, рак пищевода, рак яичника, рак толстой кишки, рак легкого, лимфому или рак мягких тканей. В определенных вариантах осуществления рак включает немелкоклеточный рак легкого, эпителиальную карциному яичника или аденокарциному поджелудочной железы. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят в качестве компонента фармацевтического состава, при этом фармацевтический состав содержит рекомбинантное антитело и дополнительно содержит фармацевтически приемлемое фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, носитель или разбавитель. В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав характеризуется значением pH приблизительно 6,0. В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав содержит приблизительно 25 мМ гистидина, приблизительно 6% сахарозы и приблизительно 0,01% полисорбата 80, при этом рекомбинантное антитело включено в концентрации приблизительно 20 мг/мл. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят внутривенно. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят приблизительно один раз в неделю. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят приблизительно один раз в две недели. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят приблизительно один раз в три недели. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят приблизительно один раз в четыре недели. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят в дозе приблизительно 75 мг. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят в дозе приблизительно 225 мг. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят в дозе приблизительно 750 мг. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят в дозе приблизительно 1125 мг. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят в дозе приблизительно 1500 мг. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят в дозе приблизительно 2000 мг.

тах осуществления рекомбинантное антитело вводят в дозе приблизительно 1125 мг. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят в дозе приблизительно 1500 мг. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят в дозе приблизительно 2000 мг.

В другом аспекте в данном документе описан способ лечения индивидуума, страдающего от рака, включающий введение индивидууму рекомбинантного антитела, которое специфически связывает лейкоингибирующий фактор (LIF), содержащего: (а) последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 57-60 или 67; и (b) последовательность легкой цепи иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 61-64; при этом рекомбинантное антитело вводят индивидууму в дозе от приблизительно 75 до приблизительно 2000 мг. В определенных вариантах осуществления последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 58; и последовательность легкой цепи иммуноглобулина на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 62. В определенных вариантах осуществления последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 58; и последовательность легкой цепи иммуноглобулина идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 62. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело содержит две тяжелые цепи иммуноглобулина и две легкие цепи иммуноглобулина. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело представляет собой антитело IgG. В определенных вариантах осуществления рак включает распространенную солидную опухоль, глиобластому, рак желудка, рак кожи, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичка, рак щитовидной железы, рак головы и шеи, рак печени, рак почки, рак пищевода, рак яичника, рак толстой кишки, рак легкого, лимфому или рак мягких тканей. В определенных вариантах осуществления рак включает немелкоклеточный рак легкого, эпителиальную карциному яичника или аденокарциному поджелудочной железы. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят в качестве компонента фармацевтического состава, при этом фармацевтический состав содержит рекомбинантное антитело и дополнительно содержит фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, носитель или разбавитель. В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав характеризуется значением pH приблизительно 6,0. В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав содержит приблизительно 25 мМ гистидина, приблизительно 6% сахарозы и приблизительно 0,01% полисорбата 80, при этом рекомбинантное антитело включено в концентрации приблизительно 20 мг/мл. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят внутривенно. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят приблизительно один раз в неделю. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят приблизительно один раз в две недели. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят приблизительно один раз в три недели. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят приблизительно один раз в четыре недели. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят в дозе приблизительно 75 мг. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят в дозе приблизительно 225 мг. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят в дозе приблизительно 750 мг. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят в дозе приблизительно 1125 мг. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят в дозе приблизительно 1500 мг. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят в дозе приблизительно 2000 мг.

В другом аспекте в данном документе описан фармацевтический состав для применения в лечении рака у индивидуума, где фармацевтический состав содержит фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, носитель или разбавитель и рекомбинантное антитело, где рекомбинантное антитело специфически связывается с лейкоингибирующим фактором (LIF) и содержит: (а) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 1-3; (b) определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 4 или 5; (c) определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 6-8; (d) определяющую комплементарность область 1 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 9 или 10; (e) определяющую комплементарность область 2 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 11 или 12; и (f) определяющую комплементарность область 3 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под

SEQ ID NO: 13; при этом рекомбинантное антитело вводят индивидууму в дозе от приблизительно 75 до приблизительно 2000 мг. В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав содержит приблизительно 25 mM гистидина, приблизительно 6% сахарозы и приблизительно 0,01% полисорбата 80, при этом рекомбинантное антитело включено в концентрации приблизительно 20 мг/мл. В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав характеризуется значением pH приблизительно 6,0. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело связывается с гликозилированным LIF. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело содержит по меньшей мере одну каркасную область, полученную из каркасной области человеческого антитела. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело является гуманизированным. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело является деиммунизированным. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело содержит две тяжелые цепи иммуноглобулина и две легкие цепи иммуноглобулина. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело представляет собой IgG. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело представляет собой Fab, F(ab)₂, одномономерное антитело, одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv) или наноантитело. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело специфически связывается с LIF с константой диссоциации (K_D), составляющей менее приблизительно 200 пикомоль/л. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело специфически связывается с LIF с константой диссоциации (K_D), составляющей менее приблизительно 100 пикомоль/л. В определенных вариантах осуществления VH-CDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 1 (GFTFSHAWMH), VH-CDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4 (QIKAKSDDYATYYAESVKG), VH-CDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 6 (TCWEWDLDF), VL-CDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 9 (RSSQSLDSDGHTYLN), VL-CDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 11 (SVSNLES) и VL-CDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13 (MQATHAPPYT). В определенных вариантах осуществления VH-CDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 2 (GFTFSHAW), VH-CDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 5 (IKAKSDDYAT), VH-CDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 6 (TCWEWDLDF), VL-CDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 10 (QSLDSDGHTYLN), VL-CDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 12 (SVS) и VL-CDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13 (MQATHAPPYT). В определенных вариантах осуществления VH-CDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3 (HAWMH), VH-CDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4 (QIKAKSDDYATYYAESVKG), VH-CDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 7 (WEWDLDF), VL-CDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 9 (RSSQSLDSDGHTYLN), VL-CDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 11 (SVSNLES) и VL-CDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13 (MQATHAPPYT). В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело содержит одну или несколько аминокислотных последовательностей каркасной области 1 тяжелой цепи (VH-FR1), которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 14-17, аминокислотную последовательность каркасной области 2 тяжелой цепи (VH-FR2), которая по меньшей мере на приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 18 или 19, аминокислотную последовательность каркасной области 3 тяжелой цепи (VH-FR3), которая по меньшей мере на приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 20-22, и аминокислотную последовательность каркасной области 4 тяжелой цепи (VH-FR4), которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 23-25. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело содержит одну или несколько аминокислотных последовательностей каркасной области 1 тяжелой цепи (VH-FR1), которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 14-17, аминокислотную последовательность каркасной области 2 тяжелой цепи (VH-FR2), которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 18 или 19, аминокислотную последовательность каркасной области 3 тяжелой цепи (VH-FR3), которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 20-22, и аминокислотную последовательность каркасной области 4 тяжелой цепи (VH-FR4), которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 23-25. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело содержит одну или несколько аминокислотных последовательностей каркасной области 1 легкой цепи (VL-FR1), которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% иден-

тична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 26-29, аминокислотную последовательность каркасной области 2 легкой цепи (VL-FR2), которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 30-33, аминокислотную последовательность каркасной области 3 легкой цепи (VL-FR3), которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 34-37, и аминокислотную последовательность каркасной области 4 легкой цепи (VL-FR4), которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 38-40. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело содержит одну или несколько аминокислотных последовательностей каркасной области 1 легкой цепи (VL-FR1), которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 26-29, аминокислотную последовательность каркасной области 2 легкой цепи (VL-FR2), которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 30-33, аминокислотную последовательность каркасной области 3 легкой цепи (VL-FR3), которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 34-37, и аминокислотную последовательность каркасной области 4 легкой цепи (VL-FR4), которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 38-40. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело связывается по меньшей мере с одним из следующих остатков: A13, I14, R15, H16, P17, C18, H19, N20, Q25, Q29, Q32, D120, R123, S127, N128, L130, C131, C134, S135 или H138 из SEQ ID NO: 68. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело связывается по меньшей мере с пятью из следующих остатков: A13, I14, R15, H16, P17, C18, H19, N20, Q25, Q29, Q32, D120, R123, S127, N128, L130, C131, C134, S135 или H138 из SEQ ID NO: 68. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело связывается с по меньшей мере десятью из следующих остатков: A13, I14, R15, H16, P17, C18, H19, N20, Q25, Q29, Q32, D120, R123, S127, N128, L130, C131, C134, S135 или H138 из SEQ ID NO: 68. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело связывается со всеми из следующих остатков: A13, I14, R15, H16, P17, C18, H19, N20, Q25, Q29, Q32, D120, R123, S127, N128, L130, C131, C134, S135 или H138 из SEQ ID NO: 68. В определенных вариантах осуществления рак включает распространенную солидную опухоль, глиобластому, рак желудка, рак кожи, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичка, рак щитовидной железы, рак головы и шеи, рак печени, рак почки, рак пищевода, рак яичника, рак толстой кишки, рак легкого, лимфому или рак мягких тканей. В определенных вариантах осуществления рак включает немелкоклеточный рак легкого, эпителиальную карциному яичника или аденокарциному поджелудочной железы. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят внутривенно. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят приблизительно один раз в неделю. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят приблизительно один раз в две недели. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят приблизительно один раз в три недели. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят приблизительно один раз в четыре недели. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят в дозе приблизительно 75 мг. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят в дозе приблизительно 225 мг. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят в дозе приблизительно 750 мг. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят в дозе приблизительно 1125 мг. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят в дозе приблизительно 1500 мг. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят в дозе приблизительно 2000 мг. В другом аспекте в данном документе описан фармацевтический состав для применения в лечении рака у индивидуума, при этом фармацевтический состав содержит фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, носитель или разбавитель и рекомбинантное антитело, где рекомбинантное антитело специфически связывается с лейкоз-ингибирующим фактором (LIF) и содержит: (а) последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 41, 42, 44 или 66; и (б) последовательность вариабельной области легкой цепи (VL) иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 45-48; при этом рекомбинантное антитело вводят индивидууму в дозе от приблизительно 75 до приблизительно 2000 мг. В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав содержит приблизительно 25 мМ гистидина, приблизительно 6% сахарозы и приблизительно 0,01% полисорбата 80, при этом рекомбинантное антитело включено в концентрации приблизительно 20 мг/мл. В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав характеризуется значением pH приблизительно 6,0. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело связывается с гликозилированным LIF. В определенных вариантах осуществления последовательность VH по меньшей мере приблизительно на 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представлен-

ной под SEQ ID NO: 42; и последовательность VL по меньшей мере приблизительно на 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46. В определенных вариантах осуществления последовательность VH идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 42; и последовательность VL идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело содержит две тяжелые цепи иммуноглобулина и две легкие цепи иммуноглобулина. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело представляет собой антитело IgG. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело представляет собой Fab, F(ab)₂, однодоменное антитело, одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv) или наноантитело. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело специфически связывается с LIF с константой диссоциации (K_D), составляющей менее приблизительно 200 пикомоль/л. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело специфически связывается с LIF с константой диссоциации (K_D), составляющей менее приблизительно 100 пикомоль/л. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело включает распространенную солидную опухоль, глиобластому, рак желудка, рак кожи, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичка, рак щитовидной железы, рак головы и шеи, рак печени, рак почки, рак пищевода, рак яичника, рак толстой кишки, рак легкого, лимфому или рак мягких тканей. В определенных вариантах осуществления рак включает мелкоклеточный рак легкого, эпителиальную карциному яичника или аденокарциному поджелудочной железы. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят внутривенно. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят приблизительно один раз в неделю. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят приблизительно один раз в две недели. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят приблизительно один раз в три недели. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят приблизительно один раз в четыре недели. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят в дозе приблизительно 75 мг. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят в дозе приблизительно 225 мг. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят в дозе приблизительно 750 мг. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят в дозе приблизительно 1125 мг. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят в дозе приблизительно 1500 мг. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят в дозе приблизительно 2000 мг.

В другом аспекте в данном документе описан фармацевтический состав для применения в лечении рака у индивидуума, где фармацевтический состав содержит фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, носитель или разбавитель и рекомбинантное антитело, где рекомбинантное антитело специфически связывается с лейкоз-ингибирующим фактором (LIF) и содержит: (а) последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 57-60 или 67; и (b) последовательность легкой цепи иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 61-64; при этом рекомбинантное антитело вводят индивидууму в дозе от приблизительно 75 до приблизительно 2000 мг. В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав содержит приблизительно 25 мМ гистидина, приблизительно 6% сахарозы и приблизительно 0,01% полисорбата 80, при этом рекомбинантное антитело включено в концентрации приблизительно 20 мг/мл. В определенных вариантах осуществления фармацевтический состав характеризуется значением pH приблизительно 6,0. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело связывается с гликозилированным LIF. В определенных вариантах осуществления последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина по меньшей мере приблизительно на 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 58; и последовательность легкой цепи иммуноглобулина по меньшей мере приблизительно на 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 62. В определенных вариантах осуществления последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 58; и последовательность легкой цепи иммуноглобулина идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 62. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело содержит две тяжелые цепи иммуноглобулина и две легкие цепи иммуноглобулина. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело специфически связывается с LIF с константой диссоциации (K_D), составляющей менее приблизительно 200 пикомоль/л. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело специфически связывается с LIF с константой диссоциации (K_D), составляющей менее приблизительно 100 пикомоль/л. В определенных вариантах осуществления рак включает распространенную солидную опухоль, глиобластому, рак желудка, рак кожи, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичка, рак щитовидной железы, рак головы и шеи, рак печени, рак почки, рак пищевода, рак яичника, рак толстой кишки, рак легкого, лимфому или рак мягких тканей. В определенных вариантах

осуществления рак включает немелкоклеточный рак легкого, эпителиальную карциному яичника или аденокарциному поджелудочной железы. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят внутривенно. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят приблизительно один раз в неделю. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят приблизительно один раз в две недели. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят приблизительно один раз в три недели. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят приблизительно один раз в четыре недели. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят в дозе приблизительно 75 мг. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят в дозе приблизительно 225 мг. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят в дозе приблизительно 750 мг. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят в дозе приблизительно 1125 мг. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят в дозе приблизительно 1500 мг. В определенных вариантах осуществления рекомбинантное антитело вводят в дозе приблизительно 2000 мг.

Краткое описание графических материалов

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

На фиг. 2А и 2В представлены результаты вестерн-блоттинга, демонстрирующие ингибирование LIF-индуцированного фосфорилирования STAT3 гуманизированным и исходным антителом 5D8.

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

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

На фиг. 4 представлены результаты вестерн-блоттинга, демонстрирующие ингибирование LIF-индуцированного фосфорилирования STAT3 различными моноклональными антителами, описанных в данном документе.

На фиг. 5 представлены результаты иммуногистохимического окрашивания и количественной оценки экспрессии LIF в опухолях при мультиформной глиобластоме (GBM), NSCLC (немелкоклеточной карциноме легкого), раке яичника и колоректальном раке от пациентов-людей. Горизонтальные черты представляют среднее значение \pm SEM.

На фиг. 6 представлен график, показывающий результаты эксперимента, проведенного на мышинной модели немелкоклеточного рака легкого с применением гуманизированного антитела 5D8.

На фиг. 7А показан эффект r5D8 в отношении ингибирования клеток U251 в ортотопической мышинной модели GBM. Результаты количественной оценки показаны для дня 26.

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

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

На фиг. 8В показаны значения измерения отдельных опухолей в день 25.

На фиг. 8С демонстрируется, что h5D8 показывает значительное уменьшение роста опухоли при введении в дозе 200 мкг/мышь два раза в неделю ($p<0,05$). Символы представляют собой среднее значение \pm SEM, статистическая значимость сравнивается со средой-носителем (посредством непарного непараметрического U-критерия Манна-Уитни).

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

На фиг. 9В показаны значения измерения отдельных опухолей в день 17.

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

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

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

На фиг. 10D показано уменьшение инфильтрации макрофагами участков локализации опухоли в сингенной мышинной модели колоректального рака с репрезентативным изображением и количественным

определением клеток CCL22+.

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

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

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

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

График показывает отдельные значения измерения опухолей в день 13, выраженные в виде среднего объема опухоли + SEM. Статистические различия между группами определяли с использованием непарного непараметрического U-критерия Манна-Уитни.

R5D8 ингибировало рост опухолей CT26 (*p<0,05). Ингибирование роста опухоли за счет r5D8 было значительно снижено в присутствии истощающих антител к CD4 и CD8 (****p<0,0001).

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

На фиг. 13В продемонстрированы подробные взаимодействия между LIF и h5D8 и показаны остатки, образующие солевые мостики, и остатки h5D8 со скрытой площадью поверхности более 100 Å².

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

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

На фиг. 15А посредством ELISA продемонстрировано связывание мутантов h5D8 C100 с человеческим LIF.

На фиг. 15В посредством ELISA продемонстрировано связывание мутантов h5D8 C100 с LIF мыши.

На фиг. 16А посредством Octet продемонстрировано, что h5D8 не блокирует связывание между LIF и LIFR. Последовательное связывание h5D8 с LIF с последующим связыванием с LIFR.

На фиг. 16В и 16С продемонстрирован ELISA-анализ связывания комплексов LIF/mAb с иммобилизованным LIFR или gp130. Сигналы видоспецифических конъюгированных с пероксидазой антител к IgG (к человеческому для (-) и h5D8, к крысиному для r5D8 и B09), обеспечивающих обнаружение антительной части комплексов mAb/LIF, связавшихся с LIFR (фиг. 16В) или gp130 (фиг. 16С), иммобилизованными на планшетах.

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

На фиг. 18А-С показаны изображения пациента на цикле 7 ("C7") лечения с помощью h5D8 (750 мг) в трех целевых очагах - 2 очагах в прямых мышцах и 1 очаге в дугласовом пространстве, а также порты предыдущей лучевой терапии. На фиг. 18А показана прямая мышца № 1 - на левой панели показан целевой очаг (1), а на правой панели показан очаг, подвергнутый облучению методом XRT (2), размер: 37,8 мм. На фиг. 18В показана прямая мышца № 2 - на левой панели показан целевой очаг (3), а на правой панели показан очаг, подвергнутый облучению методом XRT (4), размер: 24,3 мм. На фиг. 18С показано дугласово пространство - на левой панели показан целевой очаг (5), а на правой панели показан очаг, подвергнутый облучению методом XRT (6), размер: 25 мм.

На фиг. 19 показана стабилизация уровня LIF в насыщенном состоянии относительно времени приема 1-й дозы для субъекта 0210-003.

На фиг. 20А-С показано свидетельство модуляции биомаркеров, которые являются индикаторами потенциального механизма действия ингибирования LIF, в биоптате опухоли, полученном от 0201-003. Данные демонстрируют результаты до лечения с помощью h5D8 по сравнению с результатами в процессе лечения с помощью h5D8. На фиг. 20А показан противоопухолевый иммунитет в виде процентного (%) изменения частоты встречаемости CD68; % изменения частоты встречаемости CD8 и % изменения частоты встречаемости Foxp3. На фиг. 20В показана характеристика фенотипа макрофагов в виде % изменения частоты встречаемости CD163; % изменения частоты встречаемости CD206; и % изменения частоты встречаемости MHCII. На фиг. 20С показано влияние лечения с помощью h5D8 на pSTAT3 в виде % изменения количества ядер, окрашенных по pSTAT3+.

На фиг. 21А-С показано свидетельство модуляции биомаркеров, которые являются индикаторами потенциального механизма действия ингибирования LIF, в биоптате опухоли, полученном от субъекта 0301-003. Данные демонстрируют результаты до лечения с помощью h5D8 по сравнению с результатами в процессе лечения с помощью h5D8. На фиг. 21А показан противоопухолевый иммунитет в виде процентного (%) изменения частоты встречаемости CD68; % изменения частоты встречаемости CD8 и %

изменения частоты встречаемости Foxp3. На фиг. 21B показана характеристика фенотипа макрофагов в виде % изменения частоты встречаемости CD163; % изменения частоты встречаемости CD205; и % изменения частоты встречаемости MHCII. На фиг. 21C показаны влияния обработки с использованием h5D8 на pSTAT3 в виде % изменения количества ядер, окрашенных по pSTAT3+.

На фиг. 22 показано свидетельство модуляции биомаркеров, которые являются индикаторами потенциального механизма действия ингибирования LIF, в биоптате опухоли, полученном от субъекта 0301-004. Данные демонстрируют результаты до обработки с использованием h5D8 по сравнению с результатами в процессе обработки с использованием h5D8. На фиг. 22 показан противоопухолевый иммунитет в виде процента (%) изменения частоты встречаемости CD68; % изменения частоты встречаемости CD8 и % изменения частоты встречаемости Foxp3.

На фиг. 23 показан паттерн стабилизации уровня LIF относительно времени приема 1-й дозы для субъекта 0201-004.

На фиг. 24 показано свидетельство модуляции биомаркеров, которые являются индикаторами потенциального механизма действия ингибирования LIF, в биоптате опухоли, полученном от субъекта 0201-004. Данные демонстрируют результаты до обработки с использованием h5D8 по сравнению с результатами в процессе обработки с использованием h5D8. На фиг. 24 показана характеристика фенотипа макрофагов в виде % изменения частоты встречаемости CD163; % изменения частоты встречаемости CD205 и % изменения частоты встречаемости MHCII.

На фиг. 25 показана стабилизация уровня LIF в насыщенном состоянии относительно времени приема 1-й дозы для субъекта 0301-002.

На фиг. 26 показано воздействие h5D8 на пациентов когорт по дозам 1-5.

Показано среднее геометрическое значение уровней h5D8 в плазме крови у пациентов относительно начала 1-й инфузии в когортах по дозам 1-5. Указаны дополнительные циклы обработки (мг на прием раз в 3 недели). Количество пациентов, проанализированных в каждой когорте, составляло: когорта 1 n=2, когорта 2 n=1, когорта 3 n=10, когорта 4 n=8 и когорта 5 n=3.

На фиг. 27A и B показана стабилизация уровня LIF у пациентов после лечения с использованием h5D8 в когортах по дозам 1-5 относительно времени первой инфузии. На фиг. 27B показаны общие уровни LIF у пациентов после первых двух циклов h5D8 в когортах по дозам 1-4.

Подробное описание настоящего изобретения

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

В другом аспекте в данном документе описан способ лечения индивидуума, страдающего от рака, включающий введение индивидууму рекомбинантного антитела, которое специфически связывает лейкоз-ингибирующий фактор (LIF), содержащего: (а) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 1-3; (b) определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 4 или 5; (c) определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 6-8; (d) определяющую комплементарность область 1 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 9 или 10; (e) определяющую комплементарность область 2 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 11 или 12; и (5) определяющую комплементарность область 3 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13; при этом рекомбинантное антитело вводят индивидууму в дозе от приблизительно 75 до приблизительно 2000 мг.

В другом аспекте в данном документе описан способ лечения индивидуума, страдающего от рака, включающий введение индивидууму рекомбинантного антитела, которое специфически связывает лейкоз-ингибирующий фактор (LIF), содержащего: (а) последовательность вариативной области тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 41, 42, 44 или 66; и (b) последовательность вариативной области легкой цепи (VL) иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 45-48; при этом рекомбинантное антитело вводят индивидууму в дозе от приблизительно 75 до приблизительно 2000 мг. В другом аспекте в данном документе описан способ лечения индивидуума, страдающего от рака, включающий введение индивидууму рекомбинантного антитела, которое специфически связывает лейкоз-ингибирующий фактор (LIF), содержаще-

го: (а) последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 57-60 или 67; и (б) последовательность легкой цепи иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 61-64; при этом рекомбинантное антитело вводят индивидууму в дозе от приблизительно 75 до приблизительно 2000 мг.

В другом аспекте в данном документе описан фармацевтический состав для применения в лечении рака у индивидуума, где фармацевтический состав содержит фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, носитель или разбавитель и рекомбинантное антитело, где рекомбинантное антитело специфически связывается с лейкозингибирующим фактором (LIF) и содержит: (а) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 1-3; (б) определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 4 или 5; (с) определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 6-8; (д) определяющую комплементарность область 1 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 9 или 10; (е) определяющую комплементарность область 2 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 11 или 12; и (ф) определяющую комплементарность область 3 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13; при этом рекомбинантное антитело вводят индивидууму в дозе от приблизительно 75 до приблизительно 2000 миллиграммов. В другом аспекте в данном документе описан фармацевтический состав для применения в лечении рака у индивидуума, где фармацевтический состав содержит фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, носитель или разбавитель и рекомбинантное антитело, где рекомбинантное антитело специфически связывается с лейкозингибирующим фактором (LIF) и содержит: (а) последовательность варибельной области тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 41, 42, 44 или 66; и (б) последовательность варибельной области легкой цепи (VL) иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 45-48; при этом рекомбинантное антитело вводят индивидууму в дозе от приблизительно 75 до приблизительно 2000 мг.

