

对 LIF 具有特异性的结合分子及其用途

技术领域

本发明涉及与 LIF 特异性结合的分离的抗体或其抗原结合部分,以及本发明的分离的抗体或其抗原结合部分的用途,以及使用本发明的分离的抗体或其抗原结合部分的治疗方法。

发明背景

白血病抑制因子 (LIF, Leukemia Inhibitory Factor) 是 IL-6 类细胞因子的一员,它具有多种生物活性包括刺激或抑制细胞的增殖、分化和存活[1]。人 LIF 蛋白含有 202 个氨基酸,它在细胞膜表面的受体有两个, GP130 和 LIFR, LIF 蛋白通过与这两个受体结合,导致这两个受体形成异源二聚体,从而激活下游信号通路,例如 MAPK 信号通路和 JAK/STAT 信号通路[2]。高表达和高血清浓度的 LIF 蛋白已显示与多种肿瘤的不良预后相关[3,4]。LIF 是肿瘤干细胞的重要调节因子,在干细胞维持、自我更新和多能性等方面发挥重要作用,并与化疗耐药有关[5, 6]。此外, LIF 还能促进肿瘤的生长和转移[7]。最近的证据表明在肿瘤中 LIF 通过自分泌和旁分泌的方式上调 JAK - STAT3 信号通路,从而发挥促进肿瘤生长和抑制免疫应答的作用[8, 9, 10]。因此, LIF 是极具潜力的治疗靶点,但是目前针对 LIF 靶点所开发的治疗方法并不乐观。例如已有多篇文献报道,利用 RNA 干扰降低 LIF 蛋白的表达,能够抑制肿瘤生长[11, 12],但是 RNA 干扰技术具有靶向性差,半衰期短,过膜性差等弱点成药困难; EC359 为针对 LIFR 的小分子抑制剂,不仅能够抑制 LIFR 与 LIF 的结合还能同时抑制 OSM, CTF1, CNTF 与 LIFR 的结合[13],这些额外的抑制会不会导致额外的毒性还是未知,而特异性针对 LIF 蛋白的小分子抑制剂还未见报道;目前只有一款针对 LIF 蛋白的抗体处于临床开发阶段,相关的安全性和有效性数据还未公开。

因此,仍然需要更多研究来开发针对 LIF 靶点的药物及组合治疗方法。

发明内容

本发明提供特异性结合 LIF 的分离的抗体或抗原结合部分及其在治疗疾病中的用途。

在一方面,本发明提供一种分离的抗体或其抗原结合部分,其中,所述分离的抗体或其抗原结合部分结合在人 LIF 蛋白的氨基酸序列 TYGPDTSKGKDVQKK (SEQ ID NO: 61) 所示的表位或在不同哺乳动物物种的相应氨基酸序列的表位。

在再一方面,本发明提供一种分离的抗体或其抗原结合部分,其中,所述的分离的抗体或其抗原结合部分包含:

(a) LCDR1, 该 LCDR1 包含选自以下所组成的组: SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 66 及其保守修饰形式的氨基酸序列;

(b) LCDR2, 该 LCDR2 包含选自以下所组成的组: SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 67 及其保守修饰形式的氨基酸序列;

5 (c) LCDR3, 该 LCDR3 包含选自以下所组成的组: SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 68 及其保守修饰形式的氨基酸序列;

(d) HCDR1, 该 HCDR1 包含选自以下所组成的组: SEQ ID NO: 4 或 SEQ ID NO: 69 及其保守修饰形式的氨基酸序列;

(e) HCDR2, 该 HCDR2 包含选自以下所组成的组: SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 45 或 SEQ ID NO: 70 及其保守修饰形式的氨基酸序列; 及

(f) HCDR3, 该 HCDR3 包含选自以下所组成的组: SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 71 及其保守修饰形式的氨基酸序列。

任选地, 所述 LCDR1、LCDR2、LCDR3、HCDR1、HCDR2 或 HCDR3 具有 17 个或更少的氨基酸的添加、取代、删除和/或插入。

15 在某些实施方案中, 所述的分离的抗体或其抗原结合部分包含:

(a) LCDR1, 该 LCDR1 包含选自以下所组成的组: SEQ ID NO: 1 及其保守修饰形式的氨基酸序列;

(b) LCDR2, 该 LCDR2 包含选自以下所组成的组: SEQ ID NO: 2 及其保守修饰形式的氨基酸序列;

20 (c) LCDR3, 该 LCDR3 包含选自以下所组成的组: SEQ ID NO: 3 及其保守修饰形式的氨基酸序列;

(d) HCDR1, 该 HCDR1 包含选自以下所组成的组: SEQ ID NO: 4 及其保守修饰形式的氨基酸序列;

(e) HCDR2, 该 HCDR2 包含选自以下所组成的组: SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 45 及其保守修饰形式的氨基酸序列; 及

25 (f) HCDR3, 该 HCDR3 包含选自以下所组成的组: SEQ ID NO: 6 及其保守修饰形式的氨基酸序列。

任选地, 所述 LCDR1、LCDR2、LCDR3、HCDR1、HCDR2 或 HCDR3 具有 17 个或更少的氨基酸的添加、取代、删除和/或插入。

在某些实施方案中，任选地，所述 LCDR1、LCDR2、LCDR3、HCDR1、HCDR2 或 HCDR3 具有 9 个或更少的氨基酸的添加、取代、删除、和/或插入。

在某些实施方案中，任选地，所述 LCDR1、LCDR2、LCDR3、HCDR1、HCDR2 或 HCDR3 具有 5 个或更少的氨基酸的添加、取代、删除、和/或插入。

5 在某些实施方案中，所述的分离的抗体或其抗原结合部分包含：

- 1) (a) 包含 SEQ ID NO: 1 的 LCDR1, (b)包含 SEQ ID NO: 2 的 LCDR2, (c) 包含 SEQ ID NO: 3 的 LCDR3, (d)包含 SEQ ID NO: 4 的 HCDR1, (e) 包含 SEQ ID NO: 5 的 HCDR2, 以及(f)包含 SEQ ID NO: 6 的 HCDR3;
- 2) (a) 包含 SEQ ID NO: 1 的 LCDR1, (b)包含 SEQ ID NO: 2 的 LCDR2, (c) 包含 SEQ ID NO: 3 的 LCDR3, (d)包含 SEQ ID NO: 4 的 HCDR1, (e) 包含 SEQ ID NO: 45 的 HCDR2, 以及(f)包含 SEQ ID NO: 6 的 HCDR3; 或者
- 3) (a) 包含 SEQ ID NO: 66 的 LCDR1, (b)包含 SEQ ID NO: 67 的 LCDR2, (c) 包含 SEQ ID NO: 68 的 LCDR3, (d)包含 SEQ ID NO: 69 的 HCDR1, (e) 包含 SEQ ID NO: 70 的 HCDR2, 以及(f)包含 SEQ ID NO: 71 的 HCDR3。

15 在某些实施方案中，所述的分离的抗体或其抗原结合部分包含：

- 1) (a) 包含 SEQ ID NO: 1 的 LCDR1, (b)包含 SEQ ID NO: 2 的 LCDR2, (c) 包含 SEQ ID NO: 3 的 LCDR3, (d)包含 SEQ ID NO: 4 的 HCDR1, (e) 包含 SEQ ID NO: 5 的 HCDR2, 以及(f)包含 SEQ ID NO: 6 的 HCDR3; 或者
- 2) (a) 包含 SEQ ID NO: 1 的 LCDR1, (b)包含 SEQ ID NO: 2 的 LCDR2, (c) 包含 SEQ ID NO: 3 的 LCDR3, (d)包含 SEQ ID NO: 4 的 HCDR1, (e) 包含 SEQ ID NO: 45 的 HCDR2, 以及(f)包含 SEQ ID NO: 6 的 HCDR3。

在某些实施方案中，所述的分离的抗体或其抗原结合部分包含：

- (a) 包含 SEQ ID NO: 1 的 LCDR1, (b)包含 SEQ ID NO: 2 的 LCDR2, (c) 包含 SEQ ID NO: 3 的 LCDR3, (d)包含 SEQ ID NO: 4 的 HCDR1, (e) 包含 SEQ ID NO: 5 的 HCDR2, 以及(f)包含 SEQ ID NO: 6 的 HCDR3。

在某些实施方案中，所述的分离的抗体或其抗原结合部分包含：

- (a) 包含 SEQ ID NO: 1 的 LCDR1, (b)包含 SEQ ID NO: 2 的 LCDR2, (c) 包含 SEQ ID NO: 3 的 LCDR3, (d)包含 SEQ ID NO: 4 的 HCDR1, (e) 包含 SEQ ID NO: 45 的 HCDR2, 以及(f)包含 SEQ ID NO: 6 的 HCDR3。

30 在某些实施方案中，所述的分离的抗体或其抗原结合部分包含：

(a) 包含 SEQ ID NO: 66 的 LCDR1, (b) 包含 SEQ ID NO: 67 的 LCDR2, (c) 包含 SEQ ID NO: 68 的 LCDR3, (d) 包含 SEQ ID NO: 69 的 HCDR1, (e) 包含 SEQ ID NO: 70 的 HCDR2, 以及(f) 包含 SEQ ID NO: 71 的 HCDR3。

在某些实施方案中, 所述分离的抗体或其抗原结合片段是鼠源抗体或其抗原结合片段、嵌合抗体或其抗原结合片段、全人抗体或其抗原结合片段, 或人源化抗体或其抗原结合片段。

在某些实施方案中, 所述分离的抗体为人源化抗体, 所述人源化抗体包含源自人抗体的框架区或其框架区变体

在某些实施方案中, 所述的分离的抗体或其抗原结合部分包含:

- (i) 轻链可变区 (VL), 该轻链可变区包含选自以下所组成的组的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列: SEQ ID NOs: 7、11、15、19、46、74 或 82 及其保守修饰形式的氨基酸序列; 以及
- (ii) 重链可变区 (VH), 该重链可变区包含选自以下所组成的组的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列: SEQ ID NOs: 23、27、31、48、75 或 83 及其保守修饰形式的氨基酸序列。

在某些实施方案中, 所述的分离的抗体或其抗原结合部分包含:

- (i) 轻链可变区 (VL), 该轻链可变区包含选自以下所组成的组的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列: SEQ ID NOs: 7、11、15、19 或 46 及其保守修饰形式的氨基酸序列; 以及
- (ii) 重链可变区 (VH), 该重链可变区包含选自以下所组成的组的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列: SEQ ID NOs: 23、27、31 或 48 及其保守修饰形式的氨基酸序列。

在某些实施方案中, 所述的分离的抗体或其抗原结合部分包含:

- (i) 轻链可变区 (VL), 该轻链可变区包含选自以下所组成的组的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列: SEQ ID NOs: 7、11、15 或 19 及其保守修饰形式的氨基酸序列; 以及
- (ii) 重链可变区 (VH), 该重链可变区包含选自以下所组成的组的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列: SEQ ID NOs: 23、27 或 31 及其保守修饰形式的氨基酸序列。

在某些实施方案中, 所述的轻链可变区包含与选自(i)中的轻链可变区至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%或者 100%同源性的氨基酸序列; 所述重链可变区包含与选自(ii)中的重链可变区至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%或者 100%同源性的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述的分离的抗体或其抗原结合部分包含：

- 1) 轻链可变区 (VL)，其包含与 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；
以及重链可变区 (VH)，其包含与 SEQ ID NO: 23 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；
- 5 2) 轻链可变区 (VL)，其包含与 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；
以及重链可变区 (VH)，其包含与 SEQ ID NO: 27 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；
- 3) 轻链可变区 (VL)，其包含与 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；
以及重链可变区 (VH)，其包含与 SEQ ID NO: 31 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；
- 10 4) 轻链可变区 (VL)，其包含与 SEQ ID NO: 11 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；
以及重链可变区 (VH)，其包含与 SEQ ID NO: 23 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；
- 5) 轻链可变区 (VL)，其包含与 SEQ ID NO: 11 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；
以及重链可变区 (VH)，其包含与 SEQ ID NO: 27 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；
- 15 6) 轻链可变区 (VL)，其包含与 SEQ ID NO: 11 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；
以及重链可变区 (VH)，其包含与 SEQ ID NO: 31 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；
- 20 7) 轻链可变区 (VL)，其包含与 SEQ ID NO: 15 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；
以及重链可变区 (VH)，其包含与 SEQ ID NO: 23 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；
- 8) 轻链可变区 (VL)，其包含与 SEQ ID NO: 15 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；
以及重链可变区 (VH)，其包含与 SEQ ID NO: 27 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；
- 25 9) 轻链可变区 (VL)，其包含与 SEQ ID NO: 15 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；
以及重链可变区 (VH)，其包含与 SEQ ID NO: 31 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；

- 10) 轻链可变区 (VL), 其包含与 SEQ ID NO: 19 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列;
以及重链可变区 (VH), 其包含与 SEQ ID NO: 23 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列;
- 5 11) 轻链可变区 (VL), 其包含与 SEQ ID NO: 19 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列;
以及重链可变区 (VH), 其包含与 SEQ ID NO: 27 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列;
- 12) 轻链可变区 (VL), 其包含与 SEQ ID NO: 19 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列;
以及重链可变区 (VH), 其包含与 SEQ ID NO: 31 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列;
- 10 13) 轻链可变区 (VL), 其包含与 SEQ ID NO: 46 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列;
以及重链可变区 (VH), 其包含与 SEQ ID NO: 48 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列;
- 14) 轻链可变区 (VL), 其包含与 SEQ ID NO: 74 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列;
以及重链可变区 (VH), 其包含与 SEQ ID NO: 75 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列; 或者
- 15 15) 轻链可变区 (VL), 其包含与 SEQ ID NO: 82 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列;
以及重链可变区 (VH), 其包含与 SEQ ID NO: 83 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列。
- 在某些实施方案中, 所述的分离的抗体或其抗原结合部分包含:
- 20 1) 轻链可变区 (VL), 其包含与 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列;
以及重链可变区 (VH), 其包含与 SEQ ID NO: 23 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列;
- 2) 轻链可变区 (VL), 其包含与 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列;
以及重链可变区 (VH), 其包含与 SEQ ID NO: 27 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列;
- 25 3) 轻链可变区 (VL), 其包含与 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列;
以及重链可变区 (VH), 其包含与 SEQ ID NO: 31 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列;