В другом аспекте в данном документе описан фармацевтический состав для применения в лечении рака у индивидуума, где фармацевтический состав содержит фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, носитель или разбавитель и рекомбинантное антитело, где рекомбинантное антитело специфически связывается с лейкозингибирующим фактором (LIF) и содержит: (а) последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 57-60 или 67; и (б) последовательность легкой цепи иммуноглобулина с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 61-64; при этом рекомбинантное антитело вводят индивидууму в дозе от приблизительно 75 до приблизительно 2000 мг. Используемое в данном документе, если не указано иное, выражение "приблизительно" относится к количеству, которое находится в пределах по меньшей мере 10% от заявленного.

Используемые в данном документе термины "индивидуум", "субъект" и "пациент" используются взаимозаменяемо и включают людей, у которых диагностированы опухоль, рак или другое новообразование или подозревается их наличие. Используемый в данном документе термин "лечить" или "лечение" относится к вмешательствам в нормальное или патологическое состояние индивидуума, разработанным или предназначенным для облегчения по меньшей мере одного признака или симптома, ассоциированного с указанным нормальным или патологическим состоянием. Описанное в данном документе понятие "лечить" или "лечение" в отношении рака относится к вмешательствам, предназначенным для индуцирования полного ответа, частичного ответа, замедления прогрессирования рака или опухоли, подлежащих лечению, уменьшения размера опухоли или опухолевой нагрузки или замедления роста опухоли или опухолевой нагрузки. Под лечением также понимают вмешательства, направленные на уменьшение метастазов или степени злокачественности рака или опухоли. Специалист в данной области техники поймет, что с учетом гетерогенной популяции индивидуумов, страдающих от заболевания, не все индивидуумы будут одинаково или хоть в какой-либо степени реагировать на данное лечение. Тем не менее, эти индивидуумы считаются такими, которые проходят лечение. Неудачное лечение обычно приводит к про-

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

Используемый в данном документе термин "ингибитор контрольной точки иммунного ответа" относится к лекарственному средству, которое ингибирует биологическую молекулу ("молекулу контрольной точки иммунного ответа"), продуцируемую организмом, которая отрицательно регулирует противоопухолевую/противораковую активность Т-клеток в организме. Молекула контрольной точки иммунного ответа может вырабатываться опухолью, иммунной клеткой в микроокружении опухоли или иммунной клеткой, существующей не в микроокружении опухоли, а в кровотоке или лимфатической системе. Молекулы контрольных точек иммунного ответа включают без ограничения PD-1, PDL-1, PDL-2, CTLA4, TIM-3, LAG-3, VISTA, SIGLEC7, PVR, TIGIT, IDO, KIR, A2AR, B7-H3, B7H4 и NOX2.

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

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

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

В тех случаях, когда для сравнения аминокислотных последовательностей используется ALIGN-2, % идентичности аминокислотной последовательности, свойственный данной аминокислотной последовательности А, в отношении данной аминокислотной последовательности В, с ней или в сравнении с ней (что в качестве альтернативы можно перефразировать как: данная аминокислотная последовательность А, которая характеризуется или обладает определенным % идентичности аминокислотной последовательности в отношении данной аминокислотной последовательности В, с ней или в сравнении с ней) рассчитывается следующим образом: частное X/Y умножить на 100, где X представляет собой число аминокислотных остатков, учитываемых в качестве идентичных совпадений программой для выравнивания последовательностей ALIGN-2 в выравнивании А и В данной программы, и где Y представляет собой общее число аминокислотных остатков в В. Следует принимать во внимание, что если длина аминокислотной последовательности А не равна длине аминокислотной последовательности В, то % идентичности аминокислотной последовательности А в отношении В не будет равен % идентичности аминокислотной последовательности В в отношении А. Если специально не указано иное, все значения % идентичности аминокислотной последовательности, используемые в данном документе, получены так, как это описано в предыдущем параграфе, с использованием компьютерной программы ALIGN-2.

Термин "эпитоп" включает любую детерминанту, способную связываться с антигенсвязывающим белком, таким как антитело. Эпитоп представляет собой область антигена, которая связывается антигенсвязывающим белком, который нацелен на этот антиген, и когда антиген представляет собой белок, включает специфические аминокислоты, которые непосредственно контактируют с антигенсвязывающим белком. Чаще всего эпитопы расположены на белках, но в некоторых случаях могут располагаться на других типах молекул, таких как сахараиды или липиды. Эпитопные детерминанты могут включать химически активные поверхностные группировки молекул, такие как аминокислоты, боковые цепи Сахаров, фосфорильные или сульфонильные группы, и могут обладать специфическими характеристиками трехмерной структуры и/или специфическими характеристиками заряда. Обычно антитела, специфические к конкретному антигену-мишени, будут предпочтительно распознавать эпитоп на антигене-мишени среди сложного комплекса белков и/или макромолекул. Структурные атрибуты описанных в данном документе антител Определяющая комплементарность область ("CDR") является частью варибельной области иммуноглобулина (антитела), которая прежде всего отвечает за специфичность антигенного связывания антитела. Области CDR значительно варьируются в разных антителах, даже если антитела специфически связывают одни и те же мишень или эпитоп. Варибельная область тяжелой цепи содержит три области CDR, сокращенно именуемые VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3; и варибельная область легкой цепи содержит три области CDR, сокращенно именуемые VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3. Эти области CDR последовательно расположены в варибельной области, причем CDR1 расположена наиболее близко к N-концу, а CDR3 расположена наиболее близко к C-концу. Между CDR находятся каркасные области, которые вносят вклад в структуру и демонстрируют гораздо меньшую варибельность, чем области CDR. Варибельная область тяжелой цепи содержит четыре каркасных области, сокращенно именуемых VH-FR1, VH-FR2, VH-FR3 и VH-FR4; и варибельная область легкой цепи содержит четыре каркасных области, сокращенно именуемых VL-FR1, VL-FR2, VL-FR3 и VL-FR4. Полные полноразмерные двухвалентные антитела, содержащие две тяжелые и легкие цепи, будут содержать: 12 CDR, с тремя уникальными CDR тяжелой цепи и тремя уникальными CDR легкой цепи; 16 областей FR, с четырьмя уникальными областями FR тяжелой цепи и четырьмя уникальными областями FR легкой цепи. В определенных вариантах осуществления антитела, описанные в данном документе, содержат по меньшей мере три CDR тяжелой цепи. В определенных вариантах осуществления антитела, описанные в данном документе, содержат по меньшей мере три CDR легкой цепи. В определенных вариантах осуществления антитела, описанные в данном документе, содержат по меньшей мере три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи. Точные границы аминокислотной последовательности указанной CDR или FR можно легко определить с помощью любой из ряда хорошо известных схем, включая схемы, описанные в Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (схема нумерации по Кабату); Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948 (схема нумерации по Чотиа); MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:132-145 (1996), "Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography," (схема нумерации "Контакт"); Lefranc MP et al., "IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains," Dev Comp Immunol, 2003 Jan;27(1):55-77 (схема нумерации "IMGT"); и Honegger A and Plückthun A, "Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool," J Mol Biol, 2001 Jun 8;309(3):657-70, (схема нумерации "Aho"). CDR в данном документе идентифицируются среди представленных варибельных последовательностей с использованием различных систем нумерации, с использованием системы нумерации по Кабату, IMGT, по Чотиа или любой их комбинации. Границы данной CDR или FR могут варьироваться в зависимости от схемы, используемой для идентификации. Например, схема по Кабату основана на структурном выравнивании, тогда как схема по Чотиа основана на структурной информации. Нумерация как для схем по Кабату, так и для схем по Чотиа основана на наиболее распространенных значениях длины последовательностей области антитела со вставками, обозначенными буквами, например "30a", и делециями, появляющимися в некоторых антителах. Две

схемы помещают определенные вставки и делеции ("вставки/делеции") в разные положения, что дает разную нумерацию. Схема Контакт основана на анализе сложных кристаллических структур и во многих отношениях аналогична схеме нумерации по Чотиа. В определенных вариантах осуществления CDR могут быть определены с помощью любой комбинации способов по IMGT, Чотиа, Кабату, Контакт и Ахо.

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

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

В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе антитела содержат константную область в дополнение к вариабельной области. Константная область тяжелой цепи (C_H) содержит четыре домена, сокращенно именуемые C_H1, C_H2, C_H3 и C_H4, расположенные на С-конце полипептида полной тяжелой цепи, со стороны С-конца вариабельной области. Константная область легкой цепи (C_L) существенно меньше, чем C_H, и расположена на С-конце полипептида полной легкой цепи, со стороны С-конца вариабельной области. Константная область является высококонсервативной и содержит разные изоформы, которые связаны с несколько отличающимися функциями и свойствами. В определенных вариантах осуществления константная область не обязательна для связывания антитела с антигеном-мишенью. В определенных вариантах осуществления константные области антитела, как тяжелой, так и легкой цепей, не обязательны для связывания антитела. В определенных вариантах осуществления в описанных в данном документе антителах отсутствуют одна или несколько константных областей легкой цепи, константных областей тяжелой цепи или обеих цепей. Большинство моноклональных антител относятся к изоформе IgG; который дополнительно подразделяют на четыре подкласса: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе антитела предусматривают любой подкласс IgG. В определенных вариантах осуществления подкласс IgG предусматривает IgG1. В определенных вариантах осуществления подкласс IgG предусматривает IgG2. В определенных вариантах осуществления подкласс IgG предусматривает IgG3. В определенных вариантах осуществления подкласс IgG предусматривает IgG4.

Антитела содержат область кристаллизующегося фрагмента (область Fc), которая отвечает за связывание с компонентом и рецепторами Fc. Область Fc содержит области C_H2, C_H3 и C_H4 молекулы антитела. Область Fc антитела отвечает за активацию комплемента и за антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC). Область Fc также вносит вклад в период полужизни антитела в сыворотке крови. В определенных вариантах осуществления область Fc антител, описанных в данном документе, содержит одну или несколько аминокислотных замен, которые способствуют комплемент-опосредованному лизису клеток. В определенных вариантах осуществления область Fc антител, описанных в данном документе, содержит одну или несколько аминокислотных замен, которые способствуют ADCC. В определенных вариантах осуществления область Fc антител, описанных в данном документе, содержит одну или несколько аминокислотных замен, которые уменьшают комплемент-опосредованный лизис клеток. В определенных вариантах осуществления область Fc антител, описанных в данном доку-

менте, содержит одну или несколько аминокислотных замен, которые увеличивают связывание антитела с рецептором Fc. В определенных вариантах осуществления рецептор Fc включает FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32), FcγRIIA (CD16a), FcγRIIB (CD16b) или любую их комбинацию. В определенных вариантах осуществления область Fc антител, описанных в данном документе, содержит одну или несколько аминокислотных замен, которые увеличивают период полужизни антитела в сыворотке крови. В определенных вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен, которые увеличивают время полужизни антитела в сыворотке крови, увеличивают аффинность антитела к неонатальному рецептору Fc (FcRn).

В определенных вариантах осуществления антитела в соответствии с настоящим изобретением представляют собой варианты, которые обладают некоторыми, но не всеми эффекторными функциями, что делает их желательным кандидатом для таких вариантов применения, в которых период полужизни антитела *in vivo* важен, но некоторые эффекторные функции (такие как активация комплемента и ADCC) не требуются или вредны. Анализы цитотоксичности *in vitro* и/или *in vivo* могут быть проведены для подтверждения снижения/истощения активности CDC и/или ADCC. Например, можно проводить анализы связывания рецептора Fc (FcR), чтобы убедиться в том, что антитело лишено способности связывания с FcγR (следовательно, вероятно, не обладает активностью ADCC), но сохраняет способность связывания с FcRn. Неограничивающие примеры анализов *in vitro* для оценки активности ADCC молекулы, представляющей интерес, описаны в патентах США №№ 5500362 и 5821337. В качестве альтернативы можно использовать нерадиоактивные аналитические методики (например, нерадиоактивные анализы цитотоксичности АСТГ™ и СутоТох 96®). Эффекторные клетки, пригодные для таких анализов, включают мононуклеарные клетки периферической крови (PBMС), моноциты, макрофаги и естественные клетки-киллеры (NK).

Антитела могут иметь увеличенный период полужизни и улучшенное связывание с неонатальным рецептором Fc (FcRn) (см., например, US 2005/0014934). Такие антитела могут содержать область Fc с одной или несколькими заменами в ней, которые улучшают связывание области Fc с FcRn, и включают антитела с заменами в одном или нескольких остатках области Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 или 434 согласно системе нумерации ЕС (см., например, патент США № 7371826). Также рассматриваются другие примеры вариантов области Fc (см., например, Duncan & Winter, Nature 322:738-40 (1988); патенты США №№ 5648260 и 5624821; и WO 94/29351).

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

Гуманизация обычно снижает или оказывает незначительное влияние на общую аффинность антитела. В данном документе описаны антитела, которые неожиданно обладают большей аффинностью к своей мишени после гуманизации. В определенных вариантах осуществления гуманизация повышает аффинность антитела на 10%. В определенных вариантах осуществления гуманизация повышает аффинность антитела на 25%. В определенных вариантах осуществления гуманизация повышает аффинность антитела на 35%. В определенных вариантах осуществления гуманизация повышает аффинность антитела на 50%. В определенных вариантах осуществления гуманизация повышает аффинность антитела на 60%. В определенных вариантах осуществления гуманизация повышает аффинность антитела на 75%. В определенных вариантах осуществления гуманизация повышает аффинность антитела на 100%. Соответственно, аффинность измеряют с использованием поверхностного плазмонного резонанса (SPR). В определенных вариантах осуществления аффинность измеряют с использованием гликозилированного человеческого LIF. В определенных вариантах осуществления гликозилированный человеческий LIF был иммобилизован на поверхности чипа SPR. В определенных вариантах осуществления антитело связывается с K_D, составляющей менее приблизительно 300 наномоль/л, 200 наномоль/л, 150 наномоль/л, 125 наномоль/л, 100 наномоль/л, 90 наномоль/л, 80 наномоль/л, 70 наномоль/л, 60 наномоль/л, 50 наномоль/л, 40 наномоль/л или меньше. Антитела по настоящему изобретению описанные в данном документе антитела были получены от крыс, иммунизированных ДНК, кодирующей человеческий LIF.

В определенных вариантах осуществления в данном документе описано антитело (5D8), которое специфически связывает LIF, содержащее область VH-CDR1, представленную под любым из SEQ ID

тельности VL-FR1, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 27, аминокислотной последовательности VL-FR2, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 31, аминокислотной последовательности VL-FR3, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 35, и аминокислотную последовательность VL-FR4, которая по меньшей мере на 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 38. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывает LIF, содержит одну или несколько человеческих каркасных областей тяжелой цепи, содержащих: аминокислотную последовательность VH-FR1, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 14-17, аминокислотную последовательность VH-FR2, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 18 или 19, аминокислотную последовательность VH-FR3, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 20-22, или аминокислотную последовательность области VH-FR4, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 23-25. В определенных вариантах осуществления одна или несколько человеческих каркасных областей тяжелой цепи содержат аминокислотную последовательность VH-FR1, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 15, аминокислотную последовательность VH-FR2, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 19, аминокислотную последовательность VH-FR3, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 20, и аминокислотную последовательность VH-FR4, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 24. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывает LIF, содержит одну или несколько человеческих каркасных областей легкой цепи, содержащих аминокислотную последовательность VL-FR1, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 26-29, аминокислотную последовательность VL-FR2, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 30-33, аминокислотную последовательность VL-FR3, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 34-37, или аминокислотную последовательность VL-FR4, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 38-40. В определенных вариантах осуществления одна или несколько человеческих каркасных областей легкой цепи содержат аминокислотную последовательность VL-FR1, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 27, аминокислотную последовательность VL-FR2, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 31, аминокислотную последовательность VL-FR3, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 35, и аминокислотную последовательность VL-FR4, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 38. В определенных вариантах осуществления одна или несколько человеческих каркасных областей тяжелой цепи и одна или несколько человеческих каркасных областей легкой цепи содержат аминокислотную последовательность VH-FR1, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 15, аминокислотную последовательность VH-FR2, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 19, аминокислотную последовательность VH-FR3, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 20, аминокислотную последовательность VH-FR4, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 24, аминокислотную последовательность VL-FR1, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 27, аминокислотную последовательность VL-FR2, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 31, аминокислотную последовательность VL-FR3, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 35, и аминокислотную последовательность VL-FR4, которая идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 38. В определенных вариантах осуществления антитело специфически связывает человеческий LIF. 5D8

Описанные в данном документе антитела были получены от крыс, иммунизированных ДНК, кодирующей человеческий LIF. Одно такое антитело (5D8) было клонировано и секвенировано и содержит CDR (с применением комбинации способов нумерации CDR по Кабату и IMGT) со следующими аминокислотными последовательностями: VH-CDR1, соответствующая SEQ ID NO: 1 (GFTFSHAWMH), VH-CDR2, соответствующая SEQ ID NO: 4 (QIKAKSDDYATYYAESVKG), VH-CDR3, соответствующая SEQ ID NO: 6 (TCWEWDLDF), VL-CDR1, соответствующая SEQ ID NO: 9 (RSSQSLLSDSGHTYLN), VL-CDR2, соответствующая SEQ ID NO: 11 (SVSNLES), и VL-CDR3, соответствующая SEQ ID NO: 13 (MQATHAPPYT). Данное антитело гуманизировали посредством прививания CDR, и его гуманизированный вариант обозначен как h5D8.

В определенных вариантах осуществления в данном документе описано антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее область VH-CDR1, которая по меньшей мере на 80 или 90% иден-

тична последовательности, представленной под SEQ ID NO: 1 (GFTFSHAWMH), VH-CDR2, которая по меньшей мере на 80%, 90% или 95% идентична последовательности, представленной под SEQ ID NO: 4 (QIKAKSDDYATYYAESVKG), и VH-CDR3, которая по меньшей мере на 80 или 90% идентична последовательности, представленной под SEQ ID NO: 6 (TCWEWDLDF). В определенных вариантах осуществления в данном документе описано антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее область VL-CDR1, которая по меньшей мере на 80 или 90% идентична последовательности, представленной под SEQ ID NO: 9 (RSSQSLLDSDGHTYLN), VL-CDR2, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности, представленной под SEQ ID NO: 11 (SVSNLES), и VL-CDR3, которая по меньшей мере на 80 или 90% идентична последовательности, представленной под SEQ ID NO: 13 (MQATHAPPYT). В определенных вариантах осуществления в данном документе описано антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее область VH-CDR1, представленную под SEQ ID NO: 1 (GFTFSHAWMH), VH-CDR2, представленную под SEQ ID NO: 4 (QIKAKSDDYATYYAESVKG), VH-CDR3, представленную под SEQ ID NO: 6 (TCWEWDLDF), VL-CDR1, представленную под SEQ ID NO: 9 (RSSQSLLDSDGHTYLN), VL-CDR2, представленную под SEQ ID NO: 11 (SVSNLES), и VL-CDR3, представленную под SEQ ID NO: 13 (MQATHAPPYT). Определенные консервативные аминокислотные замены предусмотрены в аминокислотных последовательностях CDR по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления антитело содержит CDR, которые отличаются от аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 1, 4, 6, 9, 11 и 13, по 1, 2, 3 или 4 аминокислотам. В определенных вариантах осуществления антитело содержит CDR, которые отличаются от аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 1, 4, 6, 9, 11 и 13, по 1, 2, 3 или 4 аминокислотам и не влияют на аффинность связывания более чем на 10%, 20% или 30%. В определенных вариантах осуществления антитела, которые специфически связывают LIF, содержат одну или несколько человеческих каркасных областей тяжелой цепи, содержащих: аминокислотную последовательность VH-FR1, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 14-17, аминокислотную последовательность VH-FR2, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 18 или 19, аминокислотную последовательность VH-FR3, которая по меньшей мере приблизительно на 90% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 20-22, или аминокислотную последовательность области VH-FR4, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 23-25. В определенных вариантах осуществления одна или несколько человеческих каркасных областей тяжелой цепи содержат аминокислотную последовательность VH-FR1, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 15, аминокислотной последовательности VH-FR2, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 19, аминокислотной последовательности VH-FR3, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 20, и аминокислотную последовательность VH-FR4, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 24. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывает LIF, содержит одну или несколько человеческих каркасных областей легкой цепи, содержащих: аминокислотную последовательность VL-FR1, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 26-29, аминокислотную последовательность VL-FR2, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 30-33, аминокислотную последовательность VL-FR3, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 34-37, или аминокислотную последовательность VL-FR4, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 38-40. В определенных вариантах осуществления одна или несколько человеческих каркасных областей легкой цепи содержат аминокислотную последовательность VL-FR1, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 27, аминокислотной последовательности VL-FR2, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 31, аминокислотной последовательности VL-FR3, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 35, и аминокислотную последовательность VL-FR4, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 38. В определенных вариантах осуществления одна или несколько человеческих каркасных областей

В определенных вариантах осуществления в данном документе описано антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее аминокислотную последовательность VH-CDR1, которая по меньшей мере на 80 или 90% идентична последовательности, представленной под SEQ ID NO:1 (GFTF-SHAWMH), аминокислотную последовательность VH-CDR2, которая по меньшей мере на 80%, 90% или 95% идентична последовательности, представленной под SEQ ID NO: 4 (QIKAKSDDYATYYAESVKG), и аминокислотную последовательность VH-CDR3, которая по меньшей мере на 80 или 90% идентична последовательности, представленной под SEQ ID NO: 8 (TSWEWDLDF). В определенных вариантах осуществления в данном документе описано антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее аминокислотную последовательность VL-CDR1, которая по меньшей мере на 80 или 90% идентична последовательности, представленной под SEQ ID NO: 9 (RSSQSLLDSDGHTYLN), аминокислотную последовательность VL-CDR2, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности, представленной под SEQ ID NO: 11 (SVSNLES), и аминокислотную последовательность VL-CDR3, которая по меньшей мере на 80 или 90% идентична последовательности, представленной под SEQ ID NO: 13 (MQATHAPPYT). В определенных вариантах осуществления в данном документе описано антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее аминокислотную последовательность VH-CDR1, представленную под SEQ ID NO: 1 (GFTFSHAWMH), аминокислотную последовательность VH-CDR2, представленную под SEQ ID NO: 4 (QIKAKSDDYATYYAESVKG), аминокислотную последовательность VH-CDR3, представленную под SEQ ID NO: 8 (TSWEWDLDF), аминокислотную последовательность VL-CDR1, представленную под SEQ ID NO: 9 (RSSQSLLDSDGHTYLN), аминокислотную последовательность VL-CDR2, представленную под SEQ ID NO: 11 (SVSNLES), и аминокислотную последовательность VL-CDR3, представленную под SEQ ID NO: 13 (MQATHAPPYT). Определенные консервативные аминокислотные замены предусмотрены в аминокислотных последовательностях CDR по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления антитело содержит CDR, которые отличаются от аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 1, 4, 8, 9, 11 и 13, по 1, 2, 3 или 4 аминокислотам. В определенных вариантах осуществления антитело содержит CDR, которые отличаются от аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 1, 4, 8, 9, 11 и 13, по 1,2, 3 или 4 аминокислотам и не влияют на аффинность связывания более чем на 10%, 20% или 30%. В определенных вариантах осуществления антитела, которые специфически связывают LIF, содержат одну или несколько человеческих каркасных областей тяжелой цепи, содержащих аминокислотную последовательность VH-FR1, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 14-17, аминокислотную последовательность VH-FR2, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 18 или 19, аминокислотную последовательность VH-FR3, которая по меньшей мере приблизительно на 90% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 20-22, или аминокислотную последовательность области VH-FR4, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 23-25. В определенных вариантах осуществления одна или несколько человеческих каркасных областей тяжелой цепи содержат аминокислотную последовательность VH-FR1, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 15, аминокислотной последовательности VH-FR2, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 19, аминокислотной последовательности VH-FR3, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 20, и аминокислотную последовательность VH-FR4, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 24. В определенных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывает LIF, содержит одну или несколько человеческих каркасных областей легкой цепи, содержащих аминокислотную последовательность VL-FR1, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 26-29, аминокислотную последовательность VL-FR2, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 30-33, аминокислотную последовательность VL-FR3, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 34-37, или аминокислотную последовательность VL-FR4, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 38-40. В определенных вариантах осуществления одна или несколько человеческих каркасных областей легкой цепи содержат аминокислотную последовательность VL-FR1, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 27, аминокислотной последовательности VL-FR2, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, 90%,

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

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

В определенных вариантах осуществления в данном документе описано антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее гуманизованную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 50; и гуманизованную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 54. В определенных вариантах осуществления в данном документе описано антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее гуманизованную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 50; и гуманизованную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 54.

Эпитопы, связываемые терапевтически применимыми антителами к LIF В данном документе описан уникальный эпитоп человеческого LIF, который при его связывании подавляет биологическую активность LIF (например, фосфорилирование STAT3) и подавляет рост опухоли *in vivo*. Описанный в данном документе эпитоп состоит из двух прерывистых участков аминокислот (от остатка 13 до остатка 32 и от остатка 120 до остатка 138 человеческого LIF), которые присутствуют в двух различных топологических доменах (альфа-спирали А и С) человеческого белка LIF. Данное связывание представляет собой комбинацию слабого (ван-дер-ваальсовы силы), умеренного (водородные связи) и сильного (солевой мостик) взаимодействий. В определенных вариантах осуществления контактный остаток представляет собой остаток на LIF, который образует водородную связь с остатком на антителе к LIF. В определенных вариантах осуществления контактный остаток представляет собой остаток на LIF, который образует солевой мостик с остатком на антителе к LIF. В определенных вариантах осуществления контактный остаток представляет собой остаток на LIF, который взаимодействует посредством ван-дер-ваальсовых сил с остатком на антителе к LIF и находится на расстоянии в пределах по меньшей мере 5, 4 или 3 ангстрем от него. В определенных вариантах осуществления в данном документе описано выделенное антитело, которое связывает любые один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать, восемнадцать, девятнадцать или двадцать из следующих остатков: A13, I14, R15, H16, P17, C18, H19, N20, Q25, Q29, Q32, D120, R123, S127, N128, L130, C131, C134, S135 или H138 из SEQ ID NO: 68. В определенных вариантах осуществления в данном документе описано выделенное антитело, которое связывает все следующие остатки: A13, I14, R15, H16, P17, C18, H19, N20, Q25, Q29, Q32, D120, R123, S127, N128, L130, C131, C134, S135 или H138 из SEQ ID NO: 68. В определенных вариантах осуществления в данном документе описано выделенное антитело, которое связывает все следующие остатки: A13, I14, R15, H16, P17, C18, H19, N20, Q25, Q29, Q32, D120, R123, S127, N128, L130, C131, C134, S135 или H138 из SEQ ID NO: 68. В определенных вариантах осуществления антитело связывает только те остатки, которые участвуют в сильных или умеренных взаимодействиях с антителом. В определенных вариантах осуществления антитело связывает только те остатки, которые участвуют в сильных взаимодействиях с антителом. В определенном варианте осуществления антитело взаимодействует со спиралью А и С в LIF. В определенном варианте осуществления антитело блокирует взаимодействие LIF с gp130. В определенных вариантах осуществления в данном документе описано антитело, содержащее CDR с аминокислотной последова-

одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать, восемнадцать, девятнадцать или двадцать из следующих остатков: A13, I14, R15, H16, P17, C18, H19, N20, Q25, Q29, Q32, D120, R123, S127, N128, L130, C131, C134, S135 или H138 из SEQ ID NO: 68. В определенных вариантах осуществления в данном документе описано антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее аминокислотную последовательность вариабельной области гуманизированной тяжелой цепи, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 42; и аминокислотную последовательность вариабельной области гуманизированной легкой цепи, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46, и которое связывает все из следующих остатков: A13, I14, R15, H16, P17, C18, H19, N20, Q25, Q29, Q32, D120, R123, S127, N128, L130, C131, C134, S135 или H138 из SEQ ID NO: 68. В определенных вариантах осуществления антитело связывает только те остатки, которые участвуют в сильных или умеренных взаимодействиях с антителом. В определенных вариантах осуществления антитело связывает только те остатки, которые участвуют в сильных взаимодействиях с антителом.

В определенных вариантах осуществления в данном документе описано антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее аминокислотную последовательность вариабельной области гуманизированной тяжелой цепи, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 66; и аминокислотную последовательность вариабельной области гуманизированной легкой цепи, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46, и которое связывает любые один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать, восемнадцать, девятнадцать или двадцать из следующих остатков: A13, I14, R15, H16, P17, C18, H19, N20, Q25, Q29, Q32, D120, R123, S127, N128, L130, C131, C134, S135 или H138 из SEQ ID NO: 68. В определенных вариантах осуществления в данном документе описано антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее аминокислотную последовательность вариабельной области гуманизированной тяжелой цепи, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 66; и аминокислотную последовательность вариабельной области гуманизированной легкой цепи, которая по меньшей мере приблизительно на 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46, и которое связывает все из следующих остатков: A13, I14, R15, H16, P17, C18, H19, N20, Q25, Q29, Q32, D120, R123, S127, N128, L130, C131, C134, S135 или H138 из SEQ ID NO: 68. В определенных вариантах осуществления антитело связывает только те остатки, которые участвуют в сильных или умеренных взаимодействиях с антителом. В определенных вариантах осуществления антитело связывает только те остатки, которые участвуют в сильных взаимодействиях с антителом. Показания к применению В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе антитела ингибируют передачу сигналов LIF в клетках. В определенных вариантах осуществления значение IC_{50} для биологического ингибирования антителом в условиях сывороточного голодания в клетках U-251 меньше или равно приблизительно 100, 75, 50, 40, 30, 20, 10, 5 или 1 наномоль/л. В определенных вариантах осуществления значение IC_{50} для биологического ингибирования антителом в условиях сывороточного голодания в клетках U-251 меньше или равно приблизительно 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 или 100 наномоль/л.

В определенных вариантах осуществления раскрытые в данном документе h5D8 и дозировки h5D8 являются применимыми для лечения опухолей и видов рака, при которых экспрессируется LIF. В определенных вариантах осуществления индивидуум, получавший лечение с помощью антител по настоящему изобретению, был выбран для лечения как имеющий LIF-положительную опухоль/LIF-положительный рак. В определенных вариантах осуществления опухоль является LIF-положительной или продуцирует повышенные уровни LIF. В определенных вариантах осуществления LIF-положительность определяют путем сравнения с референтным значением или установленными патологическими критериями. В определенных вариантах осуществления LIF-положительная опухоль экспрессирует LIF в количестве, которое в более чем 2 раза, 3 раза, 5 раз, 10 раз, 100 раз или больше превышает количество LIF, которое экспрессирует нетрансформированная клетка, из которой произошла опухоль. В определенных вариантах осуществления опухоль приобрела эктопическую экспрессию LIF. LIF-положительная опухоль может быть определена гистологически с использованием, например, иммуногистохимического анализа с применением антитела к LIF; посредством широко применяемых методов молекулярной биологии, таких как, например, количественное определение мРНК посредством ПЦР в режиме реального времени или секвенирование РНК; или количественное определение белка, например,

посредством вестерн-блоттинга, проточной цитометрии, ELISA или гомогенного количественного анализа белка (например, AlphaLISA®). В определенных вариантах осуществления антитела можно использовать для лечения пациентов, у которых диагностирован рак. В определенных вариантах осуществления рак включает одну или более раковых стволовых клеток или представляет собой одну или более раковых стволовых клеток.

В определенных вариантах осуществления раскрытые в данном документе h5D8 и дозировки h5D8 являются применимыми для лечения опухолей при видах рака, при которых экспрессируется рецептор LIF (CD118). Опухоль, положительная по рецептору LIF, может быть определена посредством гистопатологического анализа или проточной цитометрии и в определенных вариантах осуществления включает клетку, которая связывает антитело к рецептору LIF с более чем 2x, 3x, 4x, 5x, 10x или большей силой по сравнению с изотипическим контролем. В определенных вариантах осуществления опухоль приобрела эктопическую экспрессию рецептора LIF. В определенном варианте осуществления рак представляет собой раковую стволовую клетку. В определенном варианте осуществления LIF-положительная опухоль или рак могут быть определены иммуногистохимическим анализом с использованием антитела к LIF и антитела к LIF. В определенном варианте осуществления LIF-положительную опухоль определяют посредством иммуногистохимического (ИНС) анализа уровня экспрессии LIF в основных 10%, 20%, 30%, 40% или основных 50% опухолей.

Описанные в данном документе h5D8 и дозировки h5D8 влияют на многие результаты. В определенном варианте осуществления описанные в данном документе антитела могут уменьшать присутствие макрофагов M2 в опухолях по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или больше в опухолевой модели по сравнению с контрольным антителом (например, изотипическим контролем). Макрофаги M2 могут быть идентифицированы посредством окрашивания на CCL22 и/или CD206 срезов в ИНС или посредством проточной цитометрии опухоль-инфильтрирующих иммунных или миелоидных клеток. В определенном варианте осуществления описанные в данном документе антитела могут уменьшать связывание LIF с gp130 в опухолях по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или больше по сравнению с контрольным антителом (например, изотипическим контролем). В определенном варианте осуществления описанные в данном документе антитела могут уменьшать передачу сигналов LIF по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или больше в LIF-чувствительной клеточной линии по сравнению с контрольным антителом (например, изотипическим контролем). С помощью вестерн-блоттинга передача сигналов LIF может быть измерена, например, по фосфорилированию STAT3 (нисходящей мишени в сигнальном пути LIF). Антитела в данном документе также являются высокоспецифичными к LIF по сравнению с другими цитокинами, являющимися представителями семейства IL-6. В определенных вариантах осуществления антитела связывают человеческий LIF с аффинностью, которая в приблизительно 10x, приблизительно 50x или приблизительно 100x превышает этот показатель у любого другого цитокина семейства IL-6. В определенных вариантах осуществления антитела к LIF не связываются с другими цитокинами семейства IL-6, которые продуцируются в системе млекопитающего. В определенных вариантах осуществления антитела не связываются с онкостатином M, который продуцируется в системе млекопитающего.

Описанные в данном документе h5D8 и дозировки h5D8 являются применимыми в способах обеспечения улучшения в отношении уровней биомаркеров, которые являются прогностическими показателями опухолевой или раковой нагрузки. Такие опухолевые маркеры, как углеводный антиген-125 (CA-125), углеводный антиген 19-9 (CA 19-9) и карциноэмбриональный антиген (СЕА), являются положительными прогностическими показателями. Как правило, низкие уровни этих антигенов коррелируют с успехом лечения. В определенных вариантах осуществления h5D8 снижает уровень СЕА, СА 19-9, СА-125 или их комбинации в сыворотке крови при введении в дозе приблизительно 1125 или 1500 приблизительно раз в 2, 3 или 4 недели, включая поэтапные повышения доз в течение этого периода. В определенных вариантах осуществления ассоциированный с опухолью маркер представляет собой СА 19-9, СА-125, СЕА или их комбинацию. В определенных вариантах осуществления ассоциированный с опухолью маркер представляет собой СЕА. В определенных вариантах осуществления ассоциированный с опухолью маркер представляет собой СА-125. В определенных вариантах осуществления ассоциированный с опухолью маркер представляет собой СА 19-9. Уровни СА 19-9, СА-125, СЕА или их комбинации можно снизить приблизительно на 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40% или 50% в результате лечения, описанного в данном документе. H5D8 и дозировки h5D8, описанные в данном документе, также можно применять для улучшения других прогностических показателей опухолевого/ракового бремени или влияния заболевания. В определенных вариантах осуществления прогностическим показателем является статус по Восточной объединенной онкологической группе США ("ECOG"). Статус по ECOG устанавливается по шкале от 0 до 5 следующим образом: 0 - полностью активен, способен без ограничений выполнять все действия, как и до заболевания; 1 - ограничен в физически напряженной деятельности, но передвигается и может выполнять легкую или сидячую работу, например легкую домашнюю работу, офисную работу; 2 - амбулаторный и способен самостоятельно осуществлять уход за собой, но не способен выполнять какую-либо рабочую деятельность; приблизительно более 50% ч бодрствования и менее; 3 - способен осуществлять уход за собой лишь в ограниченной мере; прикован к постели или креслу более

50% времени бодрствования; 4 - полностью инвалидизирован; не может производить уход за собой; полностью прикован к кровати или креслу; 5 - мертвый. В определенных вариантах осуществления способы и дозировки обеспечивают снижение оценки по ECOG на 1, 2, 3 или 4. В определенных вариантах осуществления статус по ECOG индивидуума снижается до 0, 1, 2 или 3. В определенных вариантах осуществления статус по ECOG индивидуума не увеличивается в течение по меньшей мере 3, 6, 9 или 12 месяцев. В определенных вариантах осуществления статус по ECOG индивидуума снижается до 0 или 1 при введении h5D8 в дозе приблизительно 1125 или 1500 приблизительно раз в 2, 3 или 4 недели, включая поэтапные повышения доз в течение этого периода. Это улучшение или задержка прогрессирования будут видны после 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более процедур лечения.

В определенных вариантах осуществления лечение с использованием h5D8 приводит к стабилизации заболевания. В определенных вариантах осуществления h5D8 и дозировки h5D8, описанные в данном документе, приводят к стабилизации заболевания в течение по меньшей мере 3, 6, 12, 15, 18, 24, 30 или 36 месяцев во время лечения. В определенных вариантах осуществления антитела и дозировки, описанные в данном документе, приводят к стабилизации заболевания на по меньшей мере 3, 6, 12, 15, 18, 24, 30 или 36 месяцев во время лечения с использованием h5d8, вводимого в дозе приблизительно 1125 или 1500 приблизительно раз в 2, 3 или 4 недели, включая поэтапные повышения доз в течение этого периода. В определенных вариантах осуществления антитела и дозировки, описанные в данном документе, приводят к стабилизации заболевания по меньшей мере на 12 месяцев во время лечения с использованием h5d8, вводимого в дозе приблизительно 1125 или 1500 приблизительно раз в 2, 3 или 4 недели, включая поэтапные повышения доз в течение этого периода. Эта задержка прогрессирования будет видна после 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более процедур лечения.

В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе h5D8 и дозировки h5D8 являются применимыми для лечения рака или опухоли. В определенных вариантах осуществления h5D8 является применимым для лечения рака, резистентного к по меньшей мере одному другому виду лечения. В определенных вариантах осуществления лечение представляет собой химиотерапевтическое или иммунотерапевтическое лечение (например, терапию ингибиторами контрольных точек иммунного ответа). В определенных вариантах осуществления иммунотерапия направлена на PD-1, PDL-1, PDL-2 или любую их комбинацию. В определенных вариантах осуществления иммунотерапия направлена на рецептор вируса полиомиелита (PVR), TIGIT или любую их комбинацию. В определенных вариантах осуществления рак включает опухоли молочной железы, сердца, легкого, тонкой кишки, толстой кишки, селезенки, почки, мочевого пузыря, головы, шеи, яичника, предстательной железы, мозга, поджелудочной железы, кожи, кости, костного мозга, крови, тимуса, матки, яичка и печени. В определенных вариантах осуществления опухоли, которые можно лечить с помощью антител по настоящему изобретению, включают аденому, аденокарциному, ангиосаркому, астроцитому, эпителиальную карциному, герминому, глиобластому, глиому, гемангиоэндотелиому, гемангиосаркому, гематому, гепатобластому, лейкоз, лимфому, медуллобластому, меланому, нейробластому, остеосаркому, ретинобластому, рабдомиосаркому, саркому и/или тератому. В определенных вариантах осуществления опухоль/рак выбраны из группы, состоящей из акральная лентигинозной меланомы, актинического кератоза, аденокарциномы, аденоидно-кистозной карциномы, аденом, аденосаркомы, аденосквамозной карциномы, астроцитарных опухолей, карциномы бартолиновой железы, базальноклеточной карциномы, карциномы бронхиальной железы, капиллярного карциноида, карциномы, карциносаркомы, холангиокарциномы, хондросаркомы, цистаденомы, опухоли эндодермального синуса, гиперплазии эндометрия, саркомы стромы эндометрия, эндометриоидной аденокарциномы, эпендимальной саркомы, саркомы Юинга, очаговой узловой гиперплазии, гастриномы, опухолей из клеток зародышевой линии, глиобластомы, глюкоганомы, гемангиобластомы, гемангиоэндотелиомы, гемангиомы, аденомы печени, аденоматоза печени, гепатоцеллюлярной карциномы, инсулинита, интраэпителиального новообразования, интраэпителиального плоскоклеточного новообразования, инвазивной плоскоклеточной карциномы, крупноклеточной карциномы, липосаркомы, карциномы легкого, лимфобластного лейкоза, лимфоцитарного лейкоза, лейомиосаркомы, меланомы, злокачественной меланомы, злокачественной мезотелиальной опухоли, шванномы, медуллобластомы, медуллоэпителиомы, мезотелиомы, мукоэпидермоидной карциномы, миелоидного лейкоза нейробластомы, нейроэпителиальной аденокарциномы, узловой меланомы, остеосаркомы, карциномы яичника, папиллярной серозной аденокарциномы, опухолей гипофиза, плазмацитомы, псевдосаркомы, карциномы предстательной железы, легочной бластомы, почечно-клеточной карциномы, ретинобластомы, рабдомиосаркомы, саркомы, серозной карциномы, плоскоклеточной карциномы, мелкоклеточной карциномы, карциномы мягких тканей, соматостатин-секретирующей опухоли, плоскоклеточной карциномы, недифференцированной карциномы, увеальной меланомы, веррукозной карциномы, карциномы влагалища/вульвы, опухоли, секретирующей вазоактивный интестинальный полипептид (ВИПомы), и опухоли Вильмса. В определенных вариантах осуществления опухоль/рак, подлежащие лечению с помощью одного или нескольких антител по настоящему изобретению, включают рак головного мозга, рак головы и шеи, колоректальную карциному, острый миелоидный лейкоз, пре-B-клеточный острый лимфобластный лейкоз, рак мочевого пузыря, астроцитому, предпочтительно астроцитому II, III или IV степени, глиобластому, мультиформную глиобластому, мелкоклеточный рак и немелкоклеточный рак, предпочтительно

немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого, метастатическую меланому, андроген-независимый метастатический рак предстательной железы, андроген-зависимый метастатический рак предстательной железы, аденокарциному предстательной железы и рак молочной железы, предпочтительно протоковый рак молочной железы и/или карциному молочной железы. В определенных вариантах осуществления рак, подлежащий лечению с помощью антител по настоящему изобретению, включает глиобластому. В определенных вариантах осуществления рак, подлежащий лечению с помощью одного или нескольких антител по настоящему изобретению, включает рак поджелудочной железы. В определенных вариантах осуществления рак, подлежащий лечению с помощью одного или нескольких антител по настоящему изобретению, включает рак яичника. В определенных вариантах осуществления рак, подлежащий лечению с помощью одного или нескольких антител по настоящему изобретению, включает рак легкого. В определенных вариантах осуществления рак, подлежащий лечению с помощью одного или нескольких антител по настоящему изобретению, включает рак предстательной железы. В определенных вариантах осуществления рак, подлежащий лечению с помощью одного или нескольких антител по настоящему изобретению, включает рак толстой кишки. В определенных вариантах осуществления рак, подлежащий лечению, включает глиобластому, рак поджелудочной железы, рак яичника, рак толстой кишки, рак предстательной железы или рак легкого. В определенном варианте осуществления рак является рефрактерным к другому лечению. В определенном варианте осуществления рак, который лечат, является рецидивирующим. В определенном варианте осуществления рак представляет собой рецидивирующие/рефрактерные глиобластому, рак поджелудочной железы, рак яичника, рак толстой кишки, рак предстательной железы или рак легкого. В определенных вариантах осуществления рак включает распространенную солидную опухоль, глиобластому, рак желудка, рак кожи, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичка, рак щитовидной железы, рак головы и шеи, рак печени, рак почки, рак пищевода, рак яичника, рак толстой кишки, рак легкого, лимфому или рак мягких тканей. В определенных вариантах осуществления рак включает немелкоклеточный рак легкого, эпителиальную карциному яичника или аденокарциному поджелудочной железы. В определенных вариантах осуществления рак включает распространенную солидную опухоль. В определенных вариантах осуществления рак включает рак аппендикса, рак прямой кишки, метастатическую миксоидную липосаркому и параганглиому.

Терапевтические способы

В определенных вариантах осуществления антитела можно вводить любым путем, подходящим для введения фармацевтических композиций, содержащих антитела, таким как, например, подкожный, интраперитонеальный, внутривенный, внутримышечный, внутриопухолевый или интрацеребральный и т.д. В определенных вариантах осуществления антитела вводят внутривенно. В определенных вариантах осуществления антитела вводят согласно подходящей схеме введения, например раз в неделю, два раза в неделю, раз в месяц, два раза в месяц и т.д. В определенных вариантах осуществления антитела вводят приблизительно один раз в три недели. Антитела можно вводить в любом терапевтически эффективном количестве. В определенных вариантах осуществления терапевтически приемлемое количество составляет от приблизительно 0,1 до приблизительно 50 мг/кг. В определенных вариантах осуществления терапевтически приемлемое количество составляет от приблизительно 1 до приблизительно 40 мг/кг. В определенных вариантах осуществления терапевтически приемлемое количество составляет от приблизительно 5 до приблизительно 30 мг/кг. Антитело h5D8 можно вводить в фиксированной дозе независимо от веса или массы индивидуума, которому вводят антитело h5D8. Антитело h5D8 можно вводить в фиксированной дозе независимо от веса или массы индивидуума, которому вводят антитело h5D8, при условии, что масса индивидуума составляет по меньшей мере приблизительно 37,5 кг. Фиксированная доза h5D8 для введения может составлять от приблизительно 75 до приблизительно 2000 мг. Фиксированная доза h5D8 для введения может составлять от приблизительно 225 до приблизительно 2000 мг, от приблизительно 750 до приблизительно 2000 мг, от приблизительно 1125 до приблизительно 2000 мг или от приблизительно 1500 до приблизительно 2000 мг. Фиксированная доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 75 мг. Фиксированная доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 225 мг. Фиксированная доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 750 мг. Фиксированная доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 1125 мг. Фиксированная доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 1500 мг. Фиксированная доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 2000 мг. Предполагаются и другие дозировки h5D8. Фиксированная доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 50, 100, 150, 175, 200, 250, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, 775, 800, 825, 850, 875, 900, 925, 950, 975, 1000, 1025, 1050, 1075, 1100, 1150, 1175, 1200, 1225, 1250, 1275, 1300, 1325, 1350, 1375, 1400, 1425, 1450, 1475, 1525, 1550, 1575, 1600, 1625, 1650, 1675, 1700, 1725, 1750, 1775, 1800, 1825, 1850, 1875, 1900, 1925, 1950, 1975, 2025, 2050, 2075 или 2100 мг. Любую из этих доз можно вводить приблизительно один раз в неделю, приблизительно один раз в две недели, приблизительно один раз в три недели или приблизительно один раз в четыре недели.

Фиксированная доза h5D8 для введения может составлять от приблизительно 75 до приблизительно 2000 мг приблизительно один раз в неделю. Фиксированная доза h5D8 для введения может составлять от

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

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

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

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

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

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

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

Описанные в данном документе дозы в результате могут обеспечить период полужизни h5D8 в сыворотке/плазме крови, составляющий от приблизительно 15 до приблизительно 20 дней. В определенных вариантах осуществления дозировки в результате обеспечивают период полужизни в сыворотке крови, составляющий от приблизительно 16 до 19 дней. В определенных вариантах осуществления дозировки в результате обеспечивают период полужизни в сыворотке крови, составляющий от приблизительно 17 до 18 дней. В определенных вариантах осуществления дозировки h5D8 для введения, составляющие 750 миллиграммов, 1125 миллиграммов или 1500 миллиграммов, в результате обеспечивают период полужизни в сыворотке крови, составляющий приблизительно 17 или 18 дней.

Дозировку любой из описанных в данном документе величин можно составить в виде композиции для лечения описанного в данном документе рака/опухоли. Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, носители и разбавители В определенных вариантах осуществления антилета по настоящему изобретению вводят в виде суспензии в стерильном растворе. В определенных вариантах осуществления раствор содержит физиологически приемлемую концентрацию соли (например, NaCl). В определенных вариантах осуществления раствор содержит от приблизительно 0,6 до 1,2% NaCl. В опре-

деленных вариантах осуществления раствор содержит от приблизительно 0,7 до 1,1% NaCl. В определенных вариантах осуществления раствор содержит от приблизительно 0,8 до 1,0% NaCl. В определенных вариантах осуществления высококонцентрированный исходный раствор антитела можно разбавить в приблизительно 0,9% NaCl. В определенных вариантах осуществления раствор содержит приблизительно 0,9% NaCl. В определенных вариантах осуществления раствор дополнительно содержит один или несколько из следующих компонентов: буферы, например, ацетатный, цитратный, гистидиновый, сукцинатный, фосфатный, бикарбонатный и гидроксиметиламинометановый (Tris); поверхностно-активные вещества, например полисорбат 80 (Tween 80), полисорбат 20 (Tween 20), полисорбат и полоксамер 188; полиолы/дисахариды/полисахариды, например глюкозу, декстрозу, маннозу, маннит, сорбит, сахарозу, трегалозу и декстран 40; аминокислоты, например гистидин, глицин или аргинин; антиоксиданты, например аскорбиновую кислоту, метионин; и хелатирующие средства, например EGTA или EGTA. В определенных вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению транспортируют/хранят в лиофилизированном виде и восстанавливают перед введением. В определенных вариантах осуществления лиофилизированные составы на основе антител содержат объемобразующее средство, такое как маннит, сорбит, сахароза, трегалоза и декстран 40. В определенном варианте осуществления антитела к LIF по настоящему изобретению можно транспортировать и хранить в виде концентрированного исходного раствора, подлежащего разбавлению в месте использования для лечения. В определенных вариантах осуществления исходный раствор содержит приблизительно 25 мМ гистидина, приблизительно 6% сахарозы, приблизительно 0,01% полисорбата и приблизительно 20 мг/мл антитела к LIF. В определенных вариантах осуществления показатель pH раствора составляет приблизительно 6,0. В определенных вариантах осуществления состав, вводимый индивидууму, представляет собой водный раствор, содержащий приблизительно 25 мМ гистидина, приблизительно 6% сахарозы, приблизительно 0,01% полисорбата 80 и приблизительно 20 мг/мл антитела h5D8. В определенных вариантах осуществления показатель pH раствора составляет приблизительно 6,0.