- 4) 轻链可变区 (VL)，其包含与 SEQ ID NO: 11 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；以及重链可变区 (VH)，其包含与 SEQ ID NO: 23 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；
- 5) 轻链可变区 (VL)，其包含与 SEQ ID NO: 11 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；以及重链可变区 (VH)，其包含与 SEQ ID NO: 27 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；
- 6) 轻链可变区 (VL)，其包含与 SEQ ID NO: 11 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；以及重链可变区 (VH)，其包含与 SEQ ID NO: 31 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；
- 7) 轻链可变区 (VL)，其包含与 SEQ ID NO: 15 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；以及重链可变区 (VH)，其包含与 SEQ ID NO: 23 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；
- 8) 轻链可变区 (VL)，其包含与 SEQ ID NO: 15 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；以及重链可变区 (VH)，其包含与 SEQ ID NO: 27 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；
- 9) 轻链可变区 (VL)，其包含与 SEQ ID NO: 15 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；以及重链可变区 (VH)，其包含与 SEQ ID NO: 31 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；
- 10) 轻链可变区 (VL)，其包含与 SEQ ID NO: 19 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；以及重链可变区 (VH)，其包含与 SEQ ID NO: 23 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；
- 11) 轻链可变区 (VL)，其包含与 SEQ ID NO: 19 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；以及重链可变区 (VH)，其包含与 SEQ ID NO: 27 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；或者
- 12) 轻链可变区 (VL)，其包含与 SEQ ID NO: 19 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；以及重链可变区 (VH)，其包含与 SEQ ID NO: 31 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述的分离的抗体或其抗原结合部分包含：

- 轻链可变区 (VL)，其包含与 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；
- 以及重链可变区 (VH)，其包含与 SEQ ID NO: 23 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述的分离的抗体或其抗原结合部分包含：

轻链可变区（VL），其包含与 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；
以及重链可变区（VH），其包含与 SEQ ID NO: 27 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述的分离的抗体或其抗原结合部分包含：

- 5 轻链可变区（VL），其包含与 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；
以及重链可变区（VH），其包含与 SEQ ID NO: 31 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述的分离的抗体或其抗原结合部分包含：

轻链可变区（VL），其包含与 SEQ ID NO: 11 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；
以及重链可变区（VH），其包含与 SEQ ID NO: 23 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列。

- 10 在某些实施方案中，所述的分离的抗体或其抗原结合部分包含：

轻链可变区（VL），其包含与 SEQ ID NO: 11 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；
以及重链可变区（VH），其包含与 SEQ ID NO: 27 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述的分离的抗体或其抗原结合部分包含：

- 15 轻链可变区（VL），其包含与 SEQ ID NO: 11 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；
以及重链可变区（VH），其包含与 SEQ ID NO: 31 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述的分离的抗体或其抗原结合部分包含：

轻链可变区（VL），其包含与 SEQ ID NO: 15 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；
以及重链可变区（VH），其包含与 SEQ ID NO: 23 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述的分离的抗体或其抗原结合部分包含：

- 20 轻链可变区（VL），其包含与 SEQ ID NO: 15 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；
以及重链可变区（VH），其包含与 SEQ ID NO: 27 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述的分离的抗体或其抗原结合部分包含：

轻链可变区（VL），其包含与 SEQ ID NO: 15 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；
以及重链可变区（VH），其包含与 SEQ ID NO: 31 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列。

- 25 在某些实施方案中，所述的分离的抗体或其抗原结合部分包含：

轻链可变区（VL），其包含与 SEQ ID NO: 19 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；
以及重链可变区（VH），其包含与 SEQ ID NO: 23 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述的分离的抗体或其抗原结合部分包含：

- 30 轻链可变区（VL），其包含与 SEQ ID NO: 19 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；
以及重链可变区（VH），其包含与 SEQ ID NO: 27 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述的分离的抗体或其抗原结合部分包含：

轻链可变区（VL），其包含与 SEQ ID NO: 19 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；
以及重链可变区（VH），其包含与 SEQ ID NO: 31 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述的分离的抗体或其抗原结合部分包含：

- 5 轻链可变区（VL），其包含与 SEQ ID NO: 46 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；
以及重链可变区（VH），其包含与 SEQ ID NO: 48 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述的分离的抗体或其抗原结合部分包含：

轻链可变区（VL），其包含与 SEQ ID NO: 74 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；
以及重链可变区（VH），其包含与 SEQ ID NO: 75 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列。

- 10 在某些实施方案中，所述的分离的抗体或其抗原结合部分包含：

轻链可变区（VL），其包含与 SEQ ID NO: 82 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；
以及重链可变区（VH），其包含与 SEQ ID NO: 83 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列。

- 在某些实施方案中，所述轻链可变区及重链可变区分别包含与选自 1)-15) 中轻链可变区及重链可变区至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或者 100% 同源性的氨基酸序列。
- 15

在一方面，本发明提供一种分离的抗体或其抗原结合片段，其包含选自如下(a)至(c)任一项所述的重链可变区和轻链可变区组合：

- (a) 轻链可变区（VL），该轻链可变区包含与 SEQ ID NOs: 7、11、15、19、46 或 82 任一序列中具有相同序列的 LCDR1、LCDR2 以及 LCDR3；以及
- 20 (ii) 重链可变区（VH），该重链可变区包含与 SEQ ID NOs: 23、27、31、48 或 83 任一序列中具有相同 HCDR1、HCDR2 以及 HCDR3。

在某些实施方案中，所述的分离的抗体或其抗原结合部分包含轻链和重链，其中：

- (I) 所述轻链包含选自以下所组成的下组的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列：SEQ ID NOs: 9、13、17、21、37、39、50 或者 54 及其保守修饰形式的氨基酸序列；以及
- 25 (II) 所述重链包含选自以下所组成的下组的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列：SEQ ID NOs: 25、29、33、35、52 或者 56 及其保守修饰形式的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述的分离的抗体或其抗原结合部分包含轻链和重链，其中：

- (I) 所述轻链包含选自以下所组成的下组的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列：SEQ ID NOs: 9、13、17、21、37、39 或者 50 及其保守修饰形式的氨基酸序列；以及

- (II) 所述重链包含选自以下所组成的下组的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列: SEQ ID NOs: 25、29、33、35 或者 52 及其保守修饰形式的氨基酸序列。

在某些实施方案中,所述的分离的抗体或其抗原结合部分包含轻链和重链,其中:

- 5 (I) 所述轻链包含选自以下所组成的下组的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列: SEQ ID NOs: 9、13、17 或 21 及其保守修饰形式的氨基酸序列; 以及
- (II) 所述重链包含选自以下所组成的下组的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列: SEQ ID NOs: 25、29 或 33 及其保守修饰形式的氨基酸序列。

在某些实施方案中,所述的轻链包含与选自(I)中的轻链至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%或者 100%同源性的氨基酸序列; 所述的重链包含与选自(II)的重链至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%或者 100%同源性的氨基酸序列。

在某些实施方案中,所述的分离的抗体或其抗原结合部分包含:

- 1) 轻链,其包含与 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列; 以及重链,其包含与 SEQ ID NO: 25 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列;
- 15 2) 轻链,其包含与 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列; 以及重链,其包含与 SEQ ID NO: 29 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列;
- 3) 轻链,其包含与 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列; 以及重链,其包含与 SEQ ID NO: 33 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列;
- 4) 轻链,其包含与 SEQ ID NO: 13 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列; 以及重链,其包含与 SEQ ID NO: 25 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列;
- 20 5) 轻链,其包含与 SEQ ID NO: 13 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列; 以及重链,其包含与 SEQ ID NO: 29 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列;
- 6) 轻链,其包含与 SEQ ID NO: 13 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列; 以及重链,其包含与 SEQ ID NO: 33 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列;
- 25 7) 轻链,其包含与 SEQ ID NO: 17 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列; 以及重链,其包含与 SEQ ID NO: 25 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列;
- 8) 轻链,其包含与 SEQ ID NO: 17 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列; 以及重链,其包含与 SEQ ID NO: 29 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列;
- 9) 轻链,其包含与 SEQ ID NO: 17 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列; 以及重链,其包含与 SEQ ID NO: 33 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列;
- 30

- 10) 轻链, 其包含与 SEQ ID NO: 21 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列; 以及重链, 其包含与 SEQ ID NO: 25 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列;
- 11) 轻链, 其包含与 SEQ ID NO: 21 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列; 以及重链, 其包含与 SEQ ID NO: 29 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列;
- 5 12) 轻链, 其包含与 SEQ ID NO: 21 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列; 以及重链, 其包含与 SEQ ID NO: 33 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列;
- 13) 轻链, 其包含与 SEQ ID NO: 37 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列; 以及重链, 其包含与 SEQ ID NO: 35 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列;
- 14) 轻链, 其包含与 SEQ ID NO: 39 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列; 以及重链, 其包含与 SEQ ID NO: 35 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列;
- 10 15) 轻链, 其包含与 SEQ ID NO: 50 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列; 以及重链, 其包含与 SEQ ID NO: 52 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列; 或者
- 16) 轻链, 其包含与 SEQ ID NO: 54 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列; 以及重链, 其包含与 SEQ ID NO: 56 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列。
- 15 在某些实施方案中, 所述轻链及重链分别包含与选自 1)-16) 中轻链及重链至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或者 100% 同源性的氨基酸序列。
- 在某些实施方案中, 所述的分离的抗体或其抗原结合部分包含:
- 轻链, 其包含与 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列; 以及重链, 其包含与 SEQ ID NO: 25 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列。
- 20 在某些实施方案中, 所述的分离的抗体或其抗原结合部分包含:
- 轻链, 其包含与 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列; 以及重链, 其包含与 SEQ ID NO: 29 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列。
- 在某些实施方案中, 所述的分离的抗体或其抗原结合部分包含:
- 轻链, 其包含与 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列; 以及重链, 其包含与 SEQ ID NO: 33 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列。
- 25 在某些实施方案中, 所述的分离的抗体或其抗原结合部分包含:
- 轻链, 其包含与 SEQ ID NO: 13 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列; 以及重链, 其包含与 SEQ ID NO: 25 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列。
- 在某些实施方案中, 所述的分离的抗体或其抗原结合部分包含:

轻链，其包含与 SEQ ID NO: 13 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；以及重链，其包含与 SEQ ID NO: 29 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述的分离的抗体或其抗原结合部分包含：

- 轻链，其包含与 SEQ ID NO: 13 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；以及重链，其包含与 SEQ ID NO: 33 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述的分离的抗体或其抗原结合部分包含：

轻链，其包含与 SEQ ID NO: 17 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；以及重链，其包含与 SEQ ID NO: 25 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述的分离的抗体或其抗原结合部分包含：

- 轻链，其包含与 SEQ ID NO: 17 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；以及重链，其包含与 SEQ ID NO: 29 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述的分离的抗体或其抗原结合部分包含：

轻链，其包含与 SEQ ID NO: 17 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；以及重链，其包含与 SEQ ID NO: 33 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列。

- 在某些实施方案中，所述的分离的抗体或其抗原结合部分包含：

轻链，其包含与 SEQ ID NO: 21 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；以及重链，其包含与 SEQ ID NO: 25 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述的分离的抗体或其抗原结合部分包含：

- 轻链，其包含与 SEQ ID NO: 21 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；以及重链，其包含与 SEQ ID NO: 29 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述的分离的抗体或其抗原结合部分包含：

轻链，其包含与 SEQ ID NO: 21 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；以及重链，其包含与 SEQ ID NO: 33 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述的分离的抗体或其抗原结合部分包含：

- 轻链，其包含与 SEQ ID NO: 37 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；以及重链，其包含与 SEQ ID NO: 35 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述的分离的抗体或其抗原结合部分包含：

轻链，其包含与 SEQ ID NO: 39 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；以及重链，其包含与 SEQ ID NO: 35 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列。

- 在某些实施方案中，所述的分离的抗体或其抗原结合部分包含：

轻链，其包含与 SEQ ID NO: 50 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；以及重链，其包含与 SEQ ID NO: 52 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列。

在某些实施方案中，所述的分离的抗体或其抗原结合部分包含：

- 轻链，其包含与 SEQ ID NO: 54 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列；以及重链，其包含与 SEQ ID NO: 56 的氨基酸序列至少 85%同源性的氨基酸序列。

在另一方面，本发明提供一种分离的抗体或其抗原结合部分，其中，所述的分离的抗体或其抗原结合部分包含：(a) 包含 SEQ ID NO: 1 的 LCDR1，(b) 包含 SEQ ID NO: 2 的 LCDR2，(c) 包含 SEQ ID NO: 3 的 LCDR3，(d) 包含 SEQ ID NO: 4 的 HCDR1，(e) 包含 SEQ ID NO: 5 的 HCDR2，以及(f) 包含 SEQ ID NO: 6 的 HCDR3。

- 10 在又一方面，本发明提供一种分离的抗体或其抗原结合部分，其中，所述的分离的抗体或其抗原结合部分包含：(a) 包含 SEQ ID NO: 1 的 LCDR1，(b) 包含 SEQ ID NO: 2 的 LCDR2，(c) 包含 SEQ ID NO: 3 的 LCDR3，(d) 包含 SEQ ID NO: 4 的 HCDR1，(e) 包含 SEQ ID NO: 45 的 HCDR2，以及(f) 包含 SEQ ID NO: 6 的 HCDR3。

- 15 在又一方面，本发明提供一种分离的抗体或其抗原结合部分，其中，含有 SEQ ID NO: 7 所示的轻链可变区 (VL)，以及含有 SEQ ID NO: 23 所示的重链可变区 (VH)。

在再一方面，本发明提供一种分离的抗体或其抗原结合部分，其中，含有 SEQ ID NO: 11 所示的轻链可变区 (VL)，以及含有 SEQ ID NO: 31 所示的重链可变区 (VH)。

在另一方面，本发明提供一种分离的抗体或其抗原结合部分，其中，含有 SEQ ID NO: 19 所示的轻链可变区 (VL)，以及含有 SEQ ID NO: 31 所示的重链可变区 (VH)。

- 20 在某些实施方案中，所述分离的抗体是单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人改造抗体、人抗体、双特异性抗体、Fv、单链抗体 (scFv)、Fab、Fab'、Fab'-SH 或者 F(ab')₂。

在某些实施方案中，所述的分离的抗体是 IgG。

在某些实施方案中，所述分离的抗体是 IgG1、IgG2 或 IgG4。

- 25 在某些实施方案中，所述的分离的抗体或其抗原结合部分为 LIF (leukemia inhibitory factor) 拮抗剂。

在某些实施方案中，所述的分离的抗体或其抗原结合部分能够抑制 LIF 表达和/或阻断 LIF 活性。

在某些实施方案中，所述的分离的抗体或其抗原结合部分能够竞争或交叉竞争用于结合 LIF。

在再一方面，本发明提供一种核苷酸组合物，其包含编码本发明所述的分离的抗体或其抗原结合部分的核苷酸分子。在一些实施方式中，所述的核苷酸分子为 DNA 或 RNA。在一些实施方式中，所述的核苷酸分子为 DNA。

在某些实施方案中，所述的核苷酸组合物包含：

- 5 (i) 第一核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NOs: 7、11、15、19、46 或 82 所示的轻链可变区 (VL) 的 DNA；以及
- (ii) 第二核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NOs: 23、27、31、48 或 83 所述的重链可变区 (VH) 的 DNA。

在某些实施方案中，所述的核苷酸组合物包含：

- 10 (i) 第一核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NOs: 7、11、15、19 或 46 所示的轻链可变区 (VL) 的 DNA；以及
- (ii) 第二核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NOs: 23、27、31 或 48 所述的重链可变区 (VH) 的 DNA。

在某些实施方案中，所述的核苷酸组合物包含：

- 15 (i) 第一核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NOs: 7、11、15 或 19 所示的轻链可变区 (VL) 的 DNA；以及
- (ii) 第二核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NOs: 23、27 或 31 所述的重链可变区 (VH) 的 DNA。

- 在某些实施方案中，第一核酸分子包含与选自(i)中第一核酸分子至少 90%、至少 95%、至少 20 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%或者 100%同源性的 DNA；第二核酸分子包含与选自(ii)中的第二核酸分子至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%或者 100%同源性的 DNA。

在某些实施方案中，所述的核苷酸组合物包含：

- 1) 第一核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示的轻链可变区 (VL) 的 DNA；
- 25 以及第二核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 23 所示的重链可变区 (VH) 的 DNA；
- 2) 第一核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示的轻链可变区 (VL) 的 DNA；
- 以及第二核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 27 所示的重链可变区 (VH) 的 DNA；

- 3) 第一核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示的轻链可变区 (VL) 的 DNA;
以及第二核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 31 所示的重链可变区 (VH) 的 DNA;
- 4) 第一核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示的轻链可变区 (VL) 的 DNA;
5 以及第二核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 23 的重链可变区 (VH) 的 DNA;
- 5) 第一核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示的轻链可变区 (VL) 的 DNA;
以及第二核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 27 所示的重链可变区 (VH) 的 DNA;
- 6) 第一核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示的轻链可变区 (VL) 的 DNA;
10 以及第二核酸分子, 其含有编码 SEQ ID NO: 31 所示的重链可变区 (VH) 的 DNA;
- 7) 第一核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示的轻链可变区 (VL) 的 DNA;
以及第二核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 23 所示的重链可变区 (VH) 的 DNA;
- 8) 第一核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示的轻链可变区 (VL) 的 DNA;
15 以及第二核酸分子, 其含有编码氨基酸序列 SEQ ID NO: 27 所示的重链可变区 (VH) 的 DNA;
- 9) 第一核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示的轻链可变区 (VL) 的 DNA;
以及第二核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 31 所示的重链可变区 (VH) 的 DNA;
- 10) 第一核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19 所示的轻链可变区 (VL) 的 DNA;
20 以及第二核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 23 所示的重链可变区 (VH) 的 DNA;
- 11) 第一核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19 所示的轻链可变区 (VL) 的 DNA;
25 以及第二核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 27 所示的重链可变区 (VH) 的 DNA;
- 12) 第一核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19 所示的轻链可变区 (VL) 的 DNA;
以及第二核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 31 所示的重链可变区 (VH) 的 DNA;

- 13) 第一核酸分子,其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 46 所示的轻链可变区(VL)的 DNA;
以及第二核酸分子,其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 48 所示的重链可变区(VH)的 DNA;
- 14) 第一核酸分子,其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 74 所示的轻链可变区(VL)的 DNA;
5 以及第二核酸分子,其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 75 所示的重链可变区(VH)的 DNA; 或者
- 15) 第一核酸分子,其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 82 所示的轻链可变区(VL)的 DNA;
以及第二核酸分子,其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 83 所示的重链可变区(VH)的 DNA。
- 10 在某些实施方案中,所述的核苷酸组合物包含:
- 1) 第一核酸分子,其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示的轻链可变区(VL)的 DNA;
以及第二核酸分子,其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 23 所示的重链可变区(VH)的 DNA;
- 2) 第一核酸分子,其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示的轻链可变区(VL)的 DNA;
15 以及第二核酸分子,其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 27 所示的重链可变区(VH)的 DNA;
- 3) 第一核酸分子,其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示的轻链可变区(VL)的 DNA;
以及第二核酸分子,其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 31 所示的重链可变区(VH)的 DNA;
- 20 4) 第一核酸分子,其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示的轻链可变区(VL)的 DNA;
以及第二核酸分子,其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 23 的重链可变区(VH)的 DNA;
- 5) 第一核酸分子,其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示的轻链可变区(VL)的 DNA;
以及第二核酸分子,其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 27 所示的重链可变区(VH)的 DNA;
- 25 6) 第一核酸分子,其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示的轻链可变区(VL)的 DNA;
以及第二核酸分子,其含有编码 SEQ ID NO: 31 所示的重链可变区(VH)的 DNA;
- 7) 第一核酸分子,其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示的轻链可变区(VL)的 DNA;
以及第二核酸分子,其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 23 所示的重链可变区(VH)的 DNA;

- 8) 第一核酸分子,其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示的轻链可变区(VL)的 DNA;
以及第二核酸分子,其含有编码氨基酸序列 SEQ ID NO: 27 所示的重链可变区(VH)的 DNA;
- 9) 第一核酸分子,其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示的轻链可变区(VL)的 DNA;
5 以及第二核酸分子,其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 31 所示的重链可变区(VH)的 DNA;
- 10) 第一核酸序列,其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19 所示的轻链可变区(VL)的 DNA;
以及第二核酸序列,其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 23 所示的重链可变区(VH)的 DNA;
- 10 11) 第一核酸序列,其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19 所示的轻链可变区(VL)的 DNA;
以及第二核酸序列,其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 27 所示的重链可变区(VH)的 DNA; 或者
- 12) 第一核酸序列,其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19 所示的轻链可变区(VL)的 DNA;
以及第二核酸序列,其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 31 所示的重链可变区(VH)的 DNA。
15

在某些实施方案中,所述的核苷酸组合物包含:

第一核酸分子,其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示的轻链可变区(VL)的 DNA;
以及第二核酸分子,其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 23 所示的重链可变区(VH)的 DNA。

在某些实施方案中,所述的核苷酸组合物包含:

- 20 第一核酸分子,其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示的轻链可变区(VL)的 DNA;
以及第二核酸分子,其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 27 所示的重链可变区(VH)的 DNA。

在某些实施方案中,所述的核苷酸组合物包含:

第一核酸分子,其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示的轻链可变区(VL)的 DNA;
以及第二核酸分子,其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 31 所示的重链可变区(VH)的 DNA。

- 25 在某些实施方案中,所述的核苷酸组合物包含:

第一核酸分子,其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示的轻链可变区(VL)的 DNA;
以及第二核酸分子,其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 23 的重链可变区(VH)的 DNA。

在某些实施方案中,所述的核苷酸组合物包含:

- 30 第一核酸分子,其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示的轻链可变区(VL)的 DNA;
以及第二核酸分子,其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 27 所示的重链可变区(VH)的 DNA。

在某些实施方案中，所述的核苷酸组合物包含：

第一核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示的轻链可变区（VL）的 DNA；
以及第二核酸分子，其含有编码 SEQ ID NO: 31 所示的重链可变区（VH）的 DNA。

在某些实施方案中，所述的核苷酸组合物包含：

- 5 第一核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示的轻链可变区（VL）的 DNA；
以及第二核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 23 所示的重链可变区（VH）的 DNA。

在某些实施方案中，所述的核苷酸组合物包含：

第一核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示的轻链可变区（VL）的 DNA；
以及第二核酸分子，其含有编码氨基酸序列 SEQ ID NO: 27 所示的重链可变区（VH）的 DNA。

- 10 在某些实施方案中，所述的核苷酸组合物包含：

第一核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示的轻链可变区（VL）的 DNA；
以及第二核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 31 所示的重链可变区（VH）的 DNA。

在某些实施方案中，所述的核苷酸组合物包含：

- 15 第一核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19 所示的轻链可变区（VL）的 DNA；
以及第二核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 23 所示的重链可变区（VH）的 DNA。

在某些实施方案中，所述的核苷酸组合物包含：

第一核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19 所示的轻链可变区（VL）的 DNA；
以及第二核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 27 所示的重链可变区（VH）的 DNA。

在某些实施方案中，所述的核苷酸组合物包含：

- 20 第一核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19 所示的轻链可变区（VL）的 DNA；
以及第二核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 31 所示的重链可变区（VH）的 DNA。

在某些实施方案中，所述的核苷酸组合物包含：

第一核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 46 所示的轻链可变区（VL）的 DNA；
以及第二核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 48 所示的重链可变区（VH）的 DNA。

- 25 在某些实施方案中，所述的核苷酸组合物包含：

第一核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 74 所示的轻链可变区（VL）的 DNA；
以及第二核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 75 所示的重链可变区（VH）的 DNA。

在某些实施方案中，所述的核苷酸组合物包含：

- 30 第一核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 82 所示的轻链可变区（VL）的 DNA；
以及第二核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 83 所示的重链可变区（VH）的 DNA。

在某些实施方案中，第一核酸序列分别包含与选自 1)-15) 中第一核酸序列或第二核酸序列至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或者 100% 同源性的 DNA 序列。

在某些实施方案中，编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示的轻链可变区 (VL) 的 DNA 如 SEQ ID NO: 8 所示。

- 5 在某些实施方案中，编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示的轻链可变区 (VL) 的 DNA 如 SEQ ID NO: 12 所示。

在某些实施方案中，编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示的轻链可变区 (VL) 的 DNA 如 SEQ ID NO: 16 所示。

- 10 在某些实施方案中，编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19 所示的轻链可变区 (VL) 的 DNA 如 SEQ ID NO: 20 所示。

在某些实施方案中，编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 46 所示的轻链可变区 (VL) 的 DNA 如 SEQ ID NO: 47 所示。

在某些实施方案中，编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 74 所示的轻链可变区 (VL) 的 DNA 如 SEQ ID NO: 76 所示。

- 15 在某些实施方案中，编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 82 所示的轻链可变区 (VL) 的 DNA 如 SEQ ID NO: 72 所示。

在某些实施方案中，编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 23 所示的重链可变区 (VH) 的 DNA 如 SEQ ID NO: 24 所示。

- 20 在某些实施方案中，编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 27 所示的重链可变区 (VH) 的 DNA 如 SEQ ID NO: 28 所示。

在某些实施方案中，编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 31 所示的重链可变区 (VH) 的 DNA 如 SEQ ID NO: 32 所示。

在某些实施方案中，编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 48 所示的重链可变区 (VH) 的 DNA 如 SEQ ID NO: 49 所示。

- 25 在某些实施方案中，编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 75 所示的重链可变区 (VH) 的 DNA 如 SEQ ID NO: 77 所示。

在某些实施方案中，编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 83 所示的重链可变区 (VH) 的 DNA 如 SEQ ID NO: 73 所示。

在某些实施方案中，所述的核苷酸组合物包括：

- (I) 第一核酸序列, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NOs: 9、13、17、21、37、39、50 或 54 所示的轻链的 DNA; 以及
- (II) 第二核酸序列, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NOs: 25、29、33、35、52 或 56 所示的重链的 DNA。

5 在某些实施方案中, 所述的核苷酸组合物包括:

- (I) 第一核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NOs: 9、13、17、21、37、39 或 50 所示的轻链的 DNA; 以及
- (II) 第二核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NOs: 25、29、33、35 或 52 所示的重链的 DNA。

10 在某些实施方案中, 所述的核苷酸组合物包括:

- (I) 第一核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NOs: 9、13、17 或 21 所示的轻链的 DNA; 以及
- (II) 第二核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NOs: 25、29 或 33 所示的重链的 DNA。

在某些实施方案中, 第一核酸分子包含与选自(I)中的第一核酸分子至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%或者 100%同源性的 DNA; 第二核酸分子包含与选自(II)中的第二核酸分子至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%或者 100%同源性的 DNA。

在某些实施方案中, 所述的核苷酸组合物包含:

- 1) 第一核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示的轻链的 DNA; 以及第二核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 25 所示的重链的 DNA;
- 2) 第一核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示的轻链的 DNA; 以及第二核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 29 所示的重链的 DNA;
- 3) 第一核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示的轻链的 DNA; 以及第二核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 33 所示的重链的 DNA;
- 4) 第一核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示的轻链的 DNA; 以及第二核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 25 所示的重链的 DNA;
- 5) 第一核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示的轻链的 DNA; 以及第二核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 29 所示的重链的 DNA;
- 6) 第一核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示的轻链的 DNA; 以及第二核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 33 所示的重链的 DNA;

- 7) 第一核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示的轻链的 DNA; 以及第二核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 25 所示的重链的 DNA;
- 8) 第一核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示的轻链的 DNA; 以及第二核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 29 所示的重链的 DNA;
- 5 9) 第一核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示的轻链的 DNA; 以及第二核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 33 所示的重链的 DNA;
- 10) 第一核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 21 所示的轻链的 DNA; 以及第二核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 25 所示的重链的 DNA;
- 11) 第一核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 21 所示的轻链的 DNA; 以及第二核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 29 所示的重链的 DNA;
- 12) 第一核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 21 所示的轻链的 DNA; 以及第二核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 33 所示的重链的 DNA;
- 13) 第一核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 37 所示的轻链的 DNA; 以及第二核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 35 所示的重链的 DNA;
- 14) 第一核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 39 所示的轻链的 DNA; 以及第二核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 35 所示的重链的 DNA;
- 15) 第一核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 50 所示的轻链的 DNA; 以及第二核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 52 所示的重链的 DNA; 或者
- 16) 第一核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 54 所示的轻链的 DNA; 以及第二核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 56 所示的重链的 DNA。

在某些实施方案中, 所述第一核酸分子以及第二核酸分子包含与选自 1)-16) 中第一核酸分子或第二核酸分子至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或者 100% 同源性的 DNA。

在某些实施方案中, 所述的核苷酸组合物包含:

- 25 第一核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示的轻链的 DNA; 以及第二核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 25 所示的重链的 DNA。

在某些实施方案中, 所述的核苷酸组合物包含:

第一核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示的轻链的 DNA; 以及第二核酸分子, 其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 29 所示的重链的 DNA。

- 30 在某些实施方案中, 所述的核苷酸组合物包含:

第一核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示的轻链的 DNA；以及第二核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 33 所示的重链的 DNA。

在某些实施方案中，所述的核苷酸组合物包含：

- 第一核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示的轻链的 DNA；以及第二核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 25 所示的重链的 DNA。

在某些实施方案中，所述的核苷酸组合物包含：

第一核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示的轻链的 DNA；以及第二核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 29 所示的重链的 DNA。

在某些实施方案中，所述的核苷酸组合物包含：

- 第一核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示的轻链的 DNA；以及第二核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 33 所示的重链的 DNA。