Антитело h5D8, описанное в данном документе, может быть включено в набор, содержащий флакон, заполненный стерильным раствором, содержащим антитело h5D8 в концентрации приблизительно 20 мг/мл, приблизительно 25 мМ гистидина, приблизительно 6% сахарозы и приблизительно 0,01% полисорбата 80. Флакон может представлять собой одноразовый стеклянный флакон. Одноразовый стеклянный флакон может быть заполнен приблизительно 10 миллилитрами антитела h5D8 в концентрации приблизительно 20 мг/мл, приблизительно 25 мМ гистидина, приблизительно 6% сахарозы и приблизительно 0,01% полисорбата 80. В определенных вариантах осуществления показатель pH раствора составляет приблизительно 6,0. Антитело h5D8, описанное в данном документе, может быть включено в набор, содержащий флакон, заполненный лиофилизированной композицией, содержащей антитело h5D8, которое при восстановлении в соответствующем количестве стерильного разбавителя дает концентрацию, составляющую приблизительно 20 мг/мл антитела h5D8, приблизительно 25 мМ гистидина, приблизительно 6% сахарозы и приблизительно 0,01% полисорбата 80. Флакон может представлять собой одноразовый стеклянный флакон. Антитела, описанные в данном документе, можно вводить, или получать, или разбавлять для введения различными способами в зависимости от уровня дозировки, который в конечном итоге должен быть доставлен пациенту. Это можно осуществлять, например, для оптимизации фармацевтических свойств дозировки для пациента, например для уменьшения количества взвешенных частиц. h5D8 можно приготовить в концентрации приблизительно 8 мг/мл независимо от конечной дозы, доставляемой пациенту. В определенных вариантах осуществления h5D8 можно приготовить в концентрации, составляющей не более приблизительно 10, 9, 8, 7, 6, 5 или 4 мг/мл. В определенных вариантах осуществления h5D8 можно приготовить в концентрации, составляющей более приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 мг/мл.

Примеры

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

Пример 1. Получение крысиных антител, специфических к LIF.

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

Пример 2. Получение мышинных антител, специфических к LIF.

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

Пример 3. Гуманизация крысиных антител, специфических к LIF.

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

Таблица 1. Сводные данные по гуманизации 5D8

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

Характеристики экспрессии трансфицированных клеток сравнивали в колбах Эрленмейера (посев 3×10^5 клеток/мл, объем культуры 200 мл) в ходе культивирования с подпиткой после 10 дней культиви-

рования клеток. На данном этапе клетки собирали и секретируемое антитело очищали с использованием колонки с белком А, а затем определяли количественно. Наблюдали экспрессию всех гуманизированных антител за исключением тех, которые содержали тяжелую цепь H3. Вариабельные области H2 и L2 показали хорошие результаты по сравнению с другими вариабельными областями (SEQ ID NO: 42 и SEQ ID NO: 46).

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

Затем антитела, которые проявляли ингибирование LIF-индуцированного фосфорилирования STAT3, анализировали посредством SPR для определения аффинности связывания. Вкратце, связывание гуманизированных антител А (H0L0), С (H1L2), D (H1L3) и G (H2L2), H (H2L3) и O (H4L2) со связанным по аминокислотной группе hLIF выявляли в анализе с использованием прибора Biacore™ 2002. Кинетические константы и показатели аффинности определяли путем математической аппроксимации сенсограмм (модель взаимодействия Ленгмюра [$A + B = AB$]) среди всех сенсограмм, полученных на всех поверхностях сенсорного чипа при шести концентрациях лиганда. Для расчета кинетических констант и показателей аффинности использовали кривые наилучшей аппроксимации (минимальное значение χ^2) для каждой концентрации (См. табл. 1). Поскольку в экспериментальной модели в качестве аналитов использовали двухвалентные антитела, сенсограммы с наилучшей аппроксимацией также анализировали на основе модели аппроксимации двухвалентного аналита [$A + B = AB$; $AB + B = AB_2$], чтобы получить более подробное представление о механизме связывания мишени гуманизированными антителами. Анализ кинетических сенсограмм с использованием модели аппроксимации двухвалентного аналита [$A + B = AB$; $AB + B = AB_2$] подтвердил ранжирование образцов mAb по относительной аффинности. Гуманизированное 5D8, содержащее H2 и L2, выбрали для более детального анализа из-за его высокой аффинности связывания и высокого выхода из периодической культуры.

Пример 4. Гуманизация клона 5D8 улучшает связывание с LIF.

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

Материалы и способы

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

зателей аффинности использовали кривые наилучшей аппроксимации (минимальное значение Chi^2) для каждой концентрации. Сводные данные по этим экспериментам для определения аффинности показаны в табл. 2 (человеческий LIF, полученный в *E. coli*) и табл. 3 (человеческий LIF, полученный в клетках НЕК 293).

Таблица 2. Улучшенное связывание 5D8 после гуманизации

	K _D [пМ]	
	Аппроксимация сенсограммы по Ленгмюру 1:1	Аппроксимация двухвалентного аналита
hLIF (<i>E. coli</i>)		
Мышиное антитело 1B2	400±210	1500±200
r5D8 (крысиное)	130±30	780±130
h5D8 (гуманизированное)	26±14	82±25

Таблица 3. Улучшенное связывание 5D8 после гуманизации

	K _D [пМ]	
	Аппроксимация сенсограммы по Ленгмюру 1:1	Аппроксимация двухвалентного аналита
hLIF (НЕК 293)		
Мышиное антитело 1B2	320±150	3900±900
r5D8 (крысиное)	135±100	410±360
h5D8 (гуманизированное)	13±6	63±30

Модель аппроксимации сенсограммы Ленгмюра 1:1 из этой серии экспериментов показывает, что гуманизированное антитело 5D8 (h5D8) связывалось с человеческим LIF с аффинностью, которая в ~ 10-25 раз больше, чем аффинность у мышиного 1B2 и r5D8. Затем антитело h5D8 тестировали с LIF нескольких видов с использованием SPR. Кинетику связывания h5D8 по SPR проверяли для рекомбинантных аналитов LIF, полученных от разных видов и систем экспрессии: человеческий LIF (*E. coli*, клетки НЕК293); мышинный LIF (клетки *E. coli*, CHO); крысиный LIF (*E. coli*); LIF макака-крабоеда (дрожжи, клетки НЕК293).

Материалы и способы

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

Таблица 4. Широкая видовая реактивность гуманизованного 5D8

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

Пример 5. Гуманизованный клон 5D8 ингибирует LIF-индуцированное фосфорилирование STAT3 *in vitro*.

Чтобы определить биологическую активность h5D8, гуманизованные и исходные версии тестировали на модели клеточной культуры активации LIF. На фиг. 2А показано, что гуманизованный клон проявлял повышенный уровень ингибирования фосфорилирования STAT3 (Туг 705), если клеточную линию глиомы инкубировали с человеческим LIF. На фиг. 2В показан эксперимент с той же моделью, что и на фиг. 2А, повторенный с разными разведениями антитела h5D8.

Способы

Клетки глиомы U251 высевали в 6-луночные планшеты при плотности 150000 клеток/луночка. Клетки культивировали в полной среде в течение 24 ч перед любой обработкой. После этого клетки обрабатывали в течение ночи путем инкубации с антителом r5D8 к LIF или антителом h5D8 к LIF в концентрации 10 мкг/мл или не обрабатывали (контрольные клетки).

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

Пример 6. Значение IC_{50} при обработке антителом h5D8 на эндогенные уровни LIF в клетках U-251

Авторы настоящего изобретения также определили, что для биологического ингибирования h5D8 в условиях сывороточного голодания в клетках U-251 IC_{50} составляет всего 490 пикомоль/л (фиг. 3А). См. репрезентативные результаты на фиг. 3А и 3В и в табл. 5.

Таблица 5

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

Способы

Клетки U-251 высевали из расчета 600000 клеток на 6-сантиметровую чашку (на одно условие). Клетки обрабатывали с использованием h5D8 в соответствующей концентрации (титре) в течение ночи при температуре 37°C в условиях сывороточного голодания (0,1% FBS). В качестве положительного контроля для pSTAT3 использовали рекомбинантный LIF (R&D №7734-LF/CF) для стимуляции клеток при 1,79 нМ в течение 10 мин при 37°C. В качестве отрицательного контроля для pSTAT3 использовали ин-

гибитор JAK I (Calbiochem №420099) при 1 мкМ в течение 30 мин при 37°C. Затем клетки собирали на льду для получения лизатов в соответствии с протоколами наборов Meso Scale Discovery Multi-Spot Assay System Total STAT3 (№ по кат. K150SND-2) и Phospho-STAT3 (Tyr705) (№ по кат. K150SVD-2) для измерения уровней белка, определяемых с помощью MSD Meso Sector S600.

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

Идентифицировали другие клоны крысиного антитела (10G7 и 6B5), которые специфически связывают человеческий LIF, и сводные данные по их характеристикам связывания приведены ниже в табл. 6, клон 1B2 служил в качестве образца сравнения.

Способы

Кинетический анализ связывания в режиме реального времени выполняли для mAb 1B2, 10G7 и 6B5 к LIF, иммобилизованных на поверхности оптических сенсорных чипов CM5, с применением рекомбинантных белков-мишеней LIF [человеческий LIF (*E. coli*); Millipore № по кат. LIF 1010 и человеческий LIF (клетки HEK293); ACRO Biosystems № по кат. LIF-H521b] в качестве аналитов.

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

Таблица 6. Показатели аффинности дополнительных антител к LIF

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

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

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

Способы

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

Пример 9. LIF высоко сверхэкспрессируется при нескольких типах опухолей

Проводили иммуногистохимический анализ нескольких типах опухолей человека для определения степени экспрессии LIF. Как показано на фиг. 5, LIF характеризуется высоким уровнем экспрессии при мультиформной глиобластоме (GBM), мелкоклеточном раке легкого (NSCLC), раке яичника и колоректальном раке (CRC).

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

Для определения способности гуманизированного клона 5D8 ингибировать LIF-положительный рак *in vivo* данное антитело тестировали в мышинной модели мелкоклеточной карциномы легкого (NSCLC). На фиг. 6 показано уменьшение роста опухоли у мышей, обработанных данным антителом, по сравнению с отрицательным контролем в виде среды-носителя.

Способы

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

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

В ортотопической модели опухоли GBM с использованием линии клеток U251 человека, экспрессирующих люциферазу, r5D8 значительно уменьшал объемы опухоли у мышей, которым вводили 300 мкг r5D8 и h5D8 путем интраперитонеальной (и/п) инъекции два раза в неделю. Результаты данного исследования показаны на фиг. 7А (количественное определение на 26 день после обработки). Данный эксперимент также проводили с использованием мышей, которых обрабатывали с использованием 200 мкг или 300 мкг гуманизированного h5D8, и результаты показали статистически значимое уменьшение опухоли через 7 дней обработки.

Способы

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

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

Вес тела и объем опухоли:

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

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

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

Эффективность r5D8 оценивали в двух других сингенных моделях опухоли. В ортотопической модели опухоли яичника ID8 антитело r5D8 при и/п введении 300 мкг два раза в неделю значительно подавляло рост опухоли, что измеряли по объему брюшной полости (фиг. 8А и 8В). Результаты на фиг. 8С показывают, что антитело h5D8 также уменьшало объем опухоли в дозе 200 мкг и выше.

Способы

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

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

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

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

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

Способы

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

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

300 мкг r5D8 или контроль в виде среды-носителя вводили мышам посредством интраперитонеальной (и/п) инъекции два раза в неделю, начиная с дня 3 после имплантации клеток CT26.

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

Пример 14. r5D8 уменьшает воспалительную инфильтрацию в моделях опухолей.

В ортотопической модели GBM U251 экспрессия CCL22, маркера M2-поляризованных макрофагов, была значительно снижена в опухолях, обработанных r5D8, что показано на фиг. 10А. Данный результат также подтвердили на физиологически релевантной модели органотипической культуры срезов ткани с применением r5D8, в которой три образца от пациентов продемонстрировали значительное снижение экспрессии CCL22 и CD206 (MRC1) (также маркера макрофагов M2) после обработки, что показано на фиг. 10В (сравните MRC1 и CCL22 в верхнем ряду, контроле, и в нижнем, с обработкой). Кроме того, r5D8 также уменьшает количество CCL22⁺ макрофагов M2 в сингенных опухолях ID8 (фиг. 10С) и CT26 (фиг. 10D) у иммунокомпетентных мышей.

Пример 15. r5D8 увеличивает количество немиелоидных эффекторных клеток.

Чтобы исследовать дополнительные иммунные механизмы, оценивали влияние r5D8 на Т-клетки и другие немиелоидные эффекторные иммунные клетки в микроокружении опухоли. В сингенной модели ортотопической опухоли ID8 яичника обработка с использованием r5D8 приводила к увеличению количества внутриопухолевых NK-клеток и увеличению общего количества и количества активированных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, что показано на фиг. 11А. Аналогично в сингенной модели опухоли CT26 толстой кишки антитело r5D8 увеличивало количество внутриопухолевых NK-клеток, увеличивало количество CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток и имело тенденцию к снижению количества CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Т-регуляторных клеток, что показано на фиг. 11В. Тенденцию к уменьшению количества CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Т-регуляторных клеток также наблюдали в сингенной модели ортотопической опухоли KLN205 после обработки с использованием r5D8, что показано на фиг. 11С. В соответствии с требованием наличия Т-клеток для опосредования эффективности истощение CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток в модели CT26 ингибировало противоопухолевую эффективность r5D8, что показано на фиг. 12.

Способы истощения Т-клеток

Клетки CT26 культивировали в культуральной среде RPMI (Gibco, Invitrogen), дополненной 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS [Gibco, Invitrogen]), 40 ед./мл пенициллина и 40 мкг/мл стрептомицина (PenStrep [Gibco, Invitrogen]) и 0,25 мкг/мл плазмочицина (Invivogen). Клетки CT26 (5×10^5) собирали, промывали PBS, центрифугировали при 400g в течение 5 мин и ресуспендировали в 100 мкл PBS. Клетки хранили на льду для избежания гибели клеток. Клетки CT26 вводили мышам в оба бока путем подкожной инъекции с использованием шприца 27G. Мышам два раза в неделю вводили r5D8 интраперитонеально, как указано в дизайне исследования. Контроль в виде среды-носителя (PBS), крысиное r5D8 и/или антитело к CD4 и антитело к CD8 вводили мышам посредством интраперитонеальной инъекции два раза

в неделю, как указано в дизайне исследования. Все виды обработок антителами использовали одновременно. Пример 16. Кристаллическая структура h5D8 в комплексе с человеческим LIF Кристаллическую структуру h5D8 расшифровали с разрешением 3,1 ангстрем, чтобы определить эпитоп на LIF, с которым связывалось h5D8, и определить остатки h5D8, которые участвуют в связывании. Структура сокристалла показала, что N-концевая петля LIF расположена в центре между переменными областями легкой и тяжелой цепей h5D8 (фиг. 13А). Кроме того, h5D8 взаимодействует с остатками спирали А и С LIF, образуя прерывистый конформационный эпитоп. Связывание обусловлено несколькими солевыми мостиками, Н-связями и ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями (табл. 7, фиг. 13В). Эпитоп h5D8 на LIF охватывает область взаимодействия с gp130. См. Boulanger, M.J., Bankovich, A.J., Kortemme, T., Baker, D. & Garcia, K.C. Convergent mechanisms for recognition of divergent cytokines by the shared signaling receptor gp130. *Molecular cell* 12, 577-589 (2003). Результаты обобщены ниже в табл. 7 и изображены на фиг. 13.

Таблица 7. Сводные данные по рентгеновской кристаллической структуре h5D8

в комплексе с человеческим LIF

Остаток LIF (эпитоп)	Тип взаимодействия	Остаток h5D8 (паратоп, нумерация согласно Кабаты)
Ala13	VDW	L-Tyr49, L-Asn53
Ile14-O	HB	L-Ser50-OG
Ile	VDW	L-His30, L-Tyr32, L-Tyr49, L-Ser50
		H-Trp97
Arg15-NE	SB	L-Glu55-OE1, L-Glu55-OE2
Arg15-NH1	SB	L-Glu55-OE1, L-Glu55-OE2
Arg15-NH2	SB	L-Glu55-OE1, L-Glu55-OE2
Arg15-O	HB	L-Asn34-ND2
Arg15	VDW	L-Asn34, L-Leu46, L-Tyr49, L-Glu55, L-Ser56
		H-Glu96, H-Trp97, H-Asp98, H-Leu99, H-Asp101
His16-NE2	SB	H-Asp101-OD2
His16	VDW	L-Tyr32, L-Asn34, L-Met89
		H-Trp95, H-Glu96, H-Trp97, H-Asp101
Pro17	VDW	L-Tyr32, L-Ala91

		H-Trp97
Cys18	VDW	L-Tyr32
		H-Trp33, H-Trp97
His19-NE2	SB	H-Glu96-OE1, H-Glu96-OE2
His19	VDW	H-His31, H-Trp33, H-Glu96
Asn20-OD1	HB	H-Lys52-NZ
Asn20-ND2	HB	H-Asp53-OD1
Asn20	VDW	H-Trp33, H-Lys52, H-Asp53
Gln25-NE2	HB	H-Asp53-OD2
Gln25	VDW	H-His31, H-Ser52C, H-Asp53
Gln29	VDW	H-His31
Gln32	VDW	H-Lys52B
Asp120-OD2	HB	H-Ser30-OG
Asp120	VDW	H-Thr28, H-Ser30
Arg123-NE	HB	H-Thr28-OG
Arg123	VDW	H-Thr28
Gly124	VDW	H-His31
Leu125	VDW	H-His31
Ser127-OG	HB	H-Asp98-OD2
Ser127-O	HB	H-Trp97-NE1
Ser127	VDW	H-His31, H-Trp97, H-Asp98
Asn128-OD1	HB	H-His31-NE2
Asn128	VDW	H-His31
Leu130	VDW	H-Trp97
Cys131	VDW	H-Trp97
Cys134	VDW	H-Trp97
Ser135-O	HB	L-His30-NE2
Ser135	VDW	L-His30
His138	VDW	L-His30
VDW , ван-дер-ваальсовы силы, низкоэнергетическая связь; HB , водородная связь (средняя энергетическая связь); SB , солевой мостик (высокоэнергетическая связь)		

Способы

LIF временно экспрессировали в клетках НЕК 293S (Gnt I^{-/-}), и его очищали с использованием аффинной хроматографии Ni-NTA с последующей гель-фильтрационной хроматографией в 20 mM Tris, pH 8,0 и 150 mM NaCl. Рекombинантный Fab h5D8 временно экспрессировали в клетках НЕК 293F, и его очищали с использованием аффинной хроматографии CaptaSelect с последующей катионообменной хроматографией. Очищенные Fab h5D8 и LIF смешивали при молярном соотношении 1:2,5 и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин перед дегликозилированием с использованием EndoH. Затем для очистки комплекса использовали гель-фильтрационную хроматографию. Комплекс концентрировали до 20 мг/мл и подготавливали для испытаний по кристаллизации с использованием скрининговых тестов с разреженными матрицами. Кристаллы образовались при 4°C в условиях, предусматривающих 19% (объем/объем) изопропанола, 19% (вес/объем) PEG 4000, 5% (объем/объем) глицерина, 0,095 M цитрата натрия, pH 5,6. Кристалл дифрагировал с разрешением 3,1 Å на канале излучения 08ID-1 синхротрона Canadian Light Source (CLS). Данные собирали, обрабатывали и масштабировали с помощью XDS согласно Kabsch et al. Xds. Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography 66, 125-132 (2010). Структуры определяли путем молекулярного замещения с применением Phaser согласно McCoy et al. Phaser crystallographic software. J Appl Crystallogr 40, 658-674 (2007). Выполнили несколько итераций построения и уточнения модели с использованием Coot и phenix.refine до тех пор, пока структуры не приблизились к приемлемым R_{work} и R_{free}. См. Emsley et al. Features and development of Coot. Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography 66, 486-501 (2010) и Adams et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography 66, 213-221 (2010) соответственно. Фигуры строили в PyMOL (система молекулярной графики PyMOL, версия 2.0, Schrödinger, LLC).

Пример 17. h5D8 характеризуется высокой специфичностью к LIF

Авторы настоящего изобретения попытались протестировать связывание h5D8 с другими представителями семейства LIF для определения специфичности связывания. При использовании анализа Octet96 связывание h5D8 с человеческим LIF примерно в 100 раз больше, чем связывание с LIF, представителем семейства IL-6 с наивысшей гомологией, онкостатином M (OSM), когда оба белка продуцируются в *E. coli*. Если оба белка продуцируются в системе млекопитающего, h5D8 не проявляет связывание с OSM.

Данные обобщены в табл. 8.

Таблица 8. Сводные данные по показателям аффинности h5D8 в отношении цитокинов, определенным с использованием анализа Octet

	KD [M]		kon [1/M c]		kdis [1/c]	
h5D8 + huLIF (<i>E. coli</i>)	4,3E-10	+/- 2,0E-11	3,1E+05	+/- 3,1E+03	1,3E-04	+/- 5,8E-06
h5D8 + huLIF (из системы млекопитающего)	1,3E-09	+/- 7,2E-11	1,2E+05	+/- 1,3E+03	1,5E-04	+/- 8,5E-06
h5D8 + huOSM (<i>E. coli</i>)	3,6E-08	+/- 1,4E-09	8,5E+04	+/- 3,1E+03	3,1E-03	+/- 4,1E-05
h5D8 + huOSM (из системы млекопитающего)	C.	o.	C.	o.	C.	o.
h5D8 + huIL-6 (<i>E. coli</i>)	C.	o.	C.	o.	C.	o.

C. o. = связывание отсутствует

Способы

Эксперименты по связыванию с использованием Octet: реагенты использовали и готовили в соответствии с инструкциями производителя. Эксперимент по определению базовых кинетических параметров проводили с использованием программного обеспечения Octet Data Acquisition версии 9.0.0.26 следующим образом: Настройка сенсоров/программы: i) уравнивание (60 с); ii) загрузка (15 с); iii) исходный уровень (60 с); iv) связывание (180 с) и v) диссоциация (600 с) Аффинность h5D8 к цитокинам согласно Octet: эксперимент по определению базовых кинетических параметров проводили с использованием программного обеспечения Octet Data Acquisition версии 9.0.0.26 следующим образом: биосенсоры Amine Reactive 2nd Generation Biosensors (AR2G) гидратировали в воде в течение не менее 15 мин. Конъюгацию по аминокислоте h5D8 с биосенсорами проводили в соответствии с техническим примечанием ForteBio Technical Note 26 (см. ссылки) с использованием набора Amine Coupling Second Generation Kit. Стадии погружения выполняли при 30°C, 1000 об./мин. следующим образом: i) 60 с уравнивания в воде; ii) 300 с активации в 20 мМ ECD, 10 мМ сульфо-NHS в воде; iii) 600 с иммобилизации 10 мкг/мл h5D8 в 10 мМ ацетате натрия, pH 6,0; iv) 300 с гашения в 1 М этанолаmine, pH 8,5; v) 120 с на исходном уровне в воде. Затем проводили эксперименты по определению кинетических параметров со следующими стадиями погружения и считывания при 30°C, 1000 об./мин; vi) 60 с на исходном уровне в 1X кинетическом буфере; vii) 180 с связывания соответствующих серийных разведений цитокина в 1X кинетическом буфере; viii) 300 с диссоциации в 1X кинетическом буфере; ix) три цикла регенерации/нейтрализации с чередованием 10 мМ глицина, pH 2,0 и 1X кинетического буфера соответственно (5 с в каждом для 3 циклов). После регенерации биосенсоры повторно использовали для последующих анализов связывания. Рекомбинантный человеческий LIF, продуцируемый в клетках млекопитающих, получили от ACROBiosystems (LIF-H521b); рекомбинантный человеческий OSM, продуцируемый в клетках млекопитающих, получили от R & D (8475-OM/CF); и рекомбинантный человеческий OSM, продуцируемый в клетках *E. coli*, получили от R & D (295-OM-050/CF).

Пример 18. Кристаллическая структура fab h5D8.

Определили пять кристаллических структур Fab h5D8 в широком спектре химических условий. Высокие разрешения данных структур указывают на то, что конформации остатков CDR связаны с незначительной гибкостью и очень похожи в различных химических средах. Уникальной особенностью данного антитела является присутствие неканонического цистеина в положении 100 варибельной области тяжелой цепи. Структурный анализ показывает, что цистеин является непарным и в значительной степени недоступен для растворителя.

Fab H5D8 получали посредством расщепления его IgG папаином с последующей очисткой с использованием стандартных методик аффинной, ионообменной и эксклюзионной хроматографии. Кристаллы получали с использованием методов диффузии из паровой фазы, и они позволили определить

пять кристаллических структур с разрешением от 1,65 до 2,0 Å. Все структуры расшифровали и отнесли к одной и той же кристаллографической пространственной группе и с аналогичными размерами элементарной ячейки (P212121, $a \sim 53,8$ Å, $b \sim 66,5$ Å, $c \sim 143,3$ Å) несмотря на условия кристаллизации в диапазоне пяти различных уровней pH: 5,6, 6,0, 6,5, 7,5 и 8,5. Таким образом, эти кристаллические структуры позволяют сравнивать трехмерное расположение Fab h5D8 без препятствий из-за артефактов упаковки кристаллов и в широком спектре химических условий.