在某些实施方案中，所述的核苷酸组合物包含：

第一核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示的轻链的 DNA；以及第二核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 25 所示的重链的 DNA。

- 在某些实施方案中，所述的核苷酸组合物包含：

第一核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示的轻链的 DNA；以及第二核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 29 所示的重链的 DNA。

在某些实施方案中，所述的核苷酸组合物包含：

- 第一核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示的轻链的 DNA；以及第二核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 33 所示的重链的 DNA。

在某些实施方案中，所述的核苷酸组合物包含：

第一核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 21 所示的轻链的 DNA；以及第二核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 25 所示的重链的 DNA。

在某些实施方案中，所述的核苷酸组合物包含：

- 第一核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 21 所示的轻链的 DNA；以及第二核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 29 的重链的 DNA。

在某些实施方案中，所述的核苷酸组合物包含：

第一核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 21 所示的轻链的 DNA；以及第二核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 33 所示的重链的 DNA。

- 在某些实施方案中，所述的核苷酸组合物包含：

第一核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 37 所示的轻链的 DNA；以及第二核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 35 所示的重链的 DNA。

在某些实施方案中，所述的核苷酸组合物包含：

第一核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 39 所示的轻链的 DNA；以及第二核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 35 所示的重链的 DNA。

在某些实施方案中，所述的核苷酸组合物包含：

第一核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 50 所示的轻链的 DNA；以及第二核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 52 所示的重链的 DNA。

在某些实施方案中，所述的核苷酸组合物包含：

第一核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 54 所示的轻链的 DNA；以及第二核酸分子，其含有编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 56 所示的重链的 DNA。

在某些实施方案中，编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示的轻链的 DNA 如 SEQ ID NO: 10 所示。

在某些实施方案中，编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示的轻链的 DNA 如 SEQ ID NO: 14 所示。

在某些实施方案中，编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示的轻链的 DNA 如 SEQ ID NO: 18 所示。

在某些实施方案中，编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 21 所示的轻链的 DNA 如 SEQ ID NO: 22 所示。

在某些实施方式中，编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 37 所示的轻链的 DNA 如 SEQ ID NO: 38 所示。

在某些实施方式中，编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 39 所示的轻链的 DNA 如 SEQ ID NO: 40 所示。

在某些实施方式中，编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 50 所示的轻链的 DNA 如 SEQ ID NO: 51 所示。

在某些实施方式中，编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 54 所示的轻链的 DNA 如 SEQ ID NO: 55 所示。

在某些实施方式中，编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 25 所示的重链的 DNA 如 SEQ ID NO: 26 所示。

在某些实施方式中，编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 29 所示的重链的 DNA 如 SEQ ID NO: 30 所示。

在某些实施方式中，编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 33 所示的重链的 DNA 如 SEQ ID NO: 34 所示。

5 在某些实施方式中，编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 35 所示的重链的 DNA 如 SEQ ID NO: 36 所示。

在某些实施方式中，编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 52 所示的重链的 DNA 如 SEQ ID NO: 53 所示。

在某些实施方式中，编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 56 所示的重链的 DNA 如 SEQ ID NO: 10 57 所示。

再一方面，本发明提供一种载体，其含有如本发明所述的核苷酸组合物。

在某些实施方式中，所述的载体为真核表达载体、原核表达载体或病毒载体。

再一方面，本发明提供一种宿主细胞，其含有本发明所述的载体。

在一些实施方式中，含所述载体的宿主细胞是经载体转化获得的。

15 在一些实施方式中，所述宿主细胞为细菌、酵母或者哺乳动物细胞。

在一些实施方式中，所述宿主细胞为大肠杆菌、毕赤酵母、中国仓鼠卵巢细胞或人胚肾 293 细胞。

再一方面，本发明提供一种用于制备本发明所述的分离的抗体或其抗原结合部分的方法，所述方法包括在本发明所述的宿主细胞中表达所述抗体或其抗原结合片段，并分离所述抗体或其抗原结合片段。
20 合片段。

在又一方面，本发明提供一种药物组合物，其包括治疗有效治疗剂量的上述的分离的抗体或其抗原结合部分，以及药学上可接受的赋形剂。

在再一方面，本发明提供一种用于测量生物样品中 LIF 的试剂，其包含上述的分离的抗体或其抗原结合部分。

25 在某些实施方案中，生物样本为血液、血清、尿、活检材料、肿瘤或怀疑含有异常 LIF 水平的任意组织。

在另一方面，本发明提供一种抑制 LIF 表达和/或阻断 LIF 活性的方法，包括向有需要的病人给予有效治疗剂量的上述的分离的抗体或其抗原结合部分，和/或上述的药物组合物。

在又一方面，本发明提供上述分离的抗体或其抗原结合部分，和/或上述的药物组合物在治疗 30 药物中的用途，所述药物用于抑制 LIF 表达和/或阻断 LIF 活性。

在再一方面，本发明提供用于抑制 LIF 表达和/或阻断 LIF 活性的上述的分离的抗体或其抗原结合部分，和/或上述的药物组合物。

在另一方面，本发明提供一种治疗与 LIF 相关的疾病或病症的方法，所述方法包括向有需要的病人给予有效治疗剂量的上述的分离的抗体或其抗原结合部分，和/或上述的药物组合物。在某些实施方式中，与 LIF 相关的疾病为肿瘤。在一些实施方式中，所述肿瘤为实体瘤。在某些实施方式中，所述的实体瘤包括胶质母细胞瘤、肺癌、卵巢癌、结直肠癌、胰腺癌或前列腺癌。

在又一方面，本发明提供上述分离的抗体或其抗原结合部分，和/或上述的药物组合物在治疗与 LIF 相关的疾病或病症的药物中的用途。在某些实施方式中，与 LIF 相关的疾病为肿瘤。在某些实施方式中，所述肿瘤为实体瘤。在某些实施方式中，所述的实体瘤包括胶质母细胞瘤、肺癌、卵巢癌、结直肠癌、胰腺癌或前列腺癌。

在再一方面，本发明提供用于治疗与 LIF 相关的疾病或病症的上述的分离的抗体或其抗原结合部分，和/或上述的药物组合物。在某些实施方式中，与 LIF 相关的疾病为肿瘤。在某些实施方式中，所述肿瘤是实体瘤。在某些实施方式中，所述实体瘤包括胶质母细胞瘤、肺癌、卵巢癌、结直肠癌、胰腺癌或前列腺癌。

与 LIF 相关的疾病或病症是指阻断 LIF 与 LIRR 和/或 GP130 能够治疗、减轻、缓解和/或稳定该疾病或病症。

在另一方面，本发明提供一种检测生物样品中 LIF 的方法，包括：(i)获得受试者的组织或液体样品，(ii)暴露所述组织或液体样品到上述的分离的抗体或其抗原结合部分或上述的试剂；以及(iii)检测从 (ii) 中获得的所述组织或液体样品结合的 LIF 与对照样品结合的 LIF 进行对比，其中与对照进行对比的 LIF 结合量的增加显示 LIF 的生成、表达或激活的异常水平。

在某些实施方案中，其中所述组织或液体样品包括血液、血清、尿、活检材料、肿瘤或怀疑含有异常 LIF 水平的任意组织。

表 I 本发明抗体序列说明表

序列编号	序列
SEQ ID NO:1 (38E10E1C11、人源化抗 LIF 抗体或 38E Chimeric 的 LCDR1 aa)	RASENIYSYLA
SEQ ID NO:2 (38E10E1C11、人源化抗 LIF 抗体或 38E Chimeric 的 LCDR2 aa)	NAKTLAE

序列编号	序列
SEQ ID NO:3 (38E10E1C11、人源化抗 LIF 抗体或 38E Chimeric 的 LCDR3 aa)	QHHYVTPLT
SEQ ID NO:4 (38E10E1C11、人源化抗 LIF 抗体或 38E Chimeric 的 HCDR1 aa)	SYAMS
SEQ ID NO:5 (人源化抗 LIF 抗体的 HCDR2 aa)	TISSGGSNTYSPDTVKG
SEQ ID NO:6 (38E10E1C11、人源化抗 LIF 抗体或 38E Chimeric 的 HCDR3 aa)	YYGYYFDF
SEQ ID NO:7 (VL1, aa)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAWEYQK PGKSPKLLVYNKTLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ PEDFATYYCQHHYVTPLTFGQGTKLEIKR
SEQ ID NO:8 (VL1, nt)	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGC GCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAGG GCCAGCGAGAACATCTACAGCTACCTGGCCTGGTACC AGCAGAAGCCCGGCAAGAGCCCCAAGCTGCTGGTGT ACAACGCCAAGACCCTGGCCGAGGGCGTGCCAGCA GGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCT GACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACC TACTACTGCCAGCACCACTACGTGACCCCCCTGACCT TCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGAGG
SEQ ID NO:9(full light chain 1, aa)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAWEYQK PGKSPKLLVYNKTLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ PEDFATYYCQHHYVTPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

序列编号	序列
SEQ ID NO:10(full light chain 1, nt)	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGC GCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAGG GCCAGCGAGAACATCTACAGCTACCTGGCCTGGTACC AGCAGAAGCCCGGCAAGAGCCCCAAGCTGCTGGTGT ACAACGCCAAGACCCTGGCCGAGGGCGTGCCAGCA GGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCT GACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACC TACTACTGCCAGCACCACTACGTGACCCCCCTGACCT TCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGAGGACCG TGGCCGCCCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGA CGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTG CCTGCTGAACAACCTTCTACCCAGGGAGGCCAAGGTG CAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAAC AGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGAC AGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGC AAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGGTGTACGCCTGC GAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCAGCCCCGTGACC AAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC
SEQ ID NO:11 (VL2, aa)	DIHMTQSPSSLSASVGDRTITCRASENIYSYLAWYQQK PGKSPKLLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ PEDFATYYCQHHYVTPITFGQGTEKLEIKR
SEQ ID NO:12 (VL2, nt)	GACATCCACATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGC GCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAGG GCCAGCGAGAACATCTACAGCTACCTGGCCTGGTACC AGCAGAAGCCCGGCAAGAGCCCCAAGCTGCTGGTGT ACAACGCCAAGACCCTGGCCGAGGGCGTGCCAGCA GGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCT GACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACC TACTACTGCCAGCACCACTACGTGACCCCCCTGACCT TCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGAGG
SEQ ID NO:13 (full light chain 2, aa)	DIHMTQSPSSLSASVGDRTITCRASENIYSYLAWYQQK PGKSPKLLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ PEDFATYYCQHHYVTPITFGQGTEKLEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVCLLNFPYFQPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

序列编号	序列
SEQ ID NO:14 (full light chain 2, nt)	GACATCCACATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGC GCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAGG GCCAGCGAGAACATCTACAGCTACCTGGCCTGGTACC AGCAGAAGCCCGGCAAGAGCCCCAAGCTGCTGGTGT ACAACGCCAAGACCCTGGCCGAGGGCGTGCCAGCA GGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCT GACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACC TACTACTGCCAGCACCACTACGTGACCCCCCTGACCT TCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGAGGACCG TGGCCGCCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGA CGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTG CCTGCTGAACAACCTTCTACCCAGGGAGGCCAAGGTG CAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAAC AGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGAC AGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGC AAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGGTGTACGCCTGC GAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCAGCCCCGTGACC AAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC
SEQ ID NO:15 (VL3, aa)	DIHMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAWYQQK PGKSPQLLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFTLTISLQ PEDFATYYCQHHYVTPFTFGQGTKLEIKR
SEQ ID NO:16 (VL3, nt)	GACATCCACATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGC GCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAGG GCCAGCGAGAACATCTACAGCTACCTGGCCTGGTACC AGCAGAAGCCCGGCAAGAGCCCCCAGCTGCTGGTGT ACAACGCCAAGACCCTGGCCGAGGGCGTGCCAGCA GGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCCAGTTCACCCT GACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACC TACTACTGCCAGCACCACTACGTGACCCCCCTGACCT TCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGAGG
SEQ ID NO:17 (full light chain 3, aa)	DIHMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAWYQQK PGKSPQLLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFTLTISLQ PEDFATYYCQHHYVTPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

序列编号	序列
SEQ ID NO:18 (full light chain 3, nt)	GACATCCACATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGC GCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAGG GCCAGCGAGAACATCTACAGCTACCTGGCCTGGTACC AGCAGAAGCCCGGCAAGAGCCCCCAGCTGCTGGTGT ACAACGCCAAGACCCTGGCCGAGGGCGTGCCAGCA GGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCCAGTTCACCCT GACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACC TACTACTGCCAGCACCACTACGTGACCCCCCTGACCT TCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGAGGACCG TGGCCGCCCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGA CGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTG CCTGCTGAACAACCTTCTACCCAGGGAGGCCAAGGTG CAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAAC AGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGAC AGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGAGC AAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGGTGTACGCCTGC GAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCAGCCCCGTGACC AAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC
SEQ ID NO:19(VL4, aa)	DIHMTQSPSSLSASVGDRTITCRASENIYSYLAWYQQK QGKSPQLLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFTLKINSL QPEDFATYYCQHHYVTPLTFGQGQTKLEIKR
SEQ ID NO:20(VL4, nt)	GACATCCACATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGC GCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAGG GCCAGCGAGAACATCTACAGCTACCTGGCCTGGTACC AGCAGAAGCAGGGCAAGAGCCCCCAGCTGCTGGTGT ACAACGCCAAGACCCTGGCCGAGGGCGTGCCAGCA GGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCCAGTTCACCCT GAAGATCAACAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCAC CTACTACTGCCAGCACCACTACGTGACCCCCCTGACC TTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGAGG
SEQ ID NO:21(full light chain 4, aa)	DIHMTQSPSSLSASVGDRTITCRASENIYSYLAWYQQK QGKSPQLLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFTLKINSL QPEDFATYYCQHHYVTPLTFGQGQTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

序列编号	序列
SEQ ID NO:22(full light chain 4, nt)	GACATCCACATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGC GCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAGG GCCAGCGAGAACATCTACAGCTACCTGGCCTGGTACC AGCAGAAGCAGGGCAAGAGCCCCCAGCTGCTGGTGT ACAACGCCAAGACCCTGGCCGAGGGCGTGCCAGCA GGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCCAGTTCACCCT GAAGATCAACAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCAC CTACTACTGCCAGCACCACTACGTGACCCCCCTGACC TTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGAGGACC GTGGCCGCCCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCG ACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGT GCCTGCTGAACAACTTCTACCCAGGGAGGCCAAGGT GCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAA CAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGA CAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGAGC AAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGGTGTACGCCTGC GAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCAGCCCCGTGACC AAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC
SEQ ID NO:23(VH1, aa)	EVMLLSEGGGLVQPGGSLRLSCAASGFIFSSYAMS WVRQAPGTGLEWVATISSGGSNTYSPDTVKGRTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYYGYYFD FWGQGTLTLTVSS
SEQ ID NO:24(VH1, nt)	GAGGTGATGCTGCTGGAGAGCGGCGGGCGGCCTG GTGCAGCCCGGGCGGCAGCCTGAGGCTGAGCTGCG CCGCCAGCGGCTTCATCTTCAGCAGCTACGCCAT GAGCTGGGTGAGGCAGGCCCCCGGCACCGGCCTG GAGTGGGTGGCCACCATCAGCAGCGGCGGCAGC AACACCTACAGCCCCGACACCGTGAAGGGCAGGT TCACCATCAGCAGGGACAACAGCAAGAACACCCT GTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGA CACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGTACTACGGC TACTACTTCGACTTCTGGGGCCAGGGCACCCCTGC TGACCGTGAGCAGC

序列编号	序列
SEQ ID NO:25(full heavy chain 1, aa)	EVMLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFIFSSYAMS WVRQAPGTGLEWVATISSGGSNTYSPDTVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYYGYYFD FWGQGTLTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY ASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

序列编号	序列
SEQ ID NO:26(full heavy chain 1, nt)	GAGGTGATGCTGCTGGAGAGCGGCGGCGGCCTG GTGCAGCCCGGCGGCAGCCTGAGGCTGAGCTGCG CCGCCAGCGGCTTCATCTTCAGCAGCTACGCCAT GAGCTGGGTGAGGCAGGCCCCCGGCACCGGCCTG GAGTGGGTGGCCACCATCAGCAGCGGCGGCAGC AACACCTACAGCCCCGACACCGTGAAGGGCAGGT TCACCATCAGCAGGGACAACAGCAAGAACACCCT GTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGA CACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGTACTACGGC TACTACTTCGACTTCTGGGGCCAGGGCACCCCTGC TGACCGTGAGCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCA GCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCAC CAGCGGCGGCACCGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTG AAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGAGCT GGAACAGCGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACA CCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCTGTA CAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCAGCAGC AGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGA ACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA AGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACA CCTGCCCCCCCCCTGCCCCGCCCCGAGCTGCTGGG CGGCCCCAGCGTGTTCTGTTCCCCCCCCAAGCCC AAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAG GTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGG ACCCCGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG CGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAG GGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGT GAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTG AACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAAC AAGGCCCTGCCCCGCCCCATCGAGAAGACCATCA GCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGGGAGCCCCAGG TGACACCCCTGCCCCCAGCAGGGAGGAGATGAC CAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTGAAG GGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG AGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAATAACAAGA CCACCCCCCCCCGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTT CTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGC AGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTACGTGCAGCG TGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCA GAAGAGCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG

序列编号	序列
SEQ ID NO:27(VH2 , aa)	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFIFSSYAMSWVR QAPGTGLEWVATISSGGSNTYSPDTVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAMYYCARYYGYYFDFWGQGTLT TVSS
SEQ ID NO:28(VH2 , nt)	GAGGTGATGCTGGTGGAGAGCGGCGGCCTGGTG CAGCCCGGCGGCAGCCTGAGGCTGAGCTGCGCCGCC AGCGGCTTCATCTTCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGG TGAGGCAGGCCCCCGGCACCGGCCTGGAGTGGGTGG CCACCATCAGCAGCGGCGGCAGCAACACCTACAGCC CCGACACCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGG ACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACA GCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCATGTACTACTGCG CCAGGTACTACGGCTACTACTTCGACTTCTGGGGCCA GGGCACCCTGCTGACCGTGAGCAGC
SEQ ID NO:29(full heavy chain 2 , aa)	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFIFSSYAMSWVR QAPGTGLEWVATISSGGSNTYSPDTVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAMYYCARYYGYYFDFWGQGTLT TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

序列编号	序列
SEQ ID NO:30 (full heavy chain 2, nt)	GAGGTGATGCTGGTGGAGAGCGGCGGCGGCCTGGTG CAGCCCGGCGGCAGCCTGAGGCTGAGCTGCGCCGCC AGCGGCTTCATCTTCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGG TGAGGCAGGCCCCCGGCACCGGCCTGGAGTGGGTGG CCACCATCAGCAGCGGCGGCAGCAACACCTACAGCC CCGACACCGTGAAGGGCAGGTTCACCATCAGCAGGG ACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACA GCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCATGTACTACTGCG CCAGGTACTACGGCTACTACTTCGACTTCTGGGGCCA GGGCACCCTGCTGACCGTGAGCAGCGCCAGCACCAA GGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAG AGCACCAGCGGCGGCACCGCCGCCCTGGGCTGCCTG GTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGAGCT GGAACAGCGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCT TCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCT GAGCAGCGTGGTGACCGTGCCAGCAGCAGCCTGGG CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCC AGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAG AGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCCG CCCCCGAGCTGCTGGGCGGCCCCAGCGTGTTCCTGTT CCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAG GACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCC CAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGT GAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAA CGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGC CCTGCCCCCCCCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGC CAAGGGCCAGCCAGGGAGCCCCAGGTGTACACCCT GCCCCCAGCAGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGT GAGCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCC GAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCCTGCTGGAC AGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCG TGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCA GCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACT ACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO:31 (VH3, aa)	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFISSYAMS WVRQAPETRLWVATISSGGSNTYSPDTVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCARYYGYFD FWGQGTLTLTVSS

序列编号	序列
SEQ ID NO:32(VH3 ,nt)	GAGGTGATGCTGGTGGAGAGCGGCGGCGGCCTG GTGCAGCCCGGCGGCAGCCTGAGGCTGAGCTGCG CCGCCAGCGGCTTCATCTTCAGCAGCTACGCCAT GAGCTGGGTGAGGCAGGCCCCGAGACCAGGCT GGAGTGGGTGGCCACCATCAGCAGCGGCGGCAG CAACACCTACAGCCCCGACACCGTGAAGGGCAG GTTACCATCAGCAGGGACAACAGCAAGAACAC CCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAG GACACCGCCATGTACTACTGCGCCAGGTACTACG GCTACTACTTCGACTTCTGGGGCCAGGGCACCT GCTGACCGTGAGCAGC
SEQ ID NO:33(full heavy chain 3 , aa)	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFISSYAMS WVRQAPETRLEWVATISSGGSNTYSPDTVKGRTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCARYYGYFD FWGQGTLTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY ASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

序列编号	序列
SEQ ID NO:34(full heavy chain 3 , nt)	GAGGTGATGCTGGTGGAGAGCGGCGGCGGCCTGGTG CAGCCCGGCGGCAGCCTGAGGCTGAGCTGCGCCGCC AGCGGCTTCATCTTCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGG TGAGGCAGGCCCCCGAGACCAGGCTGGAGTGGGTGG CCACCATCAGCAGCGGCGGCAGCAACACCTACAGCC CCGACACCGTGAAGGGCAGGTTCACCATCAGCAGGG ACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACA GCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCATGTACTACTGCG CCAGGTACTACGGCTACTACTTCGACTTCTGGGGCCA GGGCACCCCTGCTGACCGTGAGCAGCGCCAGCACCAA GGGCCCCAGCGTGTTCCTCCCTGGCCCCCAGCAGCAAG AGCACCAGCGGCGGCACCGCCGCCCTGGGCTGCCTG GTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGAGCT GGAACAGCGGCGGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCT TCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCT GAGCAGCGTGGTGACCGTGCCAGCAGCAGCCTGGG CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCC AGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCCAAG AGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCCG CCCCCGAGCTGCTGGGCGGCCCCAGCGTGTTCTGT CCCCCCAAGCCCAAGGACACCCCTGATGATCAGCAG GACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCC CAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGT GAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAA CGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGC CCTGCCCCGCCCCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGC CAAGGGCCAGCCCAGGGAGCCCCAGGTGTACACCCT GCCCCCAGCAGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGT GAGCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCC GAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCGTGCTGGAC AGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCG TGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCA GCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACT ACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG

序列编号	序列
SEQ ID NO:35(38E HuH3L2-m or 38E HuH3L4-m full heavy chain,aa)	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFISSYAMSWVR QAPETRLLEWVATISSGGSNTYSPDTVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAMYYCARYYGYYFDWGGQTLL TVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFP EPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTPSS TWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVP EVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQF SWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDW LNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPP PKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAEN YKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVNPKSNWEAGNTFTCSV LHEGLHNHHTTEKSLSHSPGK

序列编号	序列
SEQ ID NO:36(38E HuH3L2-m or 38E HuH3L4-m full heavy chain, nt)	GAGGTGATGCTGGTGGAGAGCGGCGGCGGCCTGGTG CAGCCCGGCGGCAGCCTGAGGCTGAGCTGCGCCGCC AGCGGCTTCATCTTCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGG TGAGGCAGGCCCCCGAGACCAGGCTGGAGTGGGTGG CCACCATCAGCAGCGGCGGCAGCAACACCTACAGCC CCGACACCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGG ACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACA GCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCATGTACTACTGCG CCAGGTACTACGGCTACTACTTCGACTTCTGGGGCCA GGGCACCCTGCTGACCGTGAGCAGCGCCAAGACCAC CCCCCCCAGCGTGTACCCCTGGCCCCCGGCAGCGCC GCCCAGACCAACAGCATGGTGACCCTGGGCTGCCTG GTGAAGGGCTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGACCT GGAACAGCGGCAGCCTGAGCAGCGGCGTGACACCT TCCCCGCCGTGCTGCAGAGCGACCTGTACACCCTGAG CAGCAGCGTGACCGTGCCCAGCAGCACCTGGCCCAG CGAGACCGTGACCTGCAACGTGGCCCAACCCGCCAG CAGCACCAAGGTGGACAAGAAGATCGTGCCCAGGGA CTGCGGCTGCAAGCCCTGCATCTGCACCGTGCCCGAG GTGAGCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCCAAGCCCAAGG ACGTGCTGACCATCACCTGACCCCCAAGGTGACCTG CGTGGTGGTGGACATCAGCAAGGACGACCCCGAGGT GCAGTTCAGCTGGTTCGTGGACGACGTGGAGGTGCAC ACCGCCCAGACCCAGCCAGGGAGGAGCAGTTCAAC AGCACCTTCAGGAGCGTGAGCGAGCTGCCCATCATGC ACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTTCAAGTGCA GGGTGAACAGCGCCGCCTTCCCCGCCCCCATCGAGAA GACCATCAGCAAGACCAAGGGCAGGCCCAAGGCCCC CCAGGTGTACACCATCCCCCCCCCAAGGAGCAGATG GCCAAGGACAAGGTGAGCCTGACCTGCATGATCACC GACTTCTTCCCCGAGGACATCACCGTGGAGTGGCAGT GGAACGGCCAGCCCGCCGAGAACTACAAGAACACCC AGCCCATCATGGACACCGACGGCAGCTACTTCGTGTA CAGCAAGCTGAACGTGCAGAAGAGCAACTGGGAGGC CGGCAACACCTTCACCTGCAGCGTGCTGCACGAGGGC CTGCACAACCACACCGAGAAGAGCCTGAGCCAC AGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO:37 (38E HuH3L2-m full light chain, aa)	DIHMTQSPSSLSASVGDRTITCRASENIYSYLAWYQQK PGKSPKLLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ PEDFATYYCQHHYVTPITFGQGTLKLEIKRADAAPTVSIF PPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQN GVLNSWTDQDSKSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCE ATHKTSTSPIVKSFNRECE

序列编号	序列
SEQ ID NO:38 (38E HuH3L2-m full light chain, nt)	GACATCCACATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGC GCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAGG GCCAGCGAGAACATCTACAGCTACCTGGCCTGGTACC AGCAGAAGCCCGGCAAGAGCCCCAAGCTGCTGGTGT ACAACGCCAAGACCCTGGCCGAGGGCGTGCCAGCA GGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCT GACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACC TACTACTGCCAGCACCACTACGTGACCCCCCTGACCT TCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGAGGGCCG ACGCCGCCCCACCGTGAGCATCTTCCCCCCCAGCAG CGAGCAGCTGACCAGCGGCGGCCAGCGTGGTGTG CTTCCTGAACAATTCTACCCCAAGGACATCAACGTG AAGTGGAAGATCGACGGCAGCGAGAGGCAGAACGGC GTGCTGAACAGCTGGACCGACCAGGACAGCAAGGAC AGCACCTACAGCATGAGCAGCACCTGACCCTGACC AAGGACGAGTACGAGAGGCACAACAGCTACACCTGC GAGGCCACCCACAAGACCAGCACCAGCCCCATCGTG AAGAGCTTCAACAGGAACGAGTGC
SEQ ID NO:39(38E HuH3L4-m full light chain, aa)	DIHMTQSPSSLSASVGDRTITCRASENIYSYLAWYQQK QGKSPQLLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFTLKINSL QPEDFATYYCQHYYVTPLTFGQGTKLEIKRADAAPTVSI FPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQ NGVLNSWTDQDSKSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTC EATHKTSTSPIVKSFNRENC
SEQ ID NO:40 (38E HuH3L4-m full light chain, nt)	GACATCCACATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGC GCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAGG GCCAGCGAGAACATCTACAGCTACCTGGCCTGGTACC AGCAGAAGCAGGGCAAGAGCCCCCAGCTGCTGGTGT ACAACGCCAAGACCCTGGCCGAGGGCGTGCCAGCA GGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCCAGTTCACCCT GAAGATCAACAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCAC CTACTACTGCCAGCACCACTACGTGACCCCCCTGACC TTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGAGGACC GTGGCCGCCCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCG ACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGT GCCTGCTGAACAATTCTACCCAGGGAGGCCAAGGT GCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAA CAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGA CAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGC AAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGC GAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCAGCCCCGTGACC AAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC

序列编号	序列
SEQ ID NO:41 (38E10E1C11 full light chain aa)	DIHMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLAWYQQK QGKSPQLLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSL QPEDFGSYQCQHHYVTPLTFGAGTKLELKRADAAPTVS IFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSR QNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYT CEATHKTSTSPIVKSFNRECE
SEQ ID NO:42 (38E10E1C11 full light chain nt)	GACATCCACATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTG CATCTGTGGGAGAACTGTCACCATCACATGTCGAGC AAGTGAGAATATTTACAGTTATTTAGCATGGTATCAG CAGAAACAGGGAAAATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATA ATGCAAAAACCTTAGCAGAAGGTGTGCCATCAAGGT TCAGTGGCAGTGGATCAGGCACACAGTTTTCTCTGAA GATCAACAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGGGAGTTAT TACTGTCAACATCATTATGTTACTCCGCTCACGTTCCG TGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGGGCTGATGC TGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAG CAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCT TGAACAACCTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTG GAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCTCT GAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCAC CTACAGCATGAGCAGCACCTCACGTTGACCAAGGA CGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGC CACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGC TTCAACAGGAATGAGTGT
SEQ ID NO:43 (38E10E1C11 full heavy chain aa)	EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFISSYAMSWVR QSPETRLWEVATISSGGSNTYSPDSVKGRFTISRDNKN TLYLQMSSLRSEDAMYYCARYYGYFDYFDWGQGTTLT VSSAKTTPPSVYPLAPGSAQAQNSMVTLGCLVKGYFPEP VTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSVTPVPSSTW PSETVTCNVAHPASSTKVDKIVPRDCGCKPCICTVPEV SSVFIFPPKPKDVLITLTLPKVTCTVVDISKDDPEVQFSW FVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLN GKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPK EQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYK NTQPIMDTDGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSVLHE GLHNHHTTEKSLSHSPGK