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

Способы

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

Очищенный Fab h5D8 концентрировали до 25 мг/мл, используя концентратор 10K MWCO (Millipore). Дозатор Oryx 4 (Douglas Instruments) использовали для модели экспериментов по кристаллизации с диффузией в паровой фазе с коммерческими скрининговыми тестами с разреженными матрицами с 96 условиями JCSG TOP96 (реагенты Rigaku) и MCSG-1 (Anatrace) при температуре 20°C. Кристаллы получали и собирали через четыре дня в следующих пяти условиях кристаллизации: 1) 0,085 М цитрата натрия, 25,5% (вес./об.) PEG 4000, 0,17 М ацетата аммония, 15% (об./об.) глицерина, pH 5,6; 2) 0,1 М MES, 20% (вес./об.) PEG 6000, 1 М хлорида лития, pH 6,0; 3) 0,1 М MES, 20% (вес./об.) PEG 4000, 0,6 М хлорида натрия, pH 6,5; 4) 0,085 М HEPES натрия, 17% (вес./об.) PEG 4000, 8,5% (об./об.) 2-пропанола, 15% (об./об.) глицерина, pH 7,5; и 5) 0,08 М Tris, 24% (вес./об.) PEG 4000, 0,16 М хлорида магния, 20% (об./об.) глицерина, pH 8,5. Перед мгновенным замораживанием в жидком азоте к маточным растворам, содержащим кристаллы, добавляли 5-15% (об./об.) глицерина или 10% (об./об.) этиленгликоля при необходимости. Кристаллы подвергались рентгеновскому синхротронному излучению на канале 23-ID-D синхротрона Advanced Photon Source (Чикаго, Иллинойс, США) и дифрактограммы регистрировали на детекторе Pilatus3 6M. Данные обрабатывали с использованием XDS, а структуры определяли путем молекулярного замещения с использованием Phaser. Уточнение проводили в PHENIX с итеративным построением модели в Coot. Фигуры строили в PyMOL. Все программное обеспечение было доступно в SGrid. Пример 19. Мутации цистеина 100 в h5D8 сохраняют связывание. Анализ h5D8 выявил свободный остаток цистеина в положении 100 (C100) в варибельной области тяжелой цепи. Варианты H5D8 получали путем замены C100 каждой природной аминокислотой для определения характеристик связывания с и аффинности к человеческим и мышинным LIF. Связывание характеризовали посредством ELISA и анализа Octet. Результаты обобщены в табл. 9. Кривые EC₅₀ для ELISA показаны на фиг. 15 (фиг. 15A, человеческий LIF, и фиг. 15B, мышинный LIF).

Таблица 9. Сводные данные по показателям аффинности, определенным посредством анализа Octet, и показателям EC₅₀, определенным посредством ELISA

Мутация	Аффинность/ <i>k_D</i> (М)		EC ₅₀ связывания (нМ)	
	Человеческий LIF	Мышиный LIF	Человеческий LIF	Мышиный LIF
C100	<1,0E-12 ± 2,252E-11	9,946E-11 ± 8,272E-12	0,09878	0,1605
C100S	8,311E-10 ± 5,886E-11	2,793E-09 ± 5,925E-11	н.д.	н.д.
C100Q	3,87E-09 ± 1,55E-10	2,84E-09 ± 4,85E-11	10,18	26,33
C100N	5,59E-09 ± 1,01E-10	6,68E-09 ± 9,8E-11	13,18	45,87
C100E	2,67E-09 ± 4,64E-11	4,1E-09 ± 7,56E-11	7,179	25,3
C100D	2,02E-09 ± 8,08E-11	6,49E-09 ± 7,16E-11	11,89	22,88
C100T	4,36E-10 ± 2,1E-11	1,02E-09 ± 1,77E-11	5,575	8,753
C100G	2,49E-09 ± 4,2E-11	3,33E-09 ± 5,42E-11	21,94	40,17
C100P	2,74E-10 ± 2,97E-10	<1,0E-12 ± 7,64E-10	34,44	101,9
C100A	<1,0E-12 ± 2,713E-11	<1,0E-12 ± 1,512E-11	0,6705	0,9532
C100V	<1,0E-12 ± 1,805E-11	<1,0E-12 ± 8,086E-12	0,2785	0,3647
C100L	<1,0E-12 ± 1,963E-11	1,998E-10 ± 1,055E-11	0,454	0,547
C100I	<1,0E-12 ± 1,424E-11	3,361E-11 ± 7,545E-12	0,299	0,3916
C100M	1,155E-09 ± 3,400E-11	2,676E-09 ± 2,449E-11	0,7852	1,563
C100F	4,376E-09 ± 1,127E-10	1,147E-08 ± 9,099E-11	8,932	21,53
C100Y	1,444E-08 ± 1,159E-09	2,514E-08 ± 2,047E-09	н.д.	н.д.
C100W	2,508E-08 ± 7,036E-09	4,819E-08 ± 4,388E-09	н.д.	н.д.
C100H	1,304E-10 ± 1,416E-10	4,284E-09 ± 1,231E-10	8,254	н.д.
C100K	7,477E-08 ± 1,581E-09	6,053E-08 ± 2,589E-09	н.д.	н.д.
C100R	1,455E-07 ± 6,964E-09	5,142E-08 ± 3,247E-09	н.д.	н.д.

Способы

ELISA: связывание вариантов C100 h5D8 с человеческим и мышиным LIF определяли посредством ELISA. Рекомбинантный человеческий или мышиный белок LIF вносили в 384-луночные планшеты Maxisorp в концентрации 1 мкг/мл и оставляли на ночь при 4°C. Планшеты блокировали с использованием 1х блокирующего буфера в течение 2 ч при комнатной температуре. Добавляли титры каждого варианта h5D8 C100 и давали возможность связаться в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты трижды промывали с использованием PBS+0,05% Tween-20. Добавляли конъюгированные с HRP антигена к IgG человека и давали возможность связываться в течение 30 мин при комнатной температуре. Планшеты трижды промывали с использованием PBS+0,05% Tween-20 и проявляли с использованием 1х субстрата TMB. Реакцию останавливали с помощью 1 М HCl и измеряли оптическую плотность при 450 нм. Построение фигур и нелинейный регрессионный анализ выполняли с помощью Graphpad Prism. Octet RED96: аффинность вариантов C100 h5D8 к человеческому и мышиному LIF определяли по BLI с использованием системы Octet RED96. Варианты C100 h5D8 загружали на биосенсоры к Fc человека в концентрации 7,5 мкг/мл после 30-секундного выдерживания на исходном уровне в 1х кинетическом буфере. Титры человеческого или мышиного белка LIF связывали с загруженными биосенсорами в течение 90 с и давали им возможность диссоциировать в 1х кинетическом буфере в течение 300 с. KD рассчитывали с помощью программного обеспечения для анализа данных с использованием глобальной модели аппроксимации 1:1.

Пример 20. h5D8 блокирует связывание LIF с gp130 in vitro.

Чтобы определить, предотвращает ли h5D8 связывание LIF с LIFR, провели анализ молекулярного связывания с использованием платформы Octet RED 96. H5D8 загружали на биосенсоры АНС путем захвата антителом к Fc человека. Затем биосенсоры погружали в LIF и, как и предполагали, наблюдали связывание (фиг. 16А, средняя треть). Впоследствии биосенсоры погружали в различные концентрации LIFR. Наблюдали дозозависимое связывание (фиг. 16А, правая треть). Контрольный эксперимент продемонстрировал, что данное связывание было LIF-специфичным (не показано) и не было следствием неспецифического взаимодействия LIFR с h5D8 или с биосенсорами. Чтобы дополнительно охарактеризовать связывание h5D8 и LIF, провели серию экспериментов по связыванию с помощью ELISA. H5D8 и LIF предварительно инкубировали и затем вносили в планшеты, покрытые либо рекомбинантным человеческим (hLIFR), либо gp130. Отсутствие связывания между комплексом h5D8/LIF и покрывающим субстратом может указывать на то, что h5D8 каким-то образом нарушает связывание LIF с рецептором. Кроме того, также использовали контрольные антитела, которые либо не связывают LIF (изотипический контроль, обозначен (-)), либо связывают LIF в известных сайтах связывания (B09 не конкурирует ни с

gp130, ни с LIFR за связывание LIF; r5D8 является крысиной исходной версией h5D8). Результаты ELISA продемонстрировали, что комплекс h5D8/LIF был способен связывать hLIFR (как и комплекс r5D8/LIF), указывая на то, что эти антитела не препятствовали связыванию LIF/LIFR (фиг. 16A). И наоборот, комплекс h5D8/LIF (и комплекс r5D8/LIF) не был способен связывать рекомбинантный gp130 человека (фиг. 16B). Это указывает на то, что сайт связывания gp130 на LIF затрагивается, если LIF связан с h5D8. Пример 21.

Экспрессия LIF и LIFR в тканях человека

Проводили количественную ПЦР в режиме реального времени со множеством разных типов тканей человека, чтобы определить уровни экспрессии LIF и LIFR. Средние уровни экспрессии, показанные на фиг. 17A и 17B, представлены в копиях на 100 нг общего количества РНК. Большинство тканей экспресировали не менее 100 копий на 100 нг общего количества РНК. Экспрессия мРНК LIF являлась наиболее высокой в жировой ткани человека (брыжейке подвздошной кишки [1]), ткани кровеносных сосудов (хориоидном сплетении [6] и брыжеечных сосудах [8]) и ткани пуповины [68]; и наиболее низкой в тканях головного мозга (коре [20] и черной субстанции [28]). Экспрессия мРНК LIFR являлась наиболее высокой в жировой ткани человека (брыжейке подвздошной кишки [1]), ткани кровеносных сосудов (легочных сосудах [9]), ткани мозга [11-28] и ткани щитовидной железы [66]; и наиболее низкой в РВМС [31]. Уровни экспрессии мРНК LIF и LIFR в тканях макака-крабоеда были подобны уровням, наблюдаемым в тканях человека, где экспрессия LIF была высокой в жировой ткани, и экспрессия LIFR была высокой в жировой ткани и низкой в РВМС (данные не показаны). Нумерация тканей на фиг. 17A и фиг. 17B является следующей: 1 - жировая ткань (брыжейка подвздошной кишки); 2 - надпочечник; 3 - мочевого пузыря; 4 - мочевого пузыря (треугольник); 5 - кровеносный сосуд (мозговой: средняя мозговая артерия); 6 - кровеносный сосуд (хориоидное сплетение); 7 - кровеносный сосуд (коронарная артерия); 8 - кровеносный сосуд (брыжеечный (толстая кишка)); 9 - кровеносный сосуд (легочный); 10 - кровеносный сосуд (почечный); 11 - головной мозг (миндалины); 12 - головной мозг (хвостатое ядро); 13 - головной мозг (мозжечок); 14 - головной мозг (кора: передняя поясная извилина); 15 - головной мозг (кора: задняя поясная извилина); 16 - головной мозг (кора: латеральная лобная область); 17 - головной мозг (кора: медиальная лобная область); 18 - головной мозг (кора: затылочная область); 19 - головной мозг (кора: теменная область); 20 - головной мозг (кора: височная область); 21 - мозг (дорсальное ядро шва); 22 - головной мозг (гиппокамп); 23 - головной мозг (гипоталамус: передний); 24 - головной мозг (гипоталамус: задний); 25 - головной мозг (голубое пятно); 26 - головной мозг (продолговатый мозг); 27 - головной мозг (прилежащее ядро); 28 - головной мозг (черная субстанция); 29 - молочная железа; 30 - слепая кишка; 31 - мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС); 32 - ободочная кишка; 33 - ганглии задних корешков (DRG); 34 - двенадцатиперстная кишка; 35 - фаллопиева труба; 36 - желчный пузырь; 37 - сердце (левое предсердие); 38 - сердце (левый желудочек); 39 - подвздошная кишка; 40 - тощая кишка; 41 - почка (кора); 42 - почка (мозговое вещество); 43 - почка (лоханка); 44 - печень (паренхима); 45 - печень (бронх: первичный); 46 - печень (бронх: третичный); 47 - легкое (паренхима); 48 - лимфатический узел (миндалины); 49 - мышца (скелетная); 50 - пищевод; 51 - яичник; 52 - поджелудочная железа; 53 - шишковидная железа; 54 - гипофиз; 55 - плацента; 56 - предстательная железа; 57 - прямая кишка; 58 - кожа (крайняя плоть); 59 - спинной мозг; 60 - селезенка (паренхима); 61 - желудок (антральный отдел); 62 - желудок (тело); 63 - желудок (дно); 64 - желудок (пилорический канал); 65 - яичко; 66 - щитовидная железа; 67 - трахея; 68 - пуповина; 69 - мочеточник; 70 - матка (шейка); 71 - матка (миометрий); 72 - семявыводящий проток.

Пример 22. Выбор дозы, поэтапное увеличение доз и введение фиксированных доз.

Ниже описаны выбор дозы антитела к LIF, поэтапное увеличение доз и введение фиксированных доз. Для оценки безопасности h5D8 применяли мышей и макаков-крабоедов.

Никаких побочных эффектов, связанных с лечением, не наблюдали в 4-недельных исследованиях токсичности по стандарту GLP на мышах и обезьянах, которые еженедельно получали в/в дозу, составляющую не более 100 мг/кг. Таким образом, наиболее высокая неопасная токсическая доза (HNSTD) составляет > 100 мг/кг, а уровень отсутствия наблюдаемых побочных эффектов (NOAEL) был установлен равным 100 мг/кг в/в для обоих видов в условиях исследований. Дозировку масштабировали для установления эквивалентной дозы для человека (HED). Для оценки HED был адаптирован подход масштабирования на основе площади поверхности тела (BSA). На основании этих токсикологических исследований по стандарту GLP рассчитывали максимальную рекомендуемую начальную дозу (MRSD) так, как показано ниже:

- 0,81 мг/кг в/в HED от мышиноного NOAEL с 10-кратным коэффициентом безопасности;
- >10 мг/кг в/в на основании 1/10 опасной токсической дозы у мышей;
- 3,2 мг/кг HED в/в от NOAEL макака-крабоеда с 10-кратным коэффициентом безопасности;
- > 16,7 мг/кг в/в на основе 1/6 HNSTD.

Исходя из результатов токсикологических исследований и при использовании консервативного подхода к популяции пациентов с распространенным раком в исследовании фазы 1, с помощью этих данных была подтверждена MRSD, составляющая 1 мг/кг (или фиксированная доза 75 мг) в/в.

Также при установлении MRSD была учтена фармакологически активная доза (PAD). Исходя из фармакологических, PK данных и данных по стабилизации уровня LIF на фармакологических мышинных моделях, доступных на сегодняшний день, для оценки PAD применяли следующий подход. Исходя из зависимости ответа от дозы в мышинной модели ксенотрансплантата U251, в качестве оптимальной эффективной дозы приняли дозу приблизительно 300 мкг и/п два раза в неделю; этот уровень дозы был связан с минимальным уровнем в сыворотке крови перед последней дозой, составлявшим приблизительно 230 мкг/мл. Было получено доказательство того, что максимальная стабилизация уровней LIF в сыворотке крови в данной модели достигалась при этой дозе 300 мкг, что также подтверждалось данными по стабилизации уровня LIF в сыворотке крови в исследовании токсичности по стандарту GLP у мышей при дозах 10, 30 и 100 мг/кг. С применением PK модели, основанной на 2-компарментной модели, экстраполированной к PK данным от обезьян и масштабированной для людей, было установлено, что клиническая доза 1500 мг каждые 3 недели будет обеспечивать значение $C_{\text{минимальная}}$, составляющее приблизительно 500 мкг/мл. Аналогично, минимальная эффективная доза 20 мкг дважды в неделю в этой мышинной модели ксенотрансплантата U251 была связана с минимальным уровнем в сыворотке крови перед последней дозой, составлявшим приблизительно 20 мкг/мл; было получено доказательство того, что при этой дозе 20 мкг достигалось лишь приблизительно 50% максимальной стабилизации уровня LIF в сыворотке крови, что подтверждалось свидетельством минимальной стабилизации уровня LIF при дозе 0,5 мг/кг в/в в исследовании PK-переносимости на мышах. Клиническая доза 75 мг каждые 3 недели будет обеспечивать значение $C_{\text{минимальная}}$, составляющее приблизительно 25 мкг/мл. Дополнительные PK-PD данные (стабилизация уровня LIF), доступные от мышинных сингенных моделей, подтверждали PAD, полученную в мышинной модели ксенотрансплантата U251.

Таким образом, на основании как токсикологических данных у мышей и обезьян, так и данных минимальной эффективной дозы в мышинной модели ксенотрансплантата, в качестве подходящей принимали начальную дозу, составляющую 75 мг в/в. Максимальная клиническая доза, составляющая от 1500 до 2000 мг, была подтверждена токсикологическими данными. Подход с введением фиксированных доз являлся подходящим, исходя из наблюдений линейной PK у животных моделей в сочетании с отсутствием неблагоприятных результатов, связанных с исследуемым препаратом.

Пример 23. Исследование фазы 1 повышения дозы и увеличения дозы для h5D8.

Для установления профиля безопасности и надлежащей дозы h5D8 при монотерапии против различных видов рака начинали клиническое исследование фазы 1. Первичные цели заключались в следующем: 1) оценить безопасность и переносимость h5D8 у пациентов с распространенными солидными опухолями; 2) определить рекомендуемую дозу для монотерапии h5D8; и 3) оценить предварительную противоопухолевую активность h5D8, измеренную по общей частоте ответа (ORR), согласно критериям RECIST 1.1. Вторичные цели заключались в следующем: охарактеризовать PK и иммуногенность h5D8; и 2) оценить параметры эффективности у пациентов с распространенными солидными опухолями, в том числе частоту контроля заболевания (DCR) и дожитие без прогрессирования (PFS) с помощью RECIST 1.1. Исследовательские цели заключались в следующем: а) изучить взаимосвязь между фармакокинетикой, фармакодинамикой и воздействием h5D8 с безопасностью пациента и противоопухолевой активностью; б) оценить, коррелирует ли высокая экспрессия LIF в опухоли с противоопухолевой активностью h5D8; в) охарактеризовать фармакодинамические эффекты h5D8 на периферии и в опухоли и д) охарактеризовать влияние лечения с использованием h5D8 на исследовательские биомаркеры. Исследование было спроектировано как открытое исследование фазы 1, и в него включали пациентов с распространенной солидной опухолью. Исследование проводили и проводят по схеме ускоренного подбора доз 3 + 3 с введением фиксированных доз h5D8, вводимых внутривенно раз в 3 недели (в когортах с дозами 75 мг, 225 мг, 750 мг, 1125 мг и 1500 мг).

Согласно схеме, противоопухолевый ответ оценивали с помощью руководства Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST - Критерии оценки ответа при солидных опухолях) 1.1. Согласно схеме, оценки осуществляли на исходном уровне и каждые 6 недель в течение первых 6 месяцев, а затем каждые 12 недель до подтверждения прогрессирования заболевания или исключения пациента из исследования. Согласно схеме, нежелательные явления ранжировали в соответствии с Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE - Общие критерии терминологии для нежелательных явлений) версии 4.03 и непрерывно оценивали во время исследования и в течение 30 дней после последнего курса лечения.

Были включены и получали дозу 41 пациент. Демографические данные пациентов показаны в табл. 10.

Таблица 10

Медианный возраст (диапазон)	64,5 (36-78)
Пол, N (%)	
Мужской	20 (50%)
Женский	20 (50%)
Раса, N (%)	
Европеоидная раса	33 (82,5%)
Негроидная	4 (10%)
Монголоидная	2 (5%)
Другая	1 (2,5%)
Тип опухоли, N (%)	
Поджелудочной железы	13 (31,7%)
Яичника	5 (12,2%)
Колоректальный	3 (7,3%)
Предстательной железы	3 (7,3%)
Аппендикса	2 (4,9%)
Холангиокарцинома	3 (4,9%)
Носоглотки	4 (4,9%)
NSCLC	5 (4,9%)
Прямой кишки	6 (4,9%)
Плоскоклеточная	7 (4,9%)
Аденокистозная карцинома (ACC)	1 (2,4%)
Меланома	1 (2,4%)
Метастатическая миксоидная липосаркома	1 (2,4%)
Параганглиома	1 (2,4%)
Рак матки	1 (2,4%)

Для испытания дозолимитирующие токсические эффекты (DLT) определяли как 1) эффекты, которые наблюдали в течение 21 дня после цикла 1, дня 1, по оценке главного эксперта по согласованию с комиссией по контролю данных (DRC), как возможно связанные с h5D8; 2) любое связанное с лекарственным средством нежелательное явление (AE) ≥ 3 степени. К DLT не относили AE с четким альтернативным объяснением и заранее определенные, самокупирующиеся AE 3 степени, в том числе: 1) усталость, тошнота, рвота или диарея, которые разрешаются до ≤ 2 степени в течение 72 ч при соответствующей медикаментозной терапии; 2) временные (продолжительностью ≤ 72 ч) биохимические отклонения 3 степени, которые считаются клинически незначительными; 3) нейтропения 3 степени продолжительностью ≤ 72 ч; 4) тромбоцитопения 3 степени без клинически значимого кровотечения. DRC может рассматривать в качестве DLT AE любой степени, связанное с лекарственным средством, которое задерживает начало цикла 2, день 1, на >14 дней. Сводные данные по безопасности для когорт 1-5 на сегодняшний день показаны в табл. 11.

Таблица 11. Сводные данные по безопасности

	Когорта 1	Когорта 2	Когорта 3	Когорта 4	Когорта 5	Всего
Количество субъектов с нежелательными явлениями (АЕ)	2 (N = 2)	1 (N = 1)	10 (N = 10)	8 (N=10)	6 (N = 11)	27 (79,4%) (N = 34)
Количество субъектов с АЕ ≥ 3 степени	2 (10)	0	6 (11)	1 (1)	1 (1)	10 (23) (29,4%)
Количество субъектов со связанными с h5D8 АЕ:						
SAE	8	0	8	0	2	18
Связанные с h5D8 SAE	0	0	0	0	0	0
Смертельные АЕ	1	0	1	0	0	2
Связанные с инфузией АЕ	0	1	1	0	0	2
DLT в течение C1 (21 день)	0	0	0	0	0	0
Отложенные DLT	0	0	0	0	0	0
АЕ, приводящие к прерыванию приема h5D8	0	0	1	1	0	2
АЕ, приводящие к досрочному завершению приема h5D8	0	0	1	0	0	1
АЕ, приводящие к изменению дозы h5D8	0	0	0	0	0	0

Ни при одной из доз не наблюдали дозозимитирующих токсических эффектов или проблем с переносимостью. В целом из данных видно, что h58 является безопасным и хорошо переносится во всех протестированных дозах.

Пример 24. Исследования отдельных случаев у пациентов, получавших лечение с помощью h5D8.

Субъектом 0106-002 была 68-летняя женщина европеоидной расы с раком поджелудочной железы IV стадии, прошедшая интенсивное предварительное лечение с помощью 4 линий предшествующей системной противораковой терапии против метастатического заболевания. У субъекта изначально была диагностирована аденокарцинома протока поджелудочной железы стадии II/III, от умеренной до слабо дифференцированной. Субъект проходила лечение неoadъювантным препаратом FLOFIRINOX в течение приблизительно 167 дней, и был достигнут частичный ответ. Субъект была подвергнута "радикальной" лапараскопической дистальной панкреатэктомии и спленэктомии с последующим введением вспомогательного препарата гемцитабина в течение приблизительно 7 месяцев, когда у субъекта развилось рецидивирующее прогрессирующее заболевание в ложе поджелудочной железы. Субъект проходила лечение гемцитабином и абраксаном в течение приблизительно 2 месяцев, при этом наилучший ответ представлял собой частичный ответ с последующим прогрессированием заболевания в ложе поджелудочной железы и перитонеальных лимфатических узлах. Затем субъект получала 5FU и онивид (липосомальный иринотекан) в течение приблизительно 2 недель, прием которых был прекращен из-за токсичности. В течение приблизительно 2 месяцев субъект проходила лечение экспериментальным ингибитором Wnt (компания Samumed), и у нее имело место прогрессирование заболевания со злокачественной лимфаденопатией выше и ниже диафрагмы. В течение приблизительно 4 месяцев субъект получала ингибитор метаболизма пиримидиновых нуклеозидов (Fujifilm), причем наилучшим ответом был частичный ответ. У субъекта по результатам лучевой диагностики было подтверждено прогрессирование, а также повышение уровня СА19-9, и ее включили в исследование h5D8. Результаты ее предшествующих курсов лечения до испытания h5D8 обобщены в табл. 13 (PR=частичный ответ; PD=прогрессирующее заболевание; SD=стабилизация заболевания).

Таблица 12

Паллиативная противораковая терапия	Продолжительность терапии до PD	Наилучший ответ	Уровень СА19-9 в начале лечения	Уровень СА19-9 при наилучшем ответе	Уровень СА19-9 при PD
Гемцитабин/абраксан	2 месяца	PR	63	UNK	97
Ингибитор Wnt	2 месяца	PD	1088	NA	4195
Ингибитор пиримидиновых нуклеозидов	4 месяца	PR	4195	1249	1658

Субъект получила свою первую дозу h5D8 в количестве 1125 мг, а самая последняя доза была на цикле 9 (C9) (1500 мг) приблизительно через 165 дней. На исходном уровне у субъекта не было клинически значимых отклонений лабораторных показателей от нормы; статус по Восточной объединенной онкологической группе США ("ECOG") = 1; повышенный уровень СА19-9, составлял 1658. В качестве целевых очагов были идентифицированы два лимфатических узла (один грудной и один брюшной), а абдоминальная лимфаденопатия была идентифицирована в качестве нецелевого очага. На цикле 3, день 1 ("C3D1"), ее статус по ECOG улучшился до 0, уровень СА19-9 упал до 1069, и общим ответом по RECIST была стабилизация заболевания. Традиционно уровень СА19-9 являлся надежным прогностическим маркером заболевания. По словам врача отпадала необходимость в применении оксикодона при болях в животе. Субъект получала цикл 6, и приблизительно через 2 недели потребность пациентки в анальгетиках увеличилась, а сама субъект была госпитализирован вдали от центра проведения испытания. В настоящее время субъект вернулась к исходному состоянию, необходимости в наркотической анальгезии два раза в день. Субъект прошла повторные сканирования, и по их результатам наблюдали стабилизацию заболевания. Уровень СА19-9 у нее увеличился в ходе цикла 5, но на цикле 9 вернулся к уровню ниже исходного и ниже начального снижения на цикле 3. Результаты показаны в табл. 13. У субъекта не наблюдали нежелательных явлений, обусловленных лечением.

Таблица 13

Опухолевые маркеры	Исходный уровень	C3	C5	C7	C9
Уровень СА 19-9 (ед./мл)	1658	1069	1224	1397	1045,8
Целевой очаг по RECIST	Исходный уровень	C3	C5	C7	C9
Грудная клетка	15 мм	17 мм	14 мм	14 мм	13 мм
Брюшная полость	19 мм	19 мм	20 мм	18 мм	15 мм
Сумма LD	34 мм	36 мм	34 мм	32 мм	28 мм
Нецелевой очаг					
Брюшная полость	Присутствует	He CR, не PD			
Новый очаг	NA	Нет	Нет	Нет	Нет
Общий ответ	NA	Стабилизация заболевания	Стабилизация заболевания	Стабилизация заболевания	Стабилизация заболевания

Субъектом 0102-001 была 78-летняя женщина европеоидной расы с лейомиосаркомой матки IV стадии, прошедшая предварительное лечение с помощью 6 линий системной противораковой терапии. У субъекта изначально была диагностирована лейомиосаркома матки T1B, и она прошла курс радикального TAH/BSO. Местный рецидив проявился приблизительно через 3 года после первоначального диагноза, для лечения которого была проведена хирургическая резекция; химиолучевая терапия была отклонена. Приблизительно через 2 года у субъекта повторно возник рецидив, и она прошла 4 курса лечения гемцитабином и доцетакселом с достижением смешанного ответа. Затем субъект получила 3 цикла доксила, при этом наилучший ответ представлял собой прогрессирующее заболевание. Затем последовали 2 месяца курса винорелбина при этом наилучший ответ представлял собой PD. Трабектидин вводили в течение приблизительно 4 месяцев со смешанным ответом и прекратили введение из-за его токсичности. Затем субъект проходила курс лечения с помощью DTIC в течение 4 месяцев с PD в качестве наилучшего

ответа. В результате прохождения курса лучевой терапии (XRT), применяемой к основным образованиям в области таза, пациент получила в общей сложности 3750 сГр за 10 порций в течение приблизительно 22 дней, а затем прошла курс вотриента в течение приблизительно 1 месяца с PD в качестве наилучшего ответа. Результаты ее предшествующих курсов лечения представлены в табл. 14.

Таблица 14

Паллиативная противораковая терапия	Продолжительность терапии до PD	Наилучший ответ
Гемцитабин/доцетаксел	3 месяца	Смешанный
Доксорубин	2 месяца	PD
Винорелбин	2 месяца	PD
Трабектидин	D/C при токсичности	Смешанный
DTIC	4 месяца	PD
Вотриент	2 месяца	PD

На исходном уровне у субъекта не было клинически значимых отклонений лабораторных показателей от нормы; ECOG=1 и повышенный уровень СА-125, составлял 13. Субъект получила свою первую дозу h5D8 в количестве 750 мг, и уровень СА-125 у нее снизился до 9 к моменту С3. При оценке на С5 уровень СА-125 у нее составлял 8, а общим ответом по RECIST была стабилизация заболевания.

Исходя из ее сканов на исходном уровне, в качестве целевых очагов были идентифицированы один (1) очаг в легких, 1 очаг в печени, 2 очага в прямых мышцах и 1 очаг в дугласовом пространстве, а очаг в брюшины был идентифицирован в качестве нецелевого очага. При оценке на С7 уровень СА-125 у нее составлял 9, и у субъекта был общий ответ по RECIST в виде стабилизации заболевания. Изображения с С7 3 целевых очагов и портов для предыдущей лучевой терапии показаны на фиг. 18А-С. И представленные выше результаты показаны в табл. 15.

Таблица 15

Опухолевые маркеры	Исходный уровень	С3	С5	С7	ЕОТ
Уровень СА-125 (ед./мл)	13	9	8	9	10
Целевой очаг по RECIST	Исходный уровень	С3	С5	С7	ЕОТ
Легкое	13,4 мм	17,7 мм	15,7 мм	20,0 мм	27,1 мм
Печень	14,9 мм	14,5 мм	17,7 мм	18,1 мм	22,6 мм
Прямая мышца, М №1	39,1 мм	37,6 мм	38,0 мм	37,8 мм	40,1 мм
Прямая мышца, М №2	31,9 мм	26,6 мм	22,7 мм	24,3 мм	28,5 мм
Дугласово пространство	36,9 мм	28,3 мм	24,9 мм	25,0 мм	25,0 мм
Сумма LD	136,2 мм	124,7 мм	119 мм	125,2 мм	143,3 мм
Нецелевой очаг					
Брюшинный узелок	Присутствует	Не CR/не PD	Не CR/не PD	Не CR/не PD	NE
Новый очаг	NA	Нет	Нет	Нет	Нет
Общий ответ	NA	Стабилизация заболевания	Стабилизация заболевания	Стабилизация заболевания	Прогрессирующее заболевание

Субъектом 0101-001 была 50-летняя женщина с KRAS+ колоректальной карциномой IV стадии, получающая системную противораковую терапию первой линии против метастатического заболевания. У субъекта изначально была диагностирована умеренно дифференцированная колоректальная аденокарцинома III стадии (T3N2M0). Субъект прошла радикальную роботизированную резекцию нижней передней части с последующим введением вспомогательных 5FU и FOLFOX в течение приблизительно 7 месяцев. Приблизительно через 2 года у субъекта возник рецидив в виде метастазов в легких, она выбрала выжидательную тактику ведения и не получала паллиативной системной терапии для лечения заболевания на IV стадии. Приблизительно через 1 год после рецидива метастазы в легких продолжали прогрессировать. Субъект отказалась от химиотерапии первой линии против mCRC и выбрала клиническое испытание h5D8 в качестве терапии первой линии.

Субъект получила свою первую дозу h5D8 в количестве 225 мг, а самая последняя ее доза была на С6 (750 мг) приблизительно через 4 месяца. На исходном уровне у субъекта не было клинически значимых отклонений лабораторных показателей от нормы; статус по ECOG = 0 и повышенный уровень опухолевого маркера (СЕА) составлял 11,8. В качестве целевых очагов были идентифицированы два (2) очага правой нижней доли легкого и были идентифицированы 2 нецелевых очага (яичника и кости). При оценке на С3 ответом была стабилизация заболевания, а СЕА поднялся до 11,8. При оценке на С5 у субъекта была стабилизация заболевания с последующим прогрессированием по результатам лучевой диагностики после лечения на С6. Результаты показаны в табл. 16.

Таблица 16

Опухолевые маркеры	Исходный уровень	С3	С5	ЕОТ
СЕА	10,5	11,8	17,9	20,1
Целевой очаг по RECIST	Исходный уровень	С3	С5	ЕОТ
Легкое, №1	12,8 мм	13,9 мм	15,7 мм	18,6 мм
Легкое, №2	11,7 мм	12,1 мм	12,7 мм	13,5 мм
Сумма LD	24,5 мм	26 мм	28,4 мм	32,1 мм
Нецелевой очаг				
Костная ткань	Присутствует	Не CR, не PD	Не CR, не PD	Не указано
Яичник	Присутствует	Не CR, не PD	Не CR, не PD	Не указано
Новый очаг	NA	Нет	Нет	Нет
Общий ответ	NA	Стабилизация заболевания	Стабилизация заболевания	Прогрессирующее заболевание

Субъектом 0106-005 была 75-летняя женщина европеоидной расы с карциномой фаллопиевой трубы. Субъект была подвергнута радикальной TАН BSO, иссечению LN и удалению опухолевой массы с последующим введением вспомогательного карбоплатина и таксола. Приблизительно через 5 лет у субъекта возник рецидив в виде злокачественной аденопатии, и она получала паллиативную лучевую терапию (55 сГр) на LN в точке бифуркации аорты. У субъекта имело место прогрессирование LN, и она получала паллиативную лучевую терапию (60 сГр) на периаортальные LN. У субъекта развивались метастазы в легких, и она проходила лечение экспериментальным ингибитором BET в течение приблизительно 1 месяца, которое было прекращено из-за токсичности, после чего она принимала экспериментальное антитело к PD-1 в течение приблизительно 4 месяцев, при этом наилучший ответ представлял собой стабилизацию заболевания. Затем субъект проходила лечение экспериментальным ингибитором TIGIT в течение приблизительно 200 дней, при этом наилучший ответ представлял собой стабилизацию заболевания. После прогрессирования субъект проходила лечение экспериментальным моноклональным антителом в течение приблизительно 4 месяцев, при этом наилучший ответ представлял собой стабилизацию заболевания. У субъекта было подтверждено прогрессирование, и ее включили в исследование h5D8. Результаты ее предшествующих курсов лечения представлены в табл. 17.

Таблица 17

Паллиативная противораковая терапия	Продолжительность терапии до PD	Наилучший ответ
Антитела к PDL-1	16 месяцев	SD
Ингибитор TIGIT	7 месяцев	SD
Ингибитор пиримидиновых нуклеозидов	4 месяца	SD

Субъект получила свою первую дозу h5D8 в количестве 750 мг; на С4, 2 месяца спустя, доза цикла h5D8 была увеличена до 1125 мг. Ее последняя доза (С6) была введена приблизительно через 44 дня после этого увеличения дозы. Приблизительно через 1 месяц после лечения у субъекта по результатам лучевой диагностики было прогрессирование, и она осуществила ее ЕОТ-визит. На исходном уровне у субъекта не было клинически значимых отклонений лабораторных показателей от нормы, а ее показатель по ECOG = 1.

У субъекта отсутствовала экспрессия опухолевых маркеров в крови. В качестве целевых очагов были выбраны два очага в легких (один в правой верхней доле и один в левом верхнем отверстии грудной клетки), множественные легочные узелки были выбраны в качестве нецелевых очагов. У субъекта не наблюдали нежелательных явлений, связанных с лечением. Результаты данных испытаний показаны в табл. 18.

Таблица 18

Целевой очаг	Исходный уровень	Цикл 3	Цикл 5	ЕОТ
RUL	20 мм	20 мм	22 мм	28 мм
Левое верхнее отверстие грудной клетки	36 мм	40 мм	41 мм	44 мм
Сумма LD	56 мм	60 мм	63 мм	72 мм
Нецелевой очаг				
Легочные узелки	Присутствует	Не CR, не PD	Не CR, не PD	Не CR, не PD
Новый очаг	NA	Нет	Нет	Нет
Общий ответ	NA	Стабилизация заболевания	Стабилизация заболевания	Прогрессирующее заболевание

Субъектом 0301-002 была 66-летняя женщина европеоидной расы, у которой был диагностирован рак яичника. Субъект проходила лечение неoadъювантным препаратом карбоплатином и таксолом с последующей радикальной гистерэктомией, BSO и оментэктомией приблизительно через 4 месяца и дополнительным карбоплатином/таксолом в течение дополнительных приблизительно 3 месяцев. Приблизительно через 8 месяцев у субъекта возник рецидив, и она получала паллиативную химиотерапию карбоплатином/таксолом в течение приблизительно 6 месяцев; о наилучшем ответе сведения отсутствуют. Приблизительно через 3 месяца после этой химиотерапии у субъекта по результатам лучевой диагностики имело место прогрессирование, и она проходила курс лечения доксорубицином в течение приблизительно 7 месяцев, при этом наилучший ответ представлял собой стабилизацию заболевания; приблизительно через 4 месяца у субъекта снова началось прогрессирование. Затем субъект получала единственное средство таксол в течение приблизительно 3 месяцев, при этом наилучший ответ представлял собой прогрессирующее заболевание. В течение приблизительно 6 месяцев субъект проходила лечение гемцитабином и карбоплатином, при этом наилучший ответ представлял собой стабилизацию заболевания. Приблизительно через 3 месяца после лечения у субъекта по результатам лучевой диагностики наблюдали прогрессирование, и ее включили в исследование h5D8. Результаты ее предшествующих курсов лечения представлены в табл. 19.

Таблица 19

Паллиативная противораковая терапия	Продолжительность терапии до PD	Наилучший ответ
Карбоплатин/таксол	9 месяцев	НЕИЗВЕСТНО
Доксорубицин	11 месяцев	SD
Таксол	2–3 месяца	PD
Карбоплатин/гемцитабин	5 месяцев	НЕ ПОДДАЕТСЯ ОЦЕНКЕ

Субъект получила свою первую дозу h5D8 в количестве 1500 мг. Ее самая последняя доза на C7 был приблизительно на 5 месяцев позже. На исходном уровне у субъекта не было клинически значимых отклонений лабораторных показателей от нормы, а ее показатель по ECOG = 0. На исходном уровне уровень СА-125 у нее составлял 412,3. В качестве целевых очагов были выбраны три очага (1 в имплантате в поджелудочной железе, 1 в мягкой ткани в подреберье и 1 в виде плевральных узлов) и были идентифицированы 3 нецелевых очага (в печени, в брюшине и забрюшинные лимфатические узлы). У субъекта не наблюдали нежелательных явлений, связанных с лечением. Результаты ее испытания показаны в табл. 20.

Таблица 20

Опухолевые маркеры	Исходный уровень	Цикл 3	Цикл 5	Цикл 7
Уровень СА 125	412,3	Не выполнено	1071,7	1613,6
Целевой очаг	Исходный уровень	Цикл 3	Цикл 5	Цикл 7
Правый плевральный узел	24 мм	25 мм	25 мм	26 мм
ST-масса в подреберной области	51 мм	52 мм	52 мм	61 мм
Имплатант в поджелудочной железе	32 мм	30 мм	32 мм	57 мм
Сумма LD	107 мм	107 мм	109 мм	144
Нецелевой очаг				
Сегмент V печени	Присутствует	Не CR, не PD	Не CR, не PD	Не CR, не PD
В брюшине	Присутствует	Не CR, не PD	Не CR, не PD	Не CR, не PD
Забрюшинные LN	Присутствует	Не CR, не PD	Не CR, не PD	Не CR, не PD
Новый очаг	NA	Нет	Нет	Нет
Общий ответ	NA	Стабилизация заболевания	Стабилизация заболевания	Прогрессирующее заболевание

Субъектом 0102-004 была 65-летняя женщина европеоидной расы, у которой был диагностирован рак головы и шеи. Субъект была подвергнута радикальной общей глоссэктомии с последующей вспомогательной лучевой терапией (6000 сГр) спустя один месяц. Приблизительно через 10 месяцев у субъекта возник рецидив в виде метастазов в легких, которые были подвергнуты облучению (5000 сГр) в ходе приблизительно 1-недельного курса. Через 8 месяцев после облучения наблюдали прогрессирование заболевания легких и новые метастазы в костях, и субъект проходила лечение ипилимумабом и ниволумабом в течение примерно 1 года и 45 дней, при этом наилучший ответ представлял собой стабилизацию заболевания. У субъекта по результатам лучевой диагностики имело место прогрессирование, и ее включили в исследование h5D8. Результаты ее предшествующего лечения представлены в табл. 21.

Таблица 21

Паллиативная противораковая терапия	Продолжительность терапии до PD	Наилучший ответ
Ипилимумаб/ниволумаб	13 месяцев	SD

Субъект получила свою первую дозу h5D8 в количестве 1500 мг, а самое последнее введение дозы на С7 было приблизительно через 155 дней. На исходном уровне у субъекта не было клинически значимых отклонений лабораторных показателей от нормы, а ее показатель по ECOG = 1. У субъекта отсутствовала экспрессия второстепенных опухолевых маркеров в сыворотке крови. В качестве целевых очагов были выбраны четыре очага (2 очага в легких и 2 очага в плевре) и два очага в костной ткани были идентифицированы в качестве нецелевых очагов. Результаты показаны в табл. 22.

Таблица 22

Целевой очаг	Исходный уровень	Цикл 3	Цикл 5	Цикл 7
RLL	37 мм	35,4 мм	36,3 мм	39,4 мм
RUL	37,8 мм	36,8 мм	37,2 мм	40,8 мм
Плевра	13,3 мм	13,6 мм	13,9 мм	14,3 мм
Плевра	37,3 мм	37,5 мм	38,4	38,6 мм
Сумма LD	125,4 мм	123,3 мм	125,8	133,1
Нецелевой очаг				
Костная ткань	Присутствует	Не CR, не PD	Не CR, не PD	Не CR, не PD
Костная ткань	Присутствует	Не CR, не PD	Не CR, не PD	Не CR, не PD
Новый очаг	NA	Нет	Нет	Нет
Общий ответ	NA	Стабилизация заболевания	Стабилизация заболевания	Стабилизация заболевания

Субъектом 0201-003 был 57-летний мужчина европеоидной расы, у которого была диагностирована миксоидная липосаркома. Субъект проходил лечение неoadъювантными препаратами адриамицином и ифосфамидом в течение приблизительно 4 месяцев и неoadъювантной лучевой терапией (5000 сГр) правой задней части голени в течение приблизительно 35 дней. Затем субъект был подвергнут радикальной широкой резекции правой задней части голени, иссечению правого заднего большеберцового нерва и подколенных, передних и задних большеберцовых и малоберцовых сосудов. У субъекта возник рецидив в виде заболевания плевры и злокачественной лимфаденопатии в грудной клетке. Субъект проходил лечение гемцитабином и таксотером в течение приблизительно 41 дня, при этом наилучший ответ представлял собой прогрессирующее заболевание. Затем субъект проходил лечение дакарбазином в течение 4 месяцев, при этом наилучший ответ представлял собой частичный ответ. Через 22 дня у субъекта по результатам лучевой диагностики имело место прогрессирование, и его включили в исследование h5D8. Результаты его предшествующих курсов лечения представлены в табл. 23.

Таблица 23

Паллиативная противораковая терапия	Продолжительность терапии до PD	Наилучший ответ
Гемцитабин/таксотер	1 месяц	PD
DTIC	4 месяца	PR

Субъект получил свою первую дозу h5D8 в количестве 1125 мг, а самая последняя его доза была (С6) (1500 мг) приблизительно через 136 дней. На исходном уровне у субъекта не было клинически значимых отклонений лабораторных показателей от нормы, а его показатель по ECOG составлял 1. У субъекта отсутствовали опухолевые маркеры периферической крови. В качестве целевых очагов были выбраны два плевральных опухолевых образования и были выбраны три нецелевых очага (1 плевральное опухолевое образование и 2 LN). Результаты показаны в табл. 24. У субъекта не наблюдали нежелательных явлений, связанных с лечением.

Таблица 24

Целевой очаг	Исходный уровень	Цикл 3	Цикл 5
Правое нижнее плевральное опухолевое образование	110 мм	106 мм	103 мм
Правое верхнее плевральное опухолевое образование	56 мм	61 мм	64 мм
Сумма LD	166 мм	167 мм	167 мм
Нецелевой очаг			
Правое плевральное опухолевое образование	Присутствует	Не CR, не PD	Не CR, не PD
Правый наддиафрагмальный LN	Присутствует	Не CR, не PD	Не CR, не PD
Правый паратрахеальный LN	Присутствует	Не CR, не PD	Не CR, не PD
Новый очаг	NA	Нет	Нет
Общий ответ	NA	Стабилизация заболевания	Стабилизация заболевания

Пример 25. Биомаркеры, указывающие на положительный ответ на лечение с использованием h5D8.

Субъектом 0201-003 был 57-летний мужчина европеоидной расы, у которого была диагностирована миелоидная липосаркома. Результаты его текущей схемы лечения представлены в табл. 23. При оценке субъекта на С5 лечения с использованием h5D8 через 12 недель не было показано увеличения по критериям RECIST его объемного метастатического очага в легких (167 мм) (См. табл. 24). Субъект проходит данную схему лечения (+14 недель), и наилучший зарегистрированный ответ представлял собой "стабилизацию заболевания". Из метастатического участка легкого собирали биоптат для определения биомаркеров для лечения с использованием h5D8. На момент забора биоптата у субъекта наблюдали признаки стабилизации уровня LIF в насыщенной состоянии. Стабилизация уровня LIF у субъекта 0201-003 показана на фиг. 19. В биоптате, взятом "во время лечения", наблюдали биомаркеры противоопухолевого иммунитета по сравнению с этапом до лечения с использованием h5D8. Результаты представлены на фиг. 20А-С. Из результатов видно увеличение инфильтрации CD8-положительных Т-клеток, а также увеличение популяций ассоциированных с опухолью макрофагов ("ТАМ"). См. фиг. 20А. Для клеток ТАМ был показан иммуностимулирующий фенотип (MHCII+). См. фиг. 20В. Также наблюдали уменьшение количества ядер pSTAT3+. См. фиг. 20С.

Субъектом 0301-003 была 47-летняя женщина с забрюшинной параганглиомой IV стадии. Результаты ее курсов лечения до лечения с использованием h5D8 представлены в табл. 25.

Таблица 25

Паллиативная противораковая терапия	Продолжительность терапии до PD	Наилучший ответ
Циклофосфамид/винкристин/дакарбазин	2 года	PR
Селективный ингибитор RET	5 месяцев	SD
Октреотид	4 месяца	SD

В результате ее оценки на С3 лечения с использованием h5D8 через 6 недель были показаны стабильные уровни СЕА (0,5 нг/мл) и "стабилизацию заболевания" по критериям RECIST для метастатических целевых очагов в легких и печени. Пациентка остается на данной схеме лечения (+11 недель), и наилучший зарегистрированный ответ представлял собой "стабилизацию заболевания". Из метастатического участка печени собирали биоптат для определения биомаркеров для лечения с использованием h5D8. На данный момент данные по стабилизации уровня LIF не обработаны. В биоптате, взятом "во время лечения", наблюдали биомаркеры противоопухолевого иммунитета по сравнению с этапом до лечения с использованием h5D8. Результаты представлены на фиг. 21А-С. Из результатов было видно увеличение инфильтрации CD8-положительных Т-клеток, см. фиг. 21А, и снижение поляризации ТАМ в сторону супрессивных фенотипов (CD163+; CD206+). См. фиг. 21В. Также наблюдали уменьшение количества ядер pSTAT+. См. фиг. 21С.

Субъектом 0301-004 был 74-летний мужчина с аденокарциномой поджелудочной железы IV стадии. Перед лечением с использованием h5D8 субъект прошел два курса лечения. Результаты его предшествующего лечения представлены в табл. 26.

Таблица 26

Паллиативная противораковая терапия	Продолжительность терапии до PD	Наилучший ответ
Гемцитабин-NAВ, паклитаксел	3 месяца	PR
FOLFOX	2 месяца	PD

У субъекта 0301-004 была очень агрессивная форма рака, которая фактически сразу давала отрицательный результат с двумя видами терапии первой линии, назначенными в момент возникновения опухоли, включая немедленное возникновение прогрессирующего состояния заболевания на FOLFOX. Субъект проходит данную схему лечения с использованием h5D8 (6 недель). Из метастатического участка печени собирали биоптат. На данный момент данные по стабилизации уровня LIF не обработаны. В биоптате, взятом "во время лечения", наблюдали биомаркеры противоопухолевого иммунитета по сравнению с этапом до лечения с использованием h5D8. Результаты показаны на фиг. 22. По результатам иммуногистохимического анализа субъекта характеризовали как LIF^{низкий}. Несмотря на быстрое прогрессирование заболевания при высокоагрессивной схеме химиотерапии, в микроокружении опухоли наблюдали увеличение популяций CD8+ Т-клеток (см. фиг. 22). Наблюдали умеренные эффекты в отношении популяций макрофагов (данные не показаны). И не наблюдали никаких отличий в ядрах pSTAT3+ (данные не показаны).