序列编号	序列
SEQ ID NO:44(38E10E1C11 full heavy chain nt)	GAAGTGATGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTG AAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCT CTGGATTCATTTTCAGTAGTTATGCCATGTCTTGGGTT CGCCAGAGTCCGGAGACGAGGCTGGAGTGGGTTCGCA ACCATTAGTAGTGGTGGTAGTAACACCTACTCTCCAG ACAGTGTGAAGGGGCGATTACCATCTCCAGAGACA ATGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCT GAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAG ATATTATGGTTACTACTTTGACTTCTGGGGCCAAGGC ACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCC CATCTGTCTATCCACTGGCCCCCTGGATCTGCTGCCCA AACTAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAG GGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAAC CTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGC TGTCTGCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCA GTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCGAGACCG TCACCTGCAACGTTGCCACCCGCCCAGCAGCACCAA GGTGGACAAGAAAATTGTGCCCAGGGATTGTGGTTGT AAGCCTTGACATATGTACAGTCCCAGAAAGTATCATCTG TCTTCATCTTCCCCCCTAAAGCCCAAGGATGTGCTCAC CATTACTCTGACTCCTAAGGTCACGTGTGTTGTGGTA GACATCAGCAAGGATGATCCCGAGGTCCAGTTCAGCT GGTTTGTAGATGATGTGGAGGTGCACACAGCTCAGAC GCAACCCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACTTTCCG CTCAGTCAGTGAACCTCCCATCATGCACCAGGACTGG CTCAATGGCAAGGAGTTCAAATGCAGGGTCAACAGT GCAGCTTTCCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCA AAACCAAAGGCAGACCGAAGGCTCCACAGGTGTACA CCATTCCACCTCCCAAGGAGCAGATGGCCAAGGATA AAGTCAGTCTGACCTGCATGATAACAGACTTCTTCCC TGAAGACATTACTGTGGAGTGGCAGTGGAATGGGCA GCCAGCGGAGAACTACAAGAACTCAGCCCATCAT GGACACAGATGGCTCTTACTTCGTCTACAGCAAGCTC AATGTGCAGAAGAGCAACTGGGAGGCAGGAAATACT TTCACCTGCTCTGTGTTACATGAGGGCCTGCACAACC ACCATACTGAGAAGAGCCTCTCCCACTCTCCTGGTAA A
SEQ ID NO:45 (38E10E1C11 或 38E Chimeric HCDR2 aa)	TISSGGSNTYSPDSVKG
SEQ ID NO:46 (38E Chimeric VL aa)	DIHMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLAWYQQK QGKSPQLLVYNAKTAEVPSRFSGSGSGTQFSLKINSL QPEDFGSYQCQHHYVTPITFGAGTKLELKR

序列编号	序列
SEQ ID NO:47 (38E Chimeric VL nt)	GACATCCACATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTG CATCTGTGGGAGAACTGTCACCATCACATGTCGAGC AAGTGAGAATATTTACAGTTATTTAGCATGGTATCAG CAGAAACAGGGAAAATCTCCTCAGCTCCTGTCTATAA TGCAAAAACCTTAGCAGAAGGTGTGCCATCAAGGTTT AGTGGCAGTGGATCAGGCACACATTTTCTCTGAAGAT CAACAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGGGAGTTATTAC TGTCAACATCATTATGTTACTCCGCTCACGTTCCGGTGC TGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGGGC
SEQ ID NO:48 (38E Chimeric VH aa)	EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFIFSSYAMSWVR QSPETRLEWVATISSGGSNTYSPDSVKGRFTISRDNKN TLYLQMSSLRSEDAMYYCARYYGYFDWVGQGTTLT VSS
SEQ ID NO:49 (38E Chimeric VH nt)	GAAGTGATGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTG AAGCCTGGAGGGTCCCTGAACTCTCCTGTGCAGCCT CTGGATTCATTTTCAGTAGTTATGCCATGTCTTGGGTT CGCCAGAGTCCGGAGACGAGGCTGGAGTGGGTTCGCA ACCATTAGTAGTGGTGGTAGTAACACCTACTCTCCAG ACAGTGTGAAGGGGCGATTACCATCTCCAGAGACA ATGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCT GAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAG ATATTATGGTTACTACTTTGACTTCTGGGGCCAAGGC ACCACTCTCACAGTCTCCTCA
SEQ ID NO:50 (38E Chimeric full light chain aa)	DIHMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLAWYQQK QGKSPQLLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSL QPEDFGSYQCQHHYVTPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

序列编号	序列
SEQ ID NO:51 (38E Chimeric full light chain nt)	GACATCCACATGACCCAGAGCCCCGCCAGCCTGAGC GCCAGCGTGGGCGAGACCGTGACCATCACCTGCAGG GCCAGCGAGAACATCTACAGCTACCTGGCCTGGTACC AGCAGAAGCAGGGCAAGAGCCCCCAGCTGCTGGTGT ACAACGCCAAGACCCTGGCCGAGGGCGTGCCAGCA GGTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCCAGTTCAGCC TGAAGATCAACAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGGCA GCTACTACTGCCAGCACCACTACGTGACCCCCCTGAC CTTCGGCGCCGGCACCAAGCTGGAGCTGAAGAGGAC CGTGGCCGCCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGC GACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTG TGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCAGGGAGGCCAAGG TGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCA ACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGG ACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGA GCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCT GCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCAGCCCCGTGA CCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC
SEQ ID NO:52 (38E Chimeric full heavy chain aa)	EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFIFSSYAMSWVR QSPETRLEWVATISSGGSNTYSPDSVKGRFTISRDNKN TLYLQMSSLRSEDAMYYCARYYGYDFWVGQGTTLT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

序列编号	序列
SEQ ID NO:53 (38E Chimeric full heavy chain nt)	GAGGTGATGCTGGTGGAGAGCGGCGGCGGCCTGGTG AAGCCCGGCGGCAGCCTGAAGCTGAGCTGCGCCGCC AGCGGCTTCATCTTCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGG TGAGGCAGAGCCCCGAGACCAGGCTGGAGTGGGTGG CCACCATCAGCAGCGGCGGCAGCAACACCTACAGCC CCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGG ACAACGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAGCA GCCTGAGGAGCGAGGACACCGCCATGTACTACTGCG CCAGGTACTACGGCTACTACTTCGACTTCTGGGGCCA GGGCACCACCCTGACCGTGAGCAGCGCCAGCACCAA GGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAG AGCACCAGCGGCGGCACCGCCGCCCTGGGCTGCCTG GTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGAGCT GGAACAGCGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCT TCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCT GAGCAGCGTGGTGACCGTGCCAGCAGCAGCCTGGG CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCC AGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAG AGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCCG CCCCCGAGCTGCTGGGCGGCCCCAGCGTGTTCTGT CCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCCTGATGATCAGCAG GACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCC CAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGT GAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAA CGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGC CCTGCCCCGCCCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGC CAAGGGCCAGCCCAGGGAGCCCCAGGTGTACACCCT GCCCCCAGCAGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGT GAGCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCC GAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCGTGCTGGAC AGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCG TGGAACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCA GCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACT ACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO:54 (P36-033 full light chain aa)	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSNVAVWYQ QKPGQSPRLLIYWASFRHTGVPDRFTGSGSGTEYTLTIS RVQAEDLALYYCQQHYNTPYTFGGGTRLEIKRADAAPT VSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKIDINVKWKIDGSE RQNGVLNSWTDQDSKSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNS YTCEATHKSTSTSPIVKSFNRECE

序列编号	序列
SEQ ID NO:55 (P36-033 full light chain nt)	GACATCGTGATGACCCAGTCCCACAAGTTCATGAGCA CCAGCGTGGGCGATCGGGTGTCCATCACCTGTAAGGC CTCCCAGGACGTGAGCAACGCCGTGGCCTGGTATCAG CAGAAGCCTGGCCAGTCCCCTCGGCTGCTGATCTATT GGGCTTCCTTCAGGCACACCGGCGTGCCCGATCGGTT CACCGGCTCCGGATCCGGCACCGAGTATACCTGACC ATCTCCCGGGTGCAGGCCGAGGATCTGGCTCTGTATT ATTGTCAGCAGCACTACAATACCCCCTACACCTTCGG CGGCGGCACCAGGCTGGAGATCAAGAGAGCTGATGC TGCCCCCACCCTGAGCATCTTCCCTCCCTCCAGCGAG CAGCTGACCTCCGGCGGAGCCTCCGTGGTGTGCTTCC TGAACAACCTTCTACCCCAAGGATATCAACGTGAAGTG GAAGATCGACGGCAGCGAGCGGCAGAATGGCGTGCT GAACTCCTGGACCGACCAGGACAGCAAGGACTCCAC CTATTCCATGTCCTCCACCCTGACCCTGACCAAGGAT GAGTACGAGCGGCACAACAGCTATACCTGTGAGGCC ACCCACAAGACCTCCACCTCCCCCATCGTGAAGTCCT TCAATAGGAATGAGTGC
SEQ ID NO:56 (P36-033 full heavy chain aa)	EVMLVESGGGLVQPGGSRRLSCAASGFTFSSYPMFWVR QTPEKRMWVAYISNGGDSTYYPD TVKGRFTVSRDNA KNTLYLQMSSLKSVDTAIYYCVRPSARYDEWFAYWGQ GTLVTVSAAKTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVK GYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVT VPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKIVPRDCGCKPCI CTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTCTVVVDISKDDP EVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMH QDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQV YTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQ PAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTF TCSVLHEGLHNHTEKSLSHSPGK

序列编号	序列
SEQ ID NO:57 (P36-033 full heavy chain nt)	GAGGTGATGCTGGTGGAGAGCGGCGGCGGCCTGGTG CAGCCCGGCGGCAGCAGGAGGCTGAGCTGCGCCGCC AGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACCCCATGTTCTGGG TGAGGCAGACCCCGAGAAGAGGATGGAGTGGGTGG CCTACATCAGCAACGGCGGCGACAGCACCTACTACCC CGACACCGTGAAGGGCAGGTTCACCGTGAGCAGGGA CAACGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAGCAG CCTGAAGAGCGTGGACACCGCCATCTACTACTGCGTG AGGCCCAGCGCCAGGTACGACGAGTGGTTCGCCTACT GGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAGCAGCGCCA AGACCACCCCCCCCAGCGTGTACCCCTGGCCCCCGG CAGCGCCGCCAGACCAACAGCATGGTGACCCTGGG CTGCCTGGTGAAGGGCTACTTCCCCGAGCCCGTGACC GTGACCTGGAACAGCGGCAGCCTGAGCAGCGGCGTG CACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCGACCTGTACA CCCTGAGCAGCAGCGTGACCGTGCCCAGCAGCACCT GGCCCAGCGAGACCGTGACCTGCAACGTGGCCCACC CCGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAGATCGTGC CCAGGGACTGCGGCTGCAAGCCCTGCATCTGCACCGT GCCCAGGTGAGCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCCAAG CCCAAGGACGTGCTGACCATCACCTGACCCCCAAGG TGACCTGCGTGGTGGTGGACATCAGCAAGGACGACC CCGAGGTGCAGTTCAGCTGGTTCGTGGACGACGTGGA GGTGCACACCGCCCAGACCCAGCCCAGGGAGGAGCA GTTCAACAGCACCTTCAGGAGCGTGAGCGAGCTGCCC ATCATGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTTC AAGTGCAGGGTGAACAGCGCCGCCTTCCCCGCCCCCA TCGAGAAGACCATCAGCAAGACCAAGGGCAGGCCCCA AGGCCCCCAGGTGTACACCATCCCCCCCCCAAGGA GCAGATGGCCAAGGACAAGGTGAGCCTGACCTGCAT GATCACCGACTTCTTCCCCGAGGACATCACCGTGGAG TGGCAGTGGAACGGCCAGCCCGCCGAGAACTACAAG AACACCCAGCCCATCATGGACACCGACGGCAGCTAC TTCGTGTACAGCAAGCTGAACGTGCAGAAGAGCAAC TGGGAGGCCGGCAACACCTTCACCTGCAGCGTGCTGC ACGAGGGCCTGCACAACCACCACACCGAGAAGAGCC TGAGCCACAGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO:58 (Human LIF aa)	MKVLAAGVVPLLLVLHWKHGAGSPLPITPVNATCAIRH PCHNNLMNQIRSQLAQLNGSANALFIFYTAQGEPPFN NLDKLCGPNVTDFFPFHANGTEKAKLVELYRIVVYLG SLGNITRDQKILNPSALSLHSLNATADILRGLLSNVLCR LCSKYHVGHVDTYGPDTSGKDVVFQKKKLGCQLLGKY KQIIAVLAQAF

序列编号	序列
SEQ ID NO:59 (Mut3 aa)	MKVLAAGVVPLLLVLHWKHGAGSPLPITPVNATCAIRH PCHNNLMNQIRSQLAQLNGSANALFILYYTAQGEPFN NLDKLCGPNVTDFFPFHANGTEKAKLVELYRIVVYLG SLGNITRDQKILNPSALSLSKLNATADILRGLLSNVLCR LCSKYHVGHVDTVYGPDTSGKDVFQKKKLGCQLLGT KQVISVVVQAF
SEQ ID NO:60 (Mut4 aa)	MKVLAAGVVPLLLVLHWKHGAGSPLPITPVNATCAIRH PCHNNLMNQIRSQLAQLNGSANALFILYYTAQGEPFN NLDKLCGPNVTDFFPFHANGTEKAKLVELYRIVVYLG SLGNITRDQKILNPSALSLSKLNATADILRGLLSNVLCR LCSKYHVGHVDPVPPVDPHSDKEAFQRKKLGCQLLGT KQVISVVVQAF
SEQ ID NO:61	TYGPDTSGKDVFQKK
SEQ ID NO:62 (5D8 full heavy chain aa)	QVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSHAWMHWV RQAPGKGLEWVGQIKAKSDDYATYYAESVKGRFTISR DSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTCWEWDLDFWGGQ TMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

序列编号	序列
SEQ ID NO:63 (5D8 full heavy chain nt)	CAGGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCGGCGGCCTGGTG AAGCCCGGCGGCAGCCTGAGGCTGAGCTGCGCCGCC AGCGGCTTCACCTTCAGCCACGCCTGGATGCACTGGG TGAGGCAGGCCCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGG GCCAGATCAAGGCCAAGAGCGACGACTACGCCACCT ACTACGCCGAGAGCGTGAAGGGCAGGTTCACCATCA GCAGGGACGACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGA TGAACAGCCTGAAGACCGAGGACACCGCCGTGTACT ACTGCACCTGCTGGGAGTGGGACCTGGACTTCTGGGG CCAGGGCACCATGGTGACCGTGAGCAGCGCCAGCAC CAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTTGGCCCCCAGCAGC AAGAGCACCAGCGGCGGCACCGCCGCCCTGGGCTGC CTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGA GCTGGAACAGCGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACA CCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAG CCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCAGCAGCAGCCT GGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAA GCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGGGTGGAGCC CAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGC CCCGCCCCCGAGCTGCTGGGCGGCCCCAGCGTGTTC TGTTCCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAG CAGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGT GAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCAACTGGTA CGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAA GCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGT GGTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTG AACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAG GCCCTGCCCCGCCCCATCGAGAAGACCATCAGCAAG GCCAAGGGCCAGCCCAGGGAGCCCCAGGTGTACACC CTGCCCCCAGCAGGGAGGAGATGACCAAGAACCAG GTGAGCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCA GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGC CCGAGAACAATAACAAGACCACCCCCCGTGCTGG ACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGAC CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTT CAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCA CTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAA G

序列编号	序列
SEQ ID NO:64 (5D8 full light chain aa)	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLLDSDGHTYLN WLQQRPGQPPRLLIYSVSNLESGVPDRFSGSGAGTDFTL KISRVEAEDVGYYCMQATHAPPYTFGQGTKLEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:65 (5D8 full light chain nt)	GACATCGTGATGACCCAGACCCCCCTGAGCAGCCCCG TGACCCTGGGCCAGCCCGCCAGCATCAGCTGCAGGA GCAGCCAGAGCCTGCTGGACAGCGACGGCCACACCT ACCTGAACTGGCTGCAGCAGAGGCCCGGCCAGCCCC CCAGGCTGCTGATCTACAGCGTGAGCAACCTGGAGA GCGGCGTGCCCGACAGGTTTCAGCGGCAGCGGCGCCG GCACCGACTTCACCCTGAAGATCAGCAGGGTGGAGG CCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCATGCAGGCCA CCCACGCCCCCCCCCTACACCTTCGGCCAGGGCACCAA GCTGGAGATCAAGAGGACCGTGGCCGCCCCAGCGT GTTTCATCTTCCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGC GGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCT ACCCAGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACA ACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGA CCGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTGA GCAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGA AGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGG GCCTGAGCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGG GCGAGTGC
SEQ ID NO:66 (P36-033 LCDR1 aa)	KASQDVSNVA
SEQ ID NO:67 (P36-033 LCDR2 aa)	WASFRHT
SEQ ID NO:68 (P36-033 LCDR3 aa)	QQHYNTPYT
SEQ ID NO:69 (P36-033 HCDR1 aa)	SYPMF
SEQ ID NO:70 (P36-033 HCDR2 aa)	YISNGGDSTYYPDTVKG
SEQ ID NO:71 (P36-033 HCDR3 aa)	PSARYDEWFAY

序列编号	序列
SEQ ID NO:72 (P36-033 VL nt)	GACATCGTGATGACCCAGTCCCACAAGTTCATGAGCA CCAGCGTGGGCGATCGGGTGTCCATCACCTGTAAGGC CTCCCAGGACGTGAGCAACGCCGTGGCCTGGTATCAG CAGAAGCCTGGCCAGTCCCCTCGGCTGCTGATCTATT GGGCTTCCTTCAGGCACACCGGCGTGCCCGATCGGTT CACCGGCTCCGGATCCGGCACCGAGTATACCTGACC ATCTCCCGGGTGCAGGCCGAGGATCTGGCTCTGTATT ATTGTCAGCAGCACTACAATACCCCCTACACCTTCGG CGGCGGCACCAGGCTGGAGATCAAG
SEQ ID NO:73 (P36-033 VH nt)	GAGGTGATGCTGGTGGAGAGCGGCGGCGGCCTGGTG CAGCCTGGAGGATCTCGGAGGCTGAGCTGTGCCGCC AGCGGCTTCACCTTCTCCTCCTATCCCATGTTCTGGGT GAGGCAGACCCCCGAGAAGCGGATGGAGTGGGTGGC CTATATCTCCAATGGCGGCGATTCCACCTATTATCCT GACACCGTGAAGGGCCGGTTCACCGTGAGCCGGGAT AACGCCAAGAATACCCTGTACCTGCAGATGAGCAGC CTGAAGTCCGTGGACACCGCTATCTACTATTGCGTGA GGCCCTCCGCTCGGTACGACGAGTGGTTCGCTATTG GGGCCAGGGCACCTGGTGACAGTGAGCGCT
SEQ ID NO:74 (38E10E1C11 VL aa)	DIHMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLAWYQQK QGKSPQLLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSL QPEDFGSYQCQHHYVTPITFGAGTKLELKRA
SEQ ID NO:75 (38E10E1C11 VH aa)	EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFISSYAMSWVR QSPETRLEWVATISSGGSNTYSPDSVKGRFTISRDNKN TLYLQMSSLRSEDAMYYCARYYGYYFDWVGQGTTLT VSS
SEQ ID NO:76 (38E10E1C11 VL nt)	GACATCCACATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTG CATCTGTGGGAGAACTGTCACCATCACATGTCGAGC AAGTGAGAATATTTACAGTTATTTAGCATGGTATCAG CAGAAACAGGGAAAATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATA ATGCAAAAACCTTAGCAGAAGGTGTGCCATCAAGGT TCAGTGGCAGTGGATCAGGCACACAGTTTTCTCTGAA GATCAACAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGGGAGTTAT TACTGTCAACATCATTATGTTACTCCGCTCACGTTTCGG TGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGGGCT

序列编号	序列
SEQ ID NO:77 (38E10E1C11 VH nt)	GAAGTGATGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTG AAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCT CTGGATTCAATTTTCAGTAGTTATGCCATGTCTTGGGTT CGCCAGAGTCCGGAGACGAGGCTGGAGTGGGTGCGCA ACCATTAGTAGTGGTGGTAGTAACACCTACTCTCCAG ACAGTGTGAAGGGGCGATTACCATCTCCAGAGACA ATGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCT GAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAG ATATTATGGTTACTACTTTGACTTCTGGGGCCAAGGC ACCACTCTCACAGTCTCCTCA
SEQ ID NO:78 (5D8 VH aa)	QVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSHAWMHWV RQAPGKGLEWVGQIKAKSDDYATYYAESVKGRFTISR DSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTCWEWDLDFWQGG TMVTVSS
SEQ ID NO:79 (5D8 VL aa)	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLLDSDGHTYLN WLQQRPGQPPRLLIYSVSNLESGVPDRFSGSGAGTDFTL KISRVEAEDVGYYCMQATHAPPYTFGQGTKLEIKRTV
SEQ ID NO:80 (5D8 VH nt)	CAGGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCGGCGGCCTGGTG AAGCCCGGCGGCAGCCTGAGGCTGAGCTGCGCCGCC AGCGGCTTCACCTTCAGCCACGCCTGGATGCACTGGG TGAGGCAGGCCCCCGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGG GCCAGATCAAGGCCAAGAGCGACGACTACGCCACCT ACTACGCCGAGAGCGTGAAGGGCAGGTTCACCATCA GCAGGGACGACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGA TGAACAGCCTGAAGACCGAGGACACCGCCGTGTACT ACTGCACCTGCTGGGAGTGGGACCTGGACTTCTGGGG CCAGGGCACCATGGTGACCGTGAGCAGC
SEQ ID NO:81 (5D8 VL nt)	GACATCGTGATGACCCAGACCCCCCTGAGCAGCCCCG TGACCCTGGGCCAGCCCGCCAGCATCAGCTGCAGGA GCAGCCAGAGCCTGCTGGACAGCGACGGCCACACCT ACCTGAACCTGGCTGCAGCAGAGGCCCGGCCAGCCCC CCAGGCTGCTGATCTACAGCGTGAGCAACCTGGAGA GCGGCGTGCCCGACAGGTTCAGCGGCAGCGGCGCCG GCACCGACTTCACCCTGAAGATCAGCAGGGTGGAGG CCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCATGCAGGCCA CCCACGCCCCCCCCCTACACCTTCGGCCAGGGCACCAA GCTGGAGATCAAGAGGACCGTG
SEQ ID NO:82 (P36-033 VL aa)	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSNVAVWYQ QKPGQSPRLLIYWASFRHTGVPDRFTGSGSGTEYTLTIS RVQAEDLALYYCQQHYNTPTYTFGGGTRLEIK

序列编号	序列
SEQ ID NO:83 (P36-033 VH aa)	EVMLVESGGGLVQPGGSRRLSCAASGFTFSSYPMFVVR QTPEKRMWVAYISNGGDSTYYPD TVKGRTVSRDNA KNTLYLQMSSLKSVDTAIYYCVRPSARYDEWFAYWGQ GTLVTVSA

说明：CDR 和框架区所有氨基酸编号均根据 Kabat 系统的 EU 索引(Kabat,E.A.等人(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, U.S.Department of Health and Human Services, NIH 公布第 91-3242 号)注释。所有序列均不包含信号肽。aa: amino acid, nt: nucleotide.

附图说明

- 5 图 1 显示本发明 LIF 抗体与人 LIF 蛋白结合能力；
图 2 显示本发明 LIF 抗体与小鼠 LIF 蛋白结合能力；
图 3 显示本发明 LIF 抗体与食蟹猴 LIF 蛋白结合能力；
图 4 显示本发明 38E10E1C11 抗体与抗原结合的亲和力；
图 5 显示本发明 38E10E1C11 抗体与 LIFR 竞争结合人 LIF 蛋白的能力；
- 10 图 6 显示本发明 P36-333 抗体与受体 GP130 竞争结合人 LIF 蛋白的能力；
图 7 显示本发明 38E10E1C11 抗体和 P36-333 抗体与 IL-6 家族蛋白的交叉反应；
图 8 显示本发明显示本发明 38E10E1C11R 抗体识别变性的人 LIF 蛋白。
图 9 中的子图 A 显示本发明 38E10E1C11 抗体抑制人 LIF 蛋白诱导的结肠癌细胞（HCT116）的磷酸化；图 9 中的子图 B 显示本发明 38E10E1C11 抗体抑制人 LIF 蛋白诱导的胰腺癌细胞(KP4)STAT3
- 15 的磷酸化；
图 10 显示本发明 38E10E1C11 抗体阻断 CT26-hLIF 细胞分泌的人 LIF 对于胰腺癌细胞 KP4 的 STAT3 的激活；
图 11 显示本发明 P36-333 抗体抑制人 LIF 蛋白诱导的结肠癌细胞（HCT116）STAT3 的磷酸化；
图 12 显示本发明 38E10E1C11 和 P36-033 抗体逆转 LIF 对于 M1 细胞的增殖抑制；
- 20 图 13 显示本发明 38E10E1C11 抗体抑制 CT26-hLIF 细胞在 BABL/c 小鼠体内的生长；
图 14 显示三种人胰腺癌细胞系对人 LIF 蛋白刺激的敏感性；
图 15 显示本发明 38E10E1C11R 抗体抑制 LIF 蛋白刺激导致的 KP4 细胞 STAT3 的磷酸化；
图 16 中的子图 A 显示本发明 38E10E1C11 抗体识别全长人 LIF 蛋白以及杂合 LIF 蛋白的实验结果，
图 16 中的子图 B 显示本发明 38E10E1C11 抗体能够逆转全长人 LIF 蛋白以及杂合 LIF 蛋白对 M1
- 25 细胞增殖抑制的实验结果；
图 17A-图 17B 显示本发明人源化抗 LIF 抗体与抗原结合特性的实验结果；
图 18 显示本发明人源化抗 LIF 抗体的非特异性结合亲和力的实验结果；
图 19 显示本发明人源化抗 LIF 抗体与 LIFR 竞争结合人 LIF 蛋白的实验结果；

图 20 显示本发明人源化抗 LIF 抗体与 GP130 竞争结合人 LIF 蛋白的实验结果；

图 21 显示本发明人源化抗 LIF 抗体识别抗原特异性的实验结果；

图 22 中的子图 A 显示本发明显示本发明人源化抗 LIF 抗体识别全长人 LIF 蛋白以及杂合 LIF 蛋白的实验结果，图 22 中的子图 B 显示本发明人源化抗 LIF 抗体阻断全长 LIF 蛋白和杂合蛋白对 M1

5 细胞增殖抑制的实验结果；

图 23 显示本发明人源化抗 LIF 抗体抑制 LIF 蛋白诱导的 STAT3 的磷酸化的实验结果；

图 24 显示本发明人源化抗 LIF 抗体能够逆转人 LIF 蛋白对 M1 细胞增殖抑制的实验结果。

图 25 显示 HTFR 方法检测的人源化抗 LIF 抗体抑制 LIF 蛋白诱导的 STAT3 的磷酸化水平和总 STAT3 水平。

10 图 26 显示人源化抗 LIF 抗体的 ADCC 作用。

详细说明

定义

为更容易地理解本说明书，首先定义某些术语。其他定义陈述于说明书通篇中。

本文所用的术语“LIF (Leukemia Inhibitory Factor)”指白血病抑制因子。LIF 的氨基酸序列
15 为公开可用的(Ref Seq NM_001257135)。在一些实施方案中，LIF 可以是人、小鼠 (Ref Seq
NM_001039537.2) 或食蟹猴 LIF (XM_015457518.1)。如本文别处所描述，LIF 可以是重组的和/
或糖基化或非糖基化的。