Субъектом 0201-004 был 66-летний мужчина, у которого была диагностирована меланома IV стадии. Субъекту до испытания h5D8 был назначен один курс лечения. Наилучший ответ не поддавался оценке, и результаты не показаны (ниволумаб; 4 месяца). Безуспешное лечение ниволумабом указывало на глубокое подавление иммунитета опухолью. Субъект проходит данную схему лечения (6 недель), и наилучший зарегистрированный ответ представлял собой "прогрессирующее заболевание". Из метастатического участка кожи собирали биоптат. На момент сбора биоптата у субъекта наблюдали, как правило, повышенный уровень LIF по результатам анализа стабилизации без признаков стабилизации уровня LIF в насыщенном состоянии. Результаты анализа стабилизации уровня LIF показаны на фиг. 23. В биоптате, взятом "во время лечения", наблюдали биомаркеры противоопухолевого иммунитета по сравнению с этапом до лечения с использованием h5D8. Результаты показаны на фиг. 24. По результатам иммуногистохимического анализа субъекта характеризовали как LIF^{высокий}. Анализ макрофагов был ограничен микроокружением опухоли (TME), и было показано незначительное изменение активности Т-клеток (данные не показаны). Наблюдали повышенную поляризацию фенотипов макрофагов к MHCII+ (см. фиг. 24). Предварительные результаты экспресс-обследования патологии свидетельствовали, что количество ядер pSTAT3+ уменьшалось в образце во время лечения.

Субъектом 0301-002 была 66-летняя женщина европеоидной расы, у которой был диагностирован рак яичника. Результаты ее текущей схемы лечения представлены в табл. 19. При оценке субъекта на С5 лечения с использованием h5D8 через 12 недель было показано увеличение уровня CA19-9 (с 412 до 1072 ед./мл), но ее целевые очаги не демонстрировали значимого увеличения по критериям RECIST (от 107 до 109 мм) (см. табл. 20). Субъект проходит данную схему лечения (+16 недель), и наилучший зарегистрированный ответ представлял собой "стабилизацию заболевания". Из метастатического участка лимфатического узла собирали биоптат для определения биомаркеров для лечения с использованием h5D8. На момент забора биоптата у субъекта наблюдали признаки стабилизации уровня LIF в насыщенном состоянии. Стабилизация уровня LIF у субъекта 0201-003 показана на фиг. 25. В биоптате, взятом "во время лечения", наблюдали биомаркеры противоопухолевого иммунитета по сравнению с этапом до лечения с использованием h5D8. Не было наблюдаемых изменений в опухолевых иммунологических биомаркерах (данные не показаны). По результатам иммуногистохимического анализа субъекта характеризовали как LIF^{низкий}.

Сводные данные приведенных выше результатов анализов для определения биомаркеров для эффективного лечения с использованием h5D8 представлены в табл. 27. По нескольким параметрам видны эффекты лечения с использованием h5D8, оказываемые в отношении усиления противоопухолевого иммунного ответа, модуляции TAM и опосредованной LIF передачи сигналов. (NC=без изменений; NE=эффект отсутствует).

Таблица 27

Тип опухоли	Участок биопсии	Доза (мг)	Статус	Инфильтрация CD8	Отклонение TAM	pSTAT3
Парагангиома	Печень	1125	+11 недель	+	- в M2	-
Миксоидная липосаркома	Легкое	1125	+14 недель	++	++ в M1	NC
Поджелудочной железы	Печень	1125	6 недель	+	NC	NC
Меланома	Кожа	1125	6 недель	-	+/-	-
Яичника	Лимфатический узел	1500	+16 недель	-	NE	NE

Пример 26. PK/PD показатели h5D8 у субъектов, которым вводили hD5.

Для определения фармакокинетики антитела h5D8 у людей в ходе исследования измеряли уровень h5D8 в сыворотке крови у проходивших лечение пациентов. Вкратце, количественное определение уровня антитела h5D8 в образцах сыворотки крови человека выполняли с помощью сэндвич-иммуноанализа. Антитело h5D8 в образцах сыворотки крови пациентов захватывали на планшетах MSD, покрытых rhLIF (рекомбинантным человеческим LIF), и его обнаружение осуществляли с помощью меченого сульфогруппой антитела к IgG человека (sulfo-anti-h5d8-Fab2-IgG). Сигнал от сульфогруппы измеряли с помощью ридера MSD S600 и количественно оценивали с применением стандартной кривой h5D8. Из результатов, показанных на фиг. 26, видно, что h5D8 характеризовалось стандартной фармакокинетикой с расчетным периодом полужизни приблизительно 17 дней. Кроме того, из результатов видно, что h5D8 характеризуется линейной PK в диапазоне доз 750-1500 мг раз в 3 недели, а насыщение опосредованного мишенью распределения лекарственного средства происходит при дозе, превышающей 225 мг.

Для определения, был ли целевой LIF связан с антителом h5D8, использовали ELISA-анализ с захватом для определения общих уровней LIF после лечения. Период полужизни LIF в плазме крови относительно короткой и увеличивается при связывании посредством h5D8, что приводит к увеличению уровней LIF в плазме крови. Таким образом, увеличение уровней LIF на периферии указывает на связывание мишени. На фиг. 27A-B показаны общие уровни LIF с течением времени у нескольких пациентов после получения в/в введения h5D8. В целом, из этих данных видно насыщение мишенями после трех циклов введения лекарственного средства при ненасыщающих уровнях доз (когорты 2-3) (см. фиг. 27B).

Общие уровни LIF в образцах сыворотки крови пациентов количественно оценивали с помощью сэндвич-иммуноанализа. Вкратце, на планшеты MSD наносили в виде пятна захватывающее антитело A4 (кроличье моноклональное) к LIF. После инкубации с образцами сыворотки крови пациентов связанный комплекс LIF/h5D8 обнаруживали с помощью меченого сульфогруппой антитела 7C3 PB001 к LIF. Сигналы от сульфогрупп измеряли с помощью ридера MSD S600, а уровни LIF/h5D8 в сыворотке крови пациентов количественно оценивали с применением стандартной кривой rhLIF/h5D8.

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

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

Последовательности

SEQ ID NO	Последовательность
1	GFTFSHAWMH
2	GFTFSHAW
3	HAWMH
4	QIKAKSDDYATYYAESVKG
5	IKAKSDDYAT
6	TCWEWDLDF
7	WEWDLDF
8	TSWEWDLDF
9	RSSQSLLDSHGHTYLN
10	QSLLDSHGHTY
11	SVSNLES
12	SVS
13	MQATHAPPYT
14	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAAS
15	QVQLQESGGGLVKPGGSLRSLCAAS
16	EVQLVESGGGVVQPGRSLRSLCAAS
17	EVQLMESGGGLVKPGGSLRSLCATS
18	WVRQAPGKGLEWVA
19	WVRQAPGKGLEWVG
20	RFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYC
21	RFSISRDNAKNSLYLQMNSLRVEDTVVYYC
22	RFTISRDDSKSTLFLQMNNLKTEDTAVYYC
23	WGQGTLLTVVSS
24	WGQGTMTVTVSS
25	WGQGTTVTVSS
26	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC
27	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISC
28	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC
29	DVVMTQSPLSQPVTLGQPASISC

30	WFQQRPGQSPRRLIY
31	WLQQRPGQPPRLIY
32	WLLQKPGQPPQLLIY
33	WLQQRPGQSPRRLIY
34	GVPDRFSGSGTDFTLKISRVEAEDVGLYYC
35	GVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGYYC
36	GVPNRFSGSGTDFTLKISRVEAEDVGLYYC
37	GVPDRFNGSGTDFTLISRVEAEDVGYYC
38	FGQGTKLEIK
39	FGGGTKVEIK
40	FGQGTKVEIK
41	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSHAWMHWRQAPGKGLEWVAQ IKAKSDDYATYYAESVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTCW EWDLDFWGQGLTVTVSS
42	QVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSHAWMHWRQAPGKGLEWVG QIKAKSDDYATYYAESVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTC WEWDLDFWGQGMVTVSS
43	EVQLVESGGGVVQPRSLRLSCAASGFTFSHAWMHWRQAPGKGLEWVAQ IKAKSDDYATYYAESVKGRFSISRDNKNSLYLQMNSLRVEDTVYYCTCW EWDLDFWGQGTTVTVSS
44	EVQLMESGGGLVKPGGSLRLSCATSGFTFSHAWMHWRQAPGKGLEWVGQ IKAKSDDYATYYAESVKGRFTISRDDSKSTLFLQMNNLKTEDTAVYYCTCW EWDLDFWGQGLTVTVSS
45	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLDSDGHTYLNWFQQRPGQSPRRLI YSVSNLESGVPDRFSGSGG TDFTLKISRVEAEDVGLYYCMQATHAPPYTFGQGTKLEIK
46	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLDSDGHTYLNWLQQRPGQPPRLIY SVSNLESGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGYYCMQATHAPPYTFGQ GTKLEIK
47	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLDSDGHTYLNWLLQKPGQPPQLLIY SVSNLESGVPNRFSGSGTDFTLKISRVEAEDVGLYYCMQATHAPPYTFGG GTKVEIK

48	DVVMTQSPLSQPVTLGQPASISCRSSQSLDSDGHTYLNWLQQRPGQSPRRLI YSVSNLESGVPDRFNGSGSGTDFTLISIRVEAEDVGVYYCMQATHAPPYTFG QGTKVEIK
49	MGWTLVFLFLLSVTAGVHSEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSHA WMHWVRQAPGKGLEWVAQIKAKSDDYATYYAESVKGRFTISRDDSKNTLY LQMNSLKTEDTAVYYCTCWEWDLDFWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQKSLS LSPGK
50	MGWTLVFLFLLSVTAGVHSQVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSHA WMHWVRQAPGKGLEWVGQIKAKSDDYATYYAESVKGRFTISRDDSKNTLY LQMNSLKTEDTAVYYCTCWEWDLDFWGQGMVTVSSASTKGPSVFPLAPSS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQKSLS LSPGK
51	MGWTLVFLFLLSVTAGVHSEVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAASGFTFSHA WMHWVRQAPGKGLEWVAQIKAKSDDYATYYAESVKGRFSISRDNKNSLY LQMNSLRVEDTVVYYCTCWEWDLDFWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNHYTQKSLS LSPGK

52	MGWTLVFLFLLSVTAGVHSEVQLMESGGGLVKPGGSLRLSCATSGFTFSHA WMHWVRQAPGKGLEWVGQIKAKSDDYATYYAESVKGRFTISRDDSKSTLF LQMNNLKTEDTAVYYCTCWEDLDFWQGTGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
53	MVSSAQFLGLLLLCFQGTRCDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLDSD GHTYLNWFQQRPGQSPRRLIYSVSNLESGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAE DVGLYYCMQATHAPPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLTK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
54	MVSSAQFLGLLLLCFQGTRCDIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLDSDG HTYLNWLQQRPGQPPRLLIYSVSNLESGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAED VGYYCMQATHAPPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLTKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
55	MVSSAQFLGLLLLCFQGTRCDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLDSDG HTYLNWLLQKPGQPQLLIYSVSNLESGVPNRFSGSGGTDFTLKISRVEAED VGLYYCMQATHAPPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLTKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
56	MVSSAQFLGLLLLCFQGTRCDVVMTQSPLSQPVTLGQPASISCRSSQSLDSD GHTYLNWLQQRPGQSPRRLIYSVSNLESGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAE DVGLYYCMQATHAPPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLTK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
57	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSAWMHWVRQAPGKGLEWVAQ IKAKSDDYATYYAESVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNLSLKTEDTAVYYCTCW EWDLDFWQGTGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE

	<p>PVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDDKVEPKSCDKTHCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
58	<p>QVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSHAWMHWRQAPGKGLEWVG QIKAKSDDYATYYAESVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTC WEWDLDFWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDDKVEPKSCDKTHCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
59	<p>EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSHAWMHWRQAPGKGLEWVAQ IKAKSDDYATYYAESVKGRFSISRDNNAKNSLYLQMNSLRVEDTVVYYCTCW EWDLDFWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDDKVEPKSCDKTHCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
60	<p>EVQLMESGGGLVKPGGSLRLSCATSGFTFSHAWMHWRQAPGKGLEWVGQ IKAKSDDYATYYAESVKGRFTISRDDSKSTLFLQMNNLKTEDTAVYYCTCW EWDLDFWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDDKVEPKSCDKTHCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>

61	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLDSDGHTYLNWFQQRPGQSPRRLI YSVSNLESGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGLYYCMQATHAPPYTFG QGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC
62	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLDSDGHTYLNWLQQRPGQPPRLIY SVSNLESGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQATHAPPYTFGQ GTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
63	DIVMTQTPLSLVTPGQPASISCRSSQSLDSDGHTYLNWLLQKPGQPQLLIY SVSNLESGVFNRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGLYYCMQATHAPPYTFGG GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
64	DVVMTQSPLSQPVTLGQPASISCRSSQSLDSDGHTYLNWLQQRPGQSPRRLI YSVSNLESGVPDRFSGSGGTDFTLSISRVEAEDVGVYYCMQATHAPPYTFG QGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC
65	ХОЛОСТАЯ ПРОБА
66	QVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSHAWMHVVRQAPGKGLEWVG QIKAKSDDYATYYAESVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCT <u>S</u> WEWDLDFWQGGMVTVSS
67	QVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSHAWMHVVRQAPGKGLEWVG QIKAKSDDYATYYAESVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCT <u>S</u> WEWDLDFWQGGMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGQVFVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
68	SPLPITPVNATCAIRHPCHNNLMNQIRSQLAQLNGSANALFILYYTAQGEPPF NNLDKLCGPNVDFPPFHANGTEKAKLVELYRIVVYLGTSLGNITRDQKILNP SALSLSKLNATADILRGLLSNVLCRLCSKYHVGHVDTVYGPDTSGKDVFQ KKKLGQCQLLGKYKQIIAVLAQAF

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения индивидуума, страдающего от рака, включающий введение индивидууму рекомбинантного антитела, которое специфически связывает лейкоз-ингибирующий фактор (LIF), содержащего:

- определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 2 (GFTFSHAW);
- определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 5 (IKAKSDDYAT);
- определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 6 (TCWEWDLDF);
- определяющую комплементарность область 1 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 10 (QSLDSDGHTY);
- определяющую комплементарность область 2 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 12 (SVS); и
- определяющую комплементарность область 3 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13 (MQATHAPPYT); и при этом рекомбинантное антитело вводят индивидууму в дозе приблизительно 1500 мг.

2. Способ по п.1, где рекомбинантное антитело является гуманизированным.

3. Способ по любому из пп.1 или 2, где рекомбинантное антитело содержит две тяжелые цепи им-

муноглобулина и две легкие цепи иммуноглобулина.

4. Способ по п.3, где рекомбинантное антитело представляет собой антитело IgG.

5. Способ по любому из пп.1-4, где рекомбинантное антитело представляет собой Fab, F(ab)₂ или одноцепочечный переменный фрагмент (scFv).

6. Способ по любому из пп.1-5, где рекомбинантное антитело специфически связывается с LIF с константой диссоциации (K_D), составляющей менее приблизительно 200 пикомоль/л, предпочтительно менее приблизительно 100 пикомоль/л.

7. Способ по любому из пп.1-6, где VH-CDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 1 (GFTFSHAWMH), где VH-CDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4 (QIKAKSDDYATYYAESVKG), где VH-CDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 6 (TCWEWDLDF), где VL-CDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 9 (RSSQSLDSDGHTYLN), где VL-CDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 11 (SVSNLES), и где VL-CDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13 (MQATHAPPYT).

8. Способ по любому из пп.1-7, где рекомбинантное антитело содержит последовательность VH, которая по меньшей мере приблизительно на 90% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 42; и где рекомбинантное антитело содержит последовательность VL, которая по меньшей мере приблизительно на 90% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46.

9. Способ по п.8, где последовательность VH идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 42; и последовательность VL идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 46.

10. Способ по любому из пп.1-9, где рак включает распространенную солидную опухоль, глиобластому, рак желудка, рак кожи, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичка, рак щитовидной железы, рак головы и шеи, рак печени, рак почки, рак пищевода, рак яичника, рак толстой кишки, рак легкого, лимфому или рак мягких тканей.

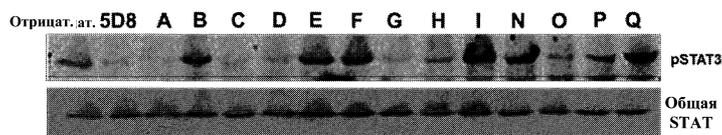
11. Способ по п.10, где рак включает немелкоклеточный рак легкого, эпителиальную карциному яичника или аденокарциному поджелудочной железы.

12. Способ по любому из пп.1-11, где рекомбинантное антитело вводят в качестве компонента фармацевтического состава, при этом фармацевтический состав содержит рекомбинантное антитело и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, носитель или разбавитель.

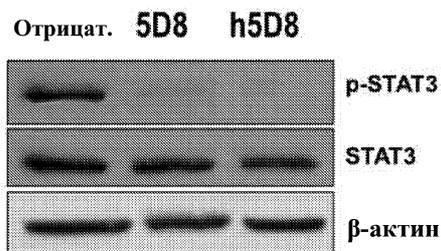
13. Способ по п.12, где фармацевтический состав характеризуется значением pH приблизительно 6,0 и содержит приблизительно 25 мМ гистидина, приблизительно 6% сахарозы и приблизительно 0,01% полисорбата 80, и при этом рекомбинантное антитело включено в концентрации приблизительно 20 мг/мл.

14. Способ по любому из пп.1-13, где рекомбинантное антитело вводят внутривенно приблизительно раз в неделю, приблизительно один раз в две недели или приблизительно один раз в три недели.

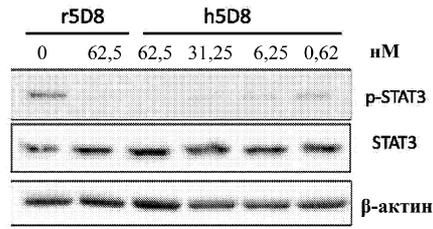
15. Способ по п.14, где рекомбинантное антитело вводят приблизительно один раз в три недели.



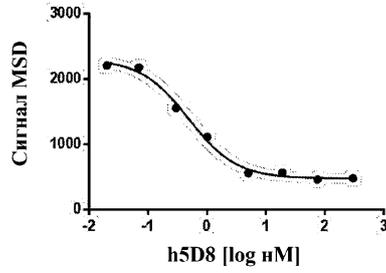
Фиг. 1



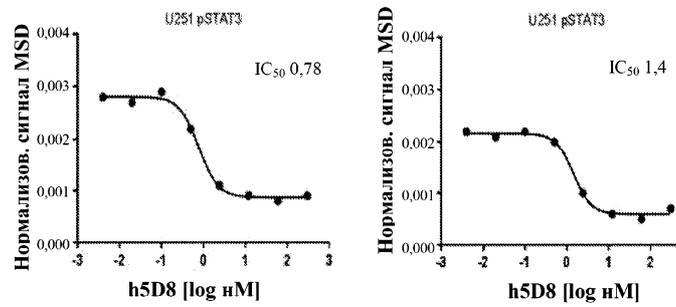
Фиг. 2А



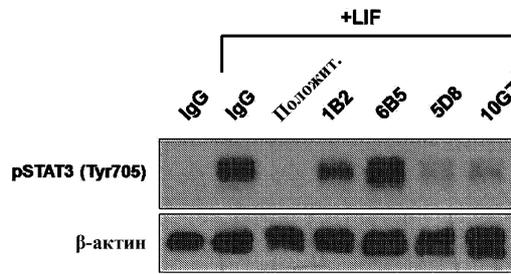
Фиг. 2В



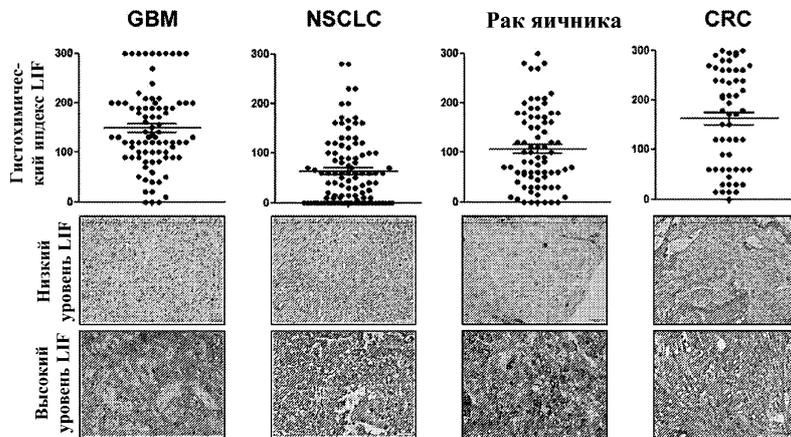
Фиг. 3А



Фиг. 3В

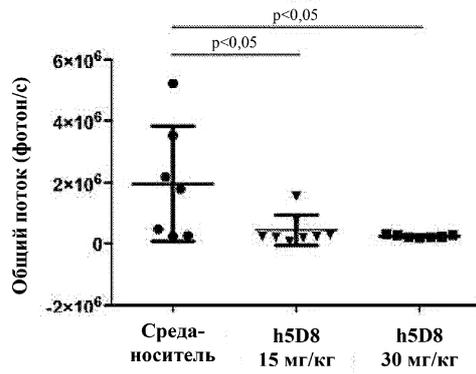


Фиг. 4

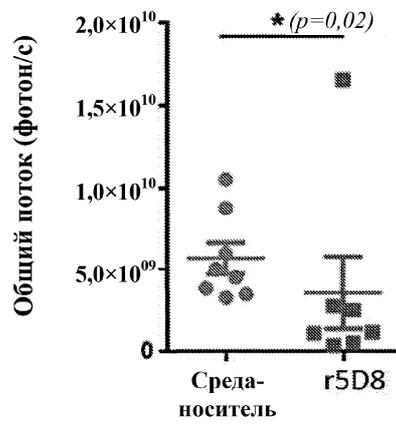


Фиг. 5

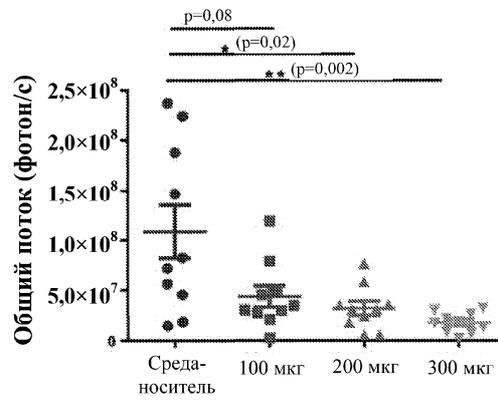
**Объем опухоли
(через 30 дней после оперативного
вмешательства)**



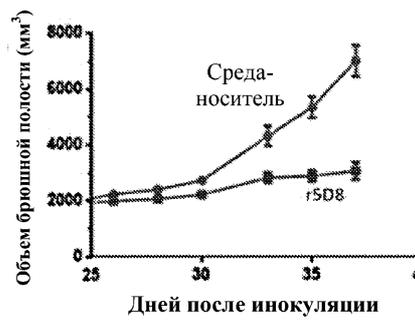
Фиг. 6



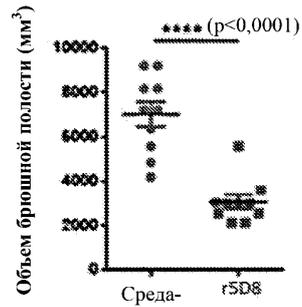
Фиг. 7А



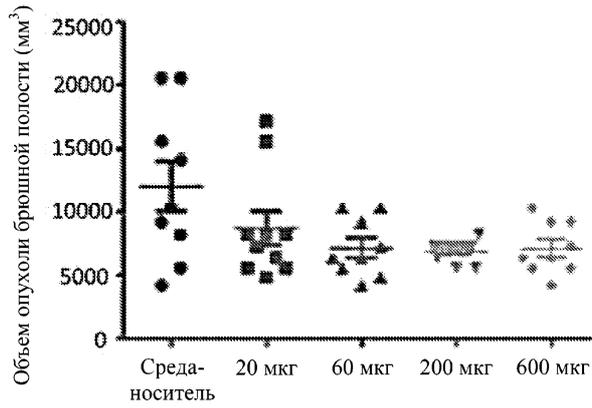
Фиг. 7В



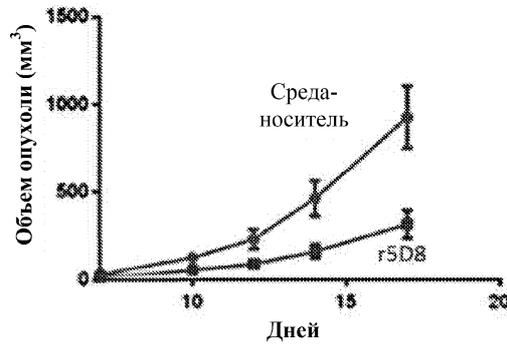
Фиг. 8А



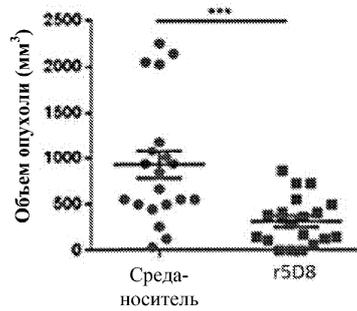
Фиг. 8В



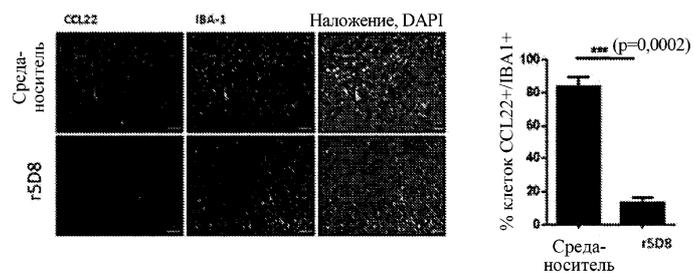
Фиг. 8С



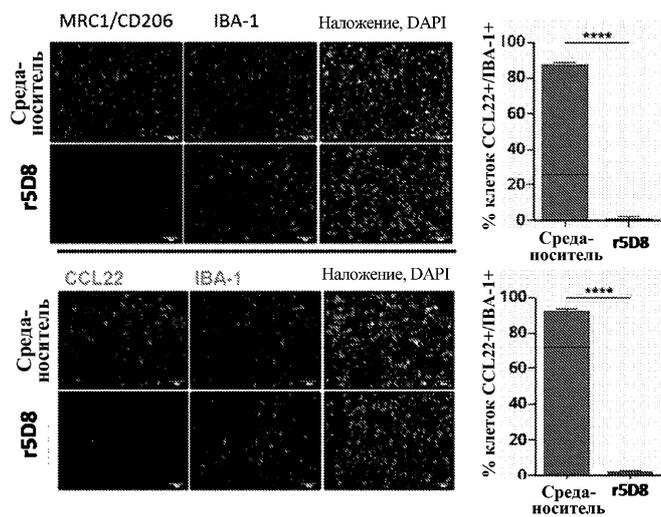
Фиг. 9А



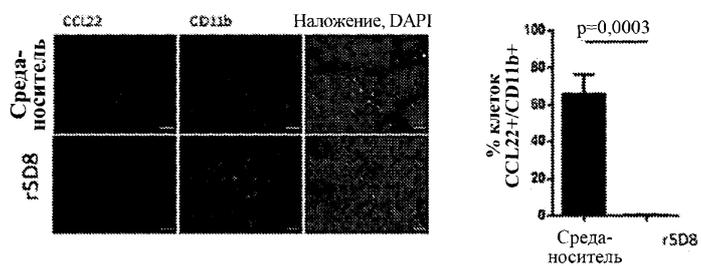
Фиг. 9В



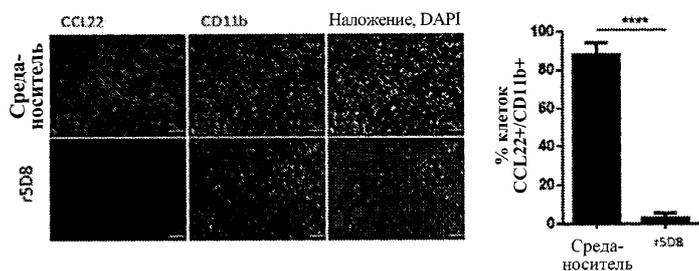
Фиг. 10А



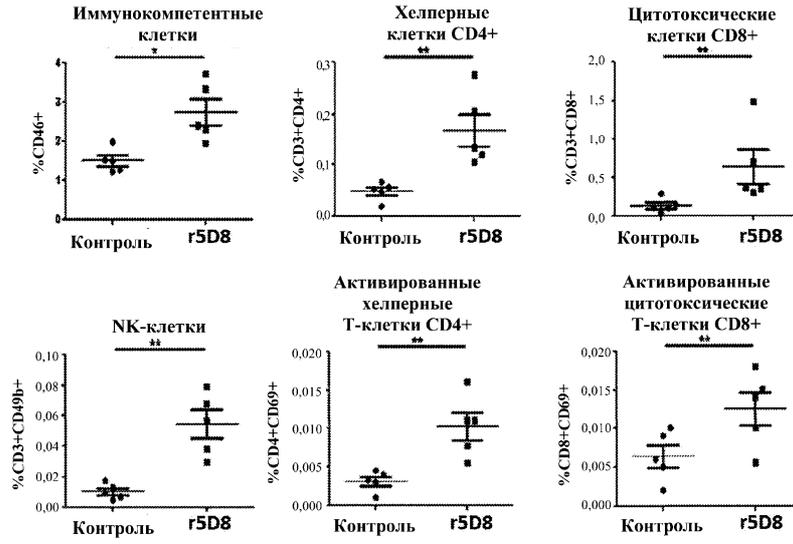
Фиг. 10В



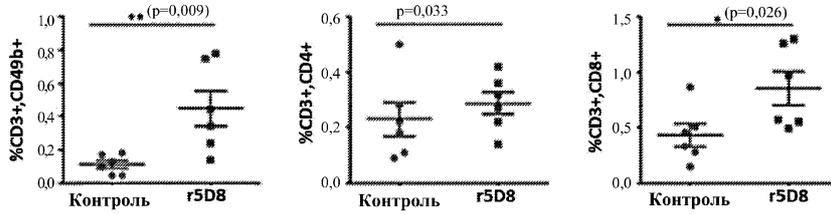
Фиг. 10С



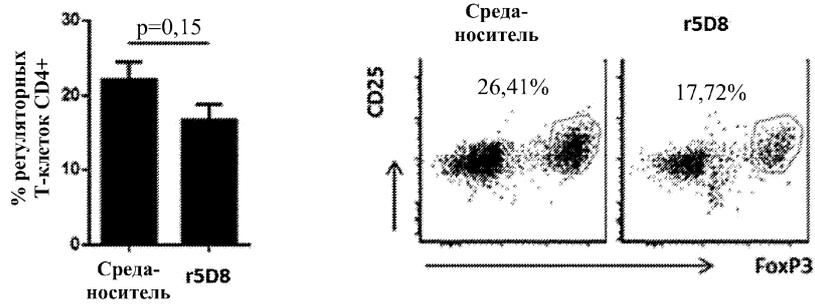
Фиг. 10D



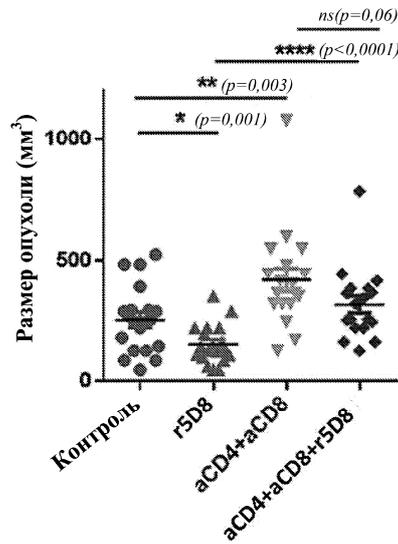
Фиг. 11А



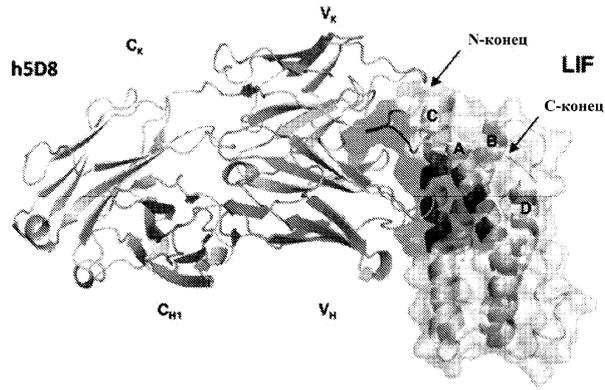
Фиг. 11В



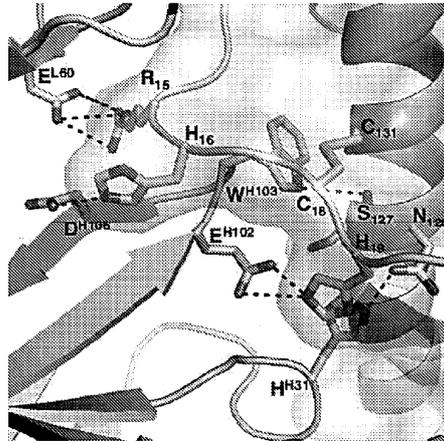
Фиг. 11С



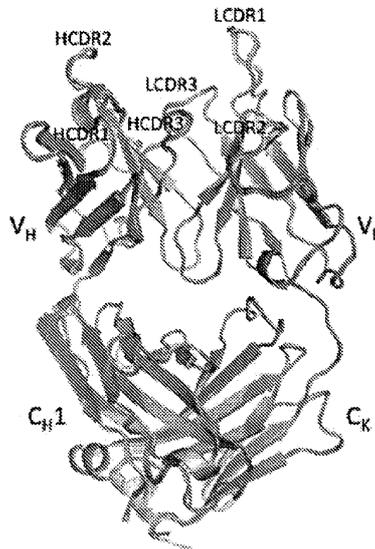
Фиг. 12



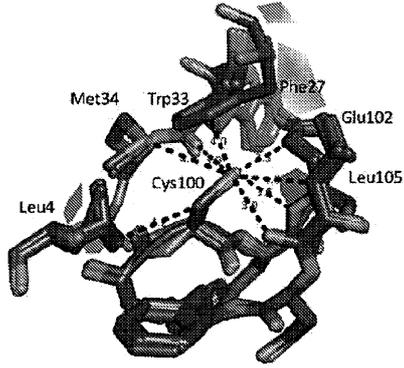
Фиг. 13А



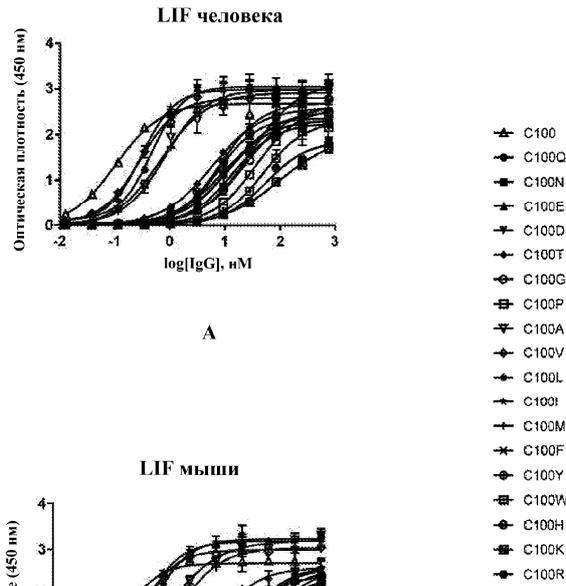
Фиг. 13В



Фиг. 14А



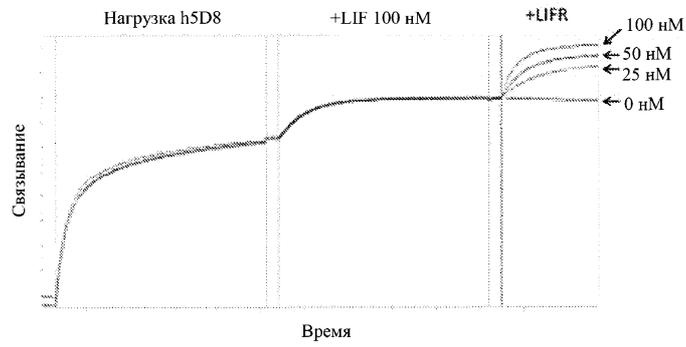
Фиг. 14В



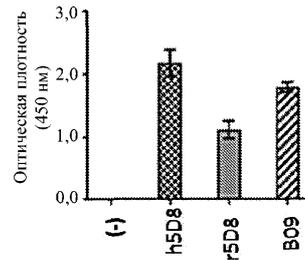
А

В

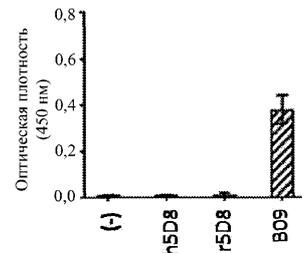
Фиг. 15



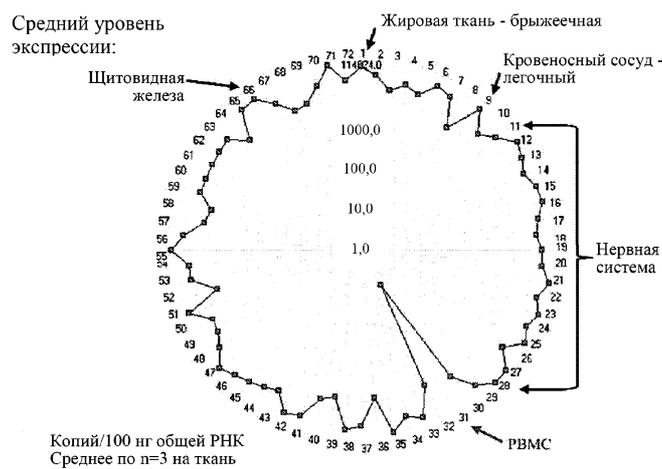
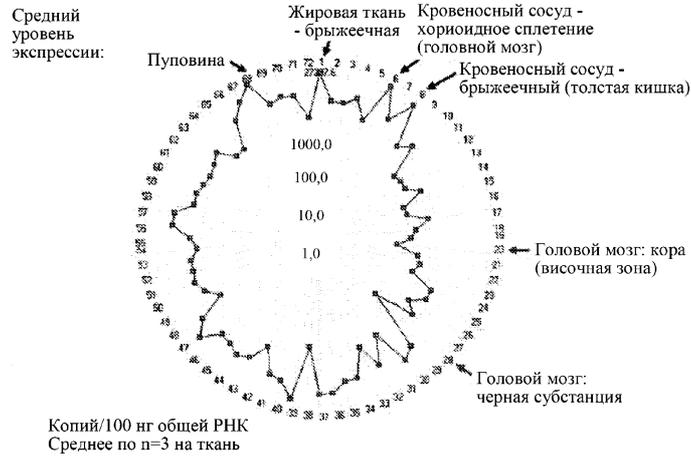
Фиг. 16А

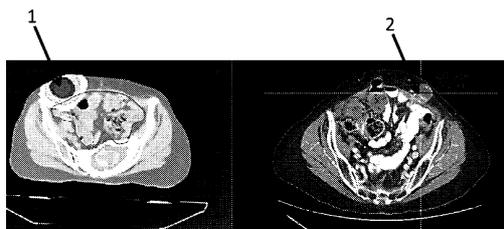


Фиг. 16В

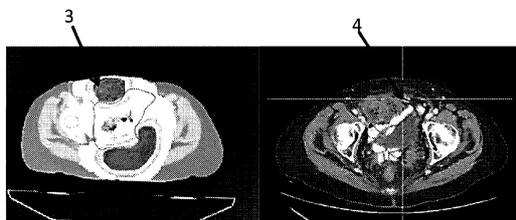


Фиг. 16С

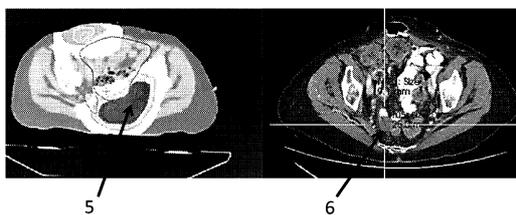




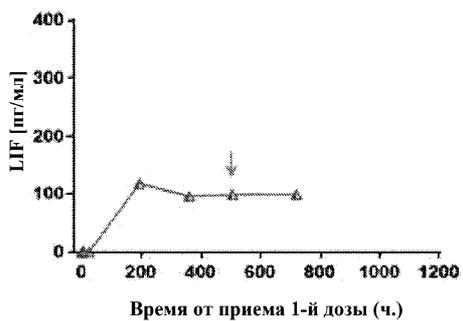
Фиг. 18А



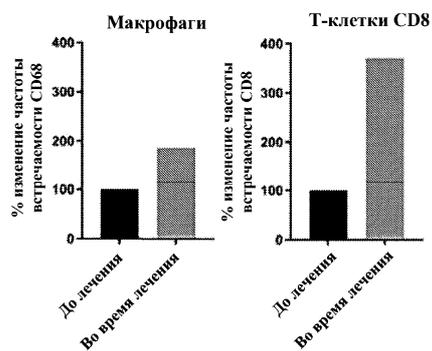
Фиг. 18В



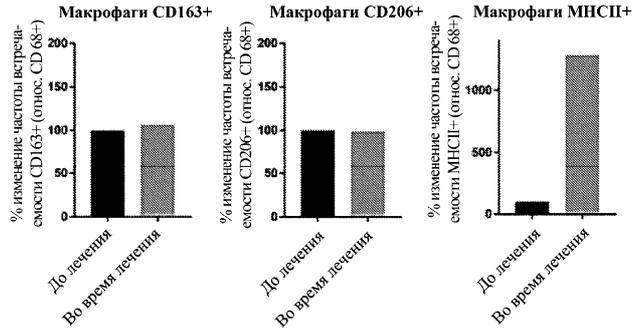
Фиг. 18С



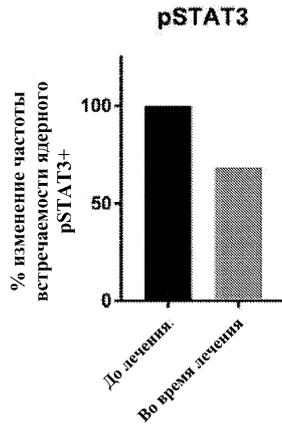
Фиг. 19



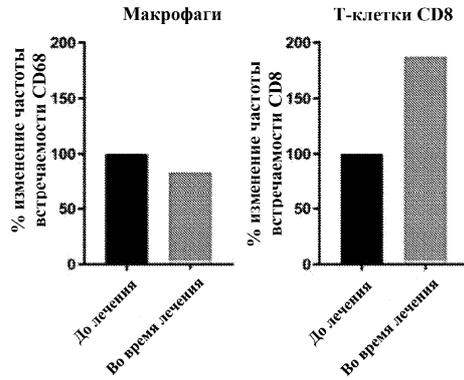
Фиг. 20А



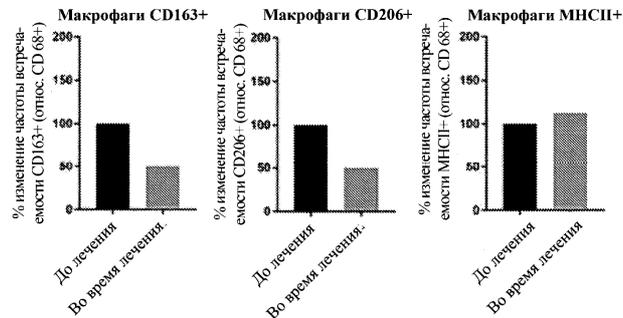
Фиг. 20В



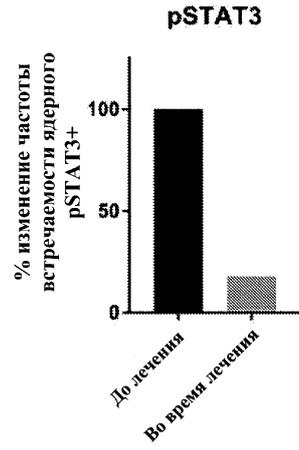
Фиг. 20С



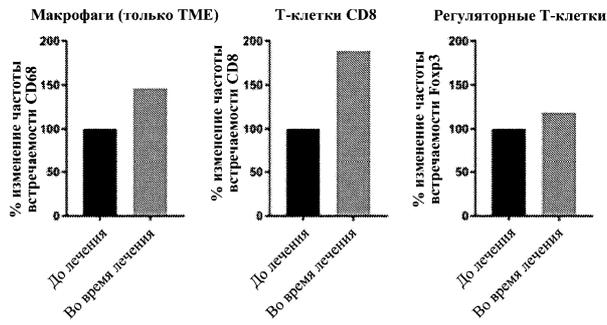
Фиг. 21А



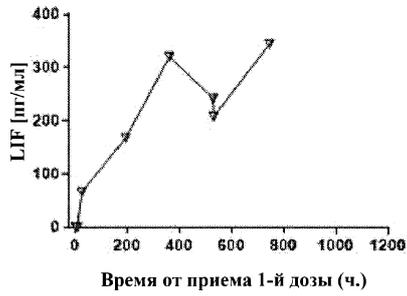
Фиг. 21В



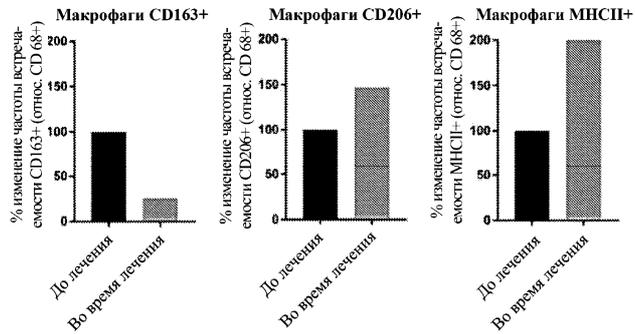
Фиг. 21С



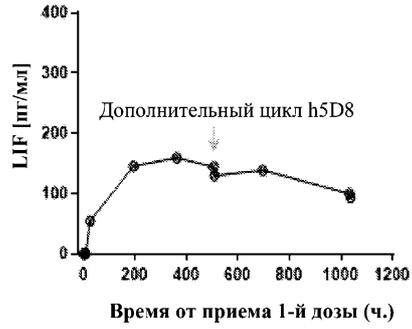
Фиг. 22



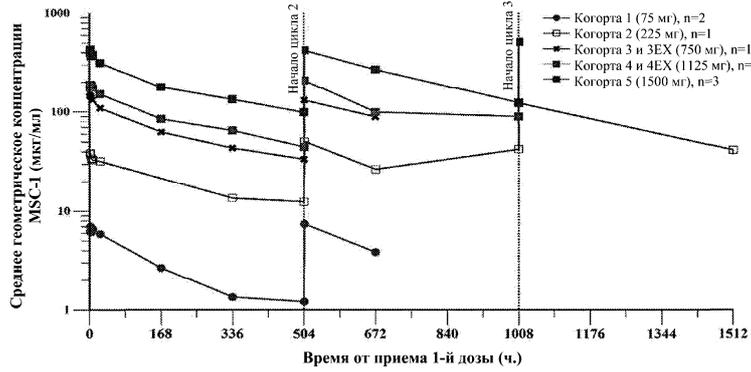
Фиг. 23



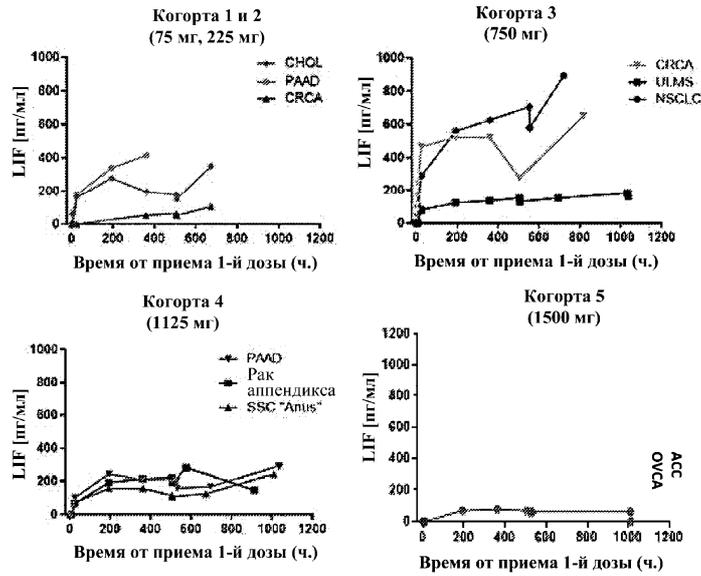
Фиг. 24



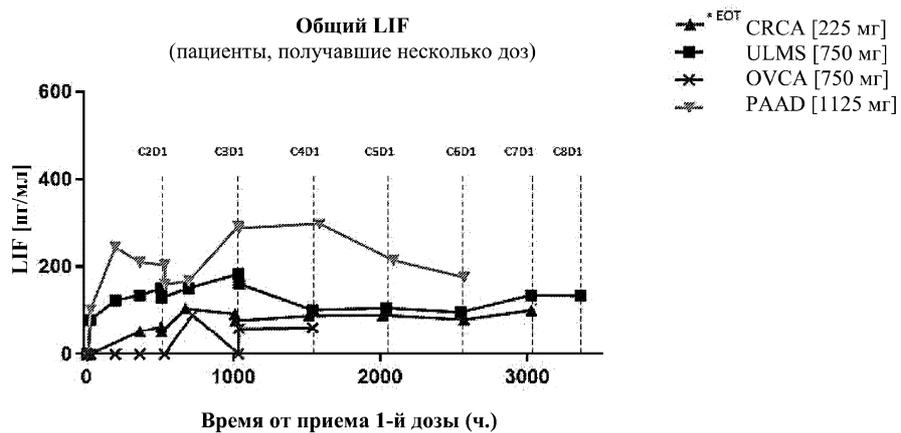
Фиг. 25



Фиг. 26



Фиг. 27А



Фиг. 27В