如本文所使用的术语“抗体”可包括完整抗体及其任何抗原结合片段(即“抗原结合部分”)或
单链。在一个实施方案中，“抗体”指包含藉由二硫键互连的至少两个重(H)链及两个轻(L)链的糖
20 蛋白或其抗原结合部分。每一重链包含重链可变区(在本文中缩写为 VH)及重链恒定区。在某些天然
存在的 IgG、IgD 及 IgA 抗体中，重链恒定区包含三个结构域，CH1、CH2 及 CH3。在某些天然
存在的抗体中，每一轻链包含轻链可变区(在本文中缩写为 VL)及轻链恒定区。轻链恒定区包含一
个结构域 CL。可将 VH 及 VL 区进一步细分成超变区(称为互补决定区(CDR))及更保守的区域(称
为框架区(FR))，二者间杂排列。在本文中，VH 区的 CDR 缩写为 HCDR，即 VH 区的三个 CDR
25 可以缩写为 HCDR1、HCDR2、HCDR3；VL 区的 CDR 缩写为 LCDR，即 VL 区的三个 CDR 可以
缩写为 LCDR1、LCDR2、LCDR3。每一 VH 及 VL 由三个 CDR 及四个 FR 构成，其自氨基末端至
羧基末端按下列顺序布置：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链及轻链的可变区
含有与抗原相互作用的结合结构域。

抗体的重链可或可不含有末端赖氨酸(K)或末端甘氨酸及赖氨酸(GK)。因此, 本文所提供的任何重链序列及重链恒定区序列可以以 GK 或 G 结尾, 或缺少 K 或 GK, 无论该序列的最后一个氨基酸为何。这是因为末端的赖氨酸, 有时是甘氨酸与赖氨酸, 在抗体表达期间会被切去。

5 抗体通常以高亲和力特异性结合至其同源抗原, 高亲和力由 10^{-7}M 至 10^{-11}M 或更小的解离常数(K_D)所反映。通常认为大于约 10^{-6}M 的任何 K_D 指示非特异性结合。如本文所使用的, “特异性结合”至抗原的抗体指以高亲和力结合至抗原且实质上相同的抗原、但不以高亲和力结合至不相关抗原的抗体, 高亲和力意指具有 10^{-7}M 或更小、优选 10^{-8}M 或更小、甚至更优选 $5 \times 10^{-9}\text{M}$ 或更小、且最佳介于 10^{-8}M 与 10^{-10}M 之间或更小的 K_D 。若抗原展现与给定抗原的高度序列同一性, 例如若其展现与给定抗原的序列至少 80%、至少 90%、至少 95%、至少 97%或至少 99%或更大的序列
10 同一性, 则该抗原与给定抗原“实质上相同”。

免疫球蛋白可来自普遍已知同型中的任一者, 包括(但不限于)IgA、分泌性 IgA、IgG 及 IgM。IgG 同型在某些物种中分成多个子类: 在人中分成 IgG1、IgG2、IgG3 及 IgG4, 在小鼠中分成 IgG1、IgG2a、IgG2b 及 IgG3。在某些实施方案中, 本文所述抗 LIF 抗体具有人 IgG1 或小鼠 IgG1 子型。免疫球蛋白(例如人 IgG1)以若干异型存在, 其彼此相差至多几个氨基酸。举例而言, “抗体”可包
15 括天然存在的及非天然存在的抗体; 单克隆及多株抗体; 嵌合及人源化抗体; 人及非人抗体; 全合成抗体; 及单链抗体。

如本文所使用, 术语抗体的“抗原结合部分”指抗体的保留特异性结合至抗原的能力的一个或多个片段。已显示, 抗体的抗原结合功能可由全长抗体的片段来实施。抗体(例如本文所述的抗 LIF 抗体)的“抗原结合部分”这一术语所涵盖的结合片段的实例包括(i)Fab 片段, 其是由 VL、VH、
20 CL 及 CH1 结构域所组成的单价片段; (ii) $F(ab')_2$ 片段, 其是包含藉由二硫桥在铰链区处连接的两个 Fab 片段的二价片段; (iii)Fd 片段, 其由 VH 及 CH1 结构域组成; (iv)Fv 片段, 其由抗体的一条单臂的 VL 及 VH 结构域组成, (v)dAb 片段(Ward 等人(1989)Nature 341:544-546), 其由 VH 结构域组成; 及(vi)分离的互补决定区(CDR), 或(vii)两个或更多个分离的 CDR 的组合, 这些 CDR 可视情况藉由合成接头连结。另外, 尽管 Fv 片段的两个结构域 VL 及 VH 由不同的基因编码, 但其可利用
25 重组方法藉由合成接头来连结这些结构域, 使它们能够被制备成为单一蛋白链, 其中 VL 及 VH 区配对形成单价分子(称为单链 Fv(scFv)); 参见例如 Bird 等人, (1988)Science 242:423-426; 及 Huston 等人(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883)。这些单链抗体亦欲涵盖于术语抗体的“抗原结合部分”内。这些及其他潜在构建体阐述于 Chan 及 Carter(2010)Nat.Rev.Immunol.10:301。这些抗体片段系使用本领域技术人员已知的习用技术来获得, 并且从这些片段中筛选可以按照与完整抗体相
30 同的方式使用者。抗原结合部分可通过重组 DNA 技术或通过酶或化学裂解完整免疫球蛋白来产生。

术语“保守修饰形式的氨基酸序列”指这样的氨基酸修饰，它不显著影响或改变包含该氨基酸序列的抗体的结合特性，该修饰包括氨基酸置换、增加和缺失。修饰可通过例如定点诱变和 PCR 介导的诱变等标准技术引入本发明的抗体中。保守氨基酸置换系其中的氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基替换的置换。在本领域中已经确定具有相似侧链的氨基酸残基家族。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)，具有酸性侧链的氨基酸(如天冬氨酸、谷氨酸)，具有不带电的极性侧链的氨基酸(如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)，具有非极性侧链的氨基酸(如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)，具有 β -支化侧链的氨基酸(如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)、和具有芳香侧链的氨基酸(如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此，本发明的抗体的 CDR 区中的一个或多个氨基酸残基可以被来自相同侧链家族的其他氨基酸残基替代，并且使可用此处说明的功能测定方法对经改变的抗体的保留功能进行测试。优选的是，保守修饰在数目上不超过 1 个或 2 个。

修饰本文所描述的氨基酸序列是本发明希望的，特别是那些人重链恒定区以改编序列到所希望的异型、如在亚洲人群中发现的异型。

例如，抗体的一个或多个 CDR 或 CDR 组可以被嫁接到框架内(如人框架)以提供抗体分子。框架区可以是人生殖系的基因序列，或非生殖系的。这样框架可以是生殖的，其中框架内的一个或多个残基可以被交换以匹配最相似人生殖系框架内的相当位置的残基。这样，本发明的结合成员可以是分离的具有在人生殖系框架内包含 HCDR 组的 VH 结构域，例如，人生殖系 IgG VH 框架。结合成员还可以带有包含 LCDR 组的 VL 结构域，如在人生殖系 IgG VL 框架内。

VH 和/或 VL 支架残基可以如所讨论的被修饰，本文举例，如使用位点导向诱变。本发明的 VH 或 VL 结构域，或结合成员包括这样的 VL 结构域。

可以在一个或多个框架区和/或一个或多个 CDR 内进行变化，所述变化通常不导致功能的丧失，所以包含这种变化氨基酸序列的结合成员应保持结合和/或中和 LIF 的能力。它可以保持与没有进行变化的结合成员具有相同数量结合和/或中和能力，如按本文所述的分析法进行测量。包含这样变化的氨基酸序列的结合成员可以具有改善的结合和/或中和 LIF 的能力。

变化可以包括有非天然存在的或非标准氨基酸替换一个或多个氨基酸残基，将一个或多个氨基酸残基修饰到非天然存在的或非标准的形式内，或将一个或多个非天然存在的或非标准的氨基酸插入该序列。本发明序列中变化的位置和数量的例子在本文别处进行描述。天然存在的氨基酸包括通过其标准单字母代码被确定为 G、A、V、L、I、M、P、F、W、S、T、N、Q、Y、C、K、R、H、D、E 的 20 “标准” L-氨基酸。非标准氨基酸包括可以被合并入多肽骨架或来自现有氨基酸残基修饰而成的任意的其他残基。非标准氨基酸可以是天然存在或非天然存在。几个天然存在非标准氨基

酸已为本领域所知, 4-羟基脯氨酸、5-羟基赖氨酸、3-甲基组氨酸、N-乙基丝氨酸, 等 (Voet&Voet, 1995, Biochemistry, 2nd Edition, (Wiley))。在其 N- α 位进行衍生的那些氨基酸残基将仅被定位在氨基酸序列的 N-末端。通常本发明中的氨基酸为 L-氨基酸, 但可以是 D-氨基酸。因此变化可以包括用 L-氨基酸进行修饰或 D-氨基酸替换 L-氨基酸。氨基酸的甲酰化、乙酰化和/或磷酸化形式是

5 已知的, 本发明氨基酸可以进行这样的修饰。

本发明结合成员和抗体结构域中的氨基酸序列可以包含以上所描述的非天然或非标准的氨基酸。非标准氨基酸(如 D-氨基酸)可以在合成过程中被并入氨基酸序列, 或通过氨基酸合成之后进行“原始”标准氨基酸的修饰或替换。

使用非标准和/或非天然存在的氨基酸提高结构和功能的多样性, 并能提高潜能以实现本发明

10 结合成员中所希望的 LIF 结合和中和性能。另外, 与标准 L-氨基酸相比, D-氨基酸及类似物已显示具有更好的药代动力学特性, 原因是在向动物如人施用之后, 具有 L-氨基酸的多肽的体内降解。

本发明带有 CDR-衍生序列的新的 VH 或 VL 区域的生成可以采用一种或多种选自 VH 和/或 VL 基因的随机诱变以生成全部变异区内的突变体。这样的技术描述在 Gram 等人 (Gram 等人, 1992, Proc.Natl. Acad.Sci., USA, 89: 3576-3580), 其使用了易错 PCR。在一些实施方案中, 一种或多

15 种氨基酸替代在全部变异区或 CDR 组内进行。

可以使用的另一种方法为 VH 或 VL 基因的 CDR 区的导向诱变。这样的方法公布在 Barbas 等人 (Barbas 等人, 1994, Proc.Natl Acad.Sci., USA, 91: 3809-3813) 和 Schier 等人 (Schier 等人, 1996, J.Mol.Biol.263: 551-567)。

以上所述描述的所有方法为本领域已知, 本领域技术人员将能够使用这样的方法并采用本领域

20 的常规方法以提供本发明的结合成员。

根据本发明可以使用本文所公开的特定序列的任意 VH 和 VL 结构域的变异结构域氨基酸序列变异体, 如所讨论的。特定的变异体可以包括一种或多种氨基酸序列的变化(氨基酸残基的增加、删除、取代和/或插入)。在某些实施方式中, 变异体具有少于约 17、少于 9 或少于 5 的这样的变化。

如以上所示, 实质上如本文所述的 CDR 氨基酸序列可以被携带作为人抗体变异结构区或其大部分中的 CDR。实质上如本文所述的 HCDR3 序列代表本发明的实施方式, 这些中的每一个可以被携带作为人抗体变异区或其大部分中的 CDR, 任选地联合本发明的 HCDR1、HCDR2、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

25

如本文所使用, 术语“单克隆抗体”指展示针对特定表位的单一结合特异性及亲和力的某一抗体, 或者是抗体组合物, 其中抗体组合物中的所有的抗体皆展示针对特定表位的单一结合特异性及

30 亲和力。通常, 这些单克隆抗体将源自单一抗体编码细胞或核酸, 且将在不引入任何序列变化

的条件下增殖。因此，术语“人单克隆抗体”指具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区、及任选的恒定区的单克隆抗体。在一个实施方案中，人单克隆抗体是通过例如通过融合来自转基因或转染色体非人动物(例如具有包含人重链转基因及轻链转基因的基因组的转基因小鼠)获得的 B 细胞与永生细胞获得的杂交瘤产生的。术语“mAb”指单克隆抗体。

- 5 如本文所使用的，术语“重组人抗体”包括通过重组方式制备、表达、产生或分离的所有人抗体，例如(a)自对人免疫球蛋白基因转基因或转染色体的动物(例如小鼠)或自其制备的杂交瘤分离的抗体，(b)自经转化以表达该抗体的宿主细胞，例如自转染瘤分离的抗体，(c)自重组、组合人抗体文库分离的抗体，及(d)通过涉及将人免疫球蛋白基因序列剪接至其他 DNA 序列的任何其他方式制备、表达、产生或分离的抗体。这些重组人抗体包含利用具体人种系免疫球蛋白序列且由种系基因
- 10 编码、但包括在例如抗体成熟期间发生的后续重排及突变的可变区及恒定区。如本领域已知(例如，参见 Lonberg(2005)Nature Biotech.23(9):1117-1125)，可变区含有由重排以形成特异性针对外源抗原的抗体的不同基因编码的抗原结合结构域。除重排之外，可变区可进一步经多个单一氨基酸变化(称为体细胞突变或超突变)修饰以增加抗体对外源抗原的亲和力。恒定区将进一步因应抗原而改变(即同型切换)。因此，因应抗原的编码轻链及重链免疫球蛋白多肽的经重排及体细胞突变的核酸序列
- 15 可与原始种系序列不相同，但将实质上相同或相似(即具有至少 80% 同一性)。

- “人”抗体(HuMAb)指具有这样的可变区的抗体：可变区中的框架区及 CDR 区皆源自人种系免疫球蛋白序列。另外，若抗体含有恒定区，则恒定区亦源自人种系免疫球蛋白序列。本文所述抗体可包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如，通过体外随机诱变或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变)。然而，如本文所使用的，术语“人抗体”并不欲包括源自
- 20 另一哺乳动物物种(例如小鼠)种系的 CDR 序列已移植至人框架序列上的抗体。“人”抗体与“全人”抗体两个术语以同义使用。

- “人源化”抗体指这样的抗体，其中，非人抗体的 CDR 结构域以外的一些、大部分或所有氨基酸被源自人免疫球蛋白的相应氨基酸替代。在抗体的人源化形式的一个实施方案中，CDR 结构域以外的一些、大部分或所有氨基酸已被来自人免疫球蛋白的氨基酸替代，而一个或多个 CDR 区
- 25 内的一些、大部分或所有氨基酸未发生变化。可容许存在氨基酸的小添加、缺失、插入、取代或修饰，只要其不消除抗体结合具体抗原的能力即可。“人源化”抗体保留类似于原始抗体的抗原特异性。

“嵌合抗体”指可变区源自一个物种且恒定区源自另一物种的抗体，例如可变区源自小鼠抗体且恒定区源自人抗体的抗体。

本发明功能性抗体片段包括通过诸如通过 PEG 化, 或并入到脂质体中的化学修饰提高半衰期的任意的功能性片段。

本发明抗体包括双特异性抗体。双特异性或双功能性抗体形成第二代单克隆抗体, 其中两个不同变异区被结合到相同的分子中(Holliger and Bohlen, 1999 Cancer and metastasis rev.18: 411-419)。

- 5 从它们的招募新效应子功能或靶向一些分子到肿瘤细胞表面上的能力它们在诊断领域和治疗领域的应用已经被阐述。其中使用双特异性抗体时, 这些可以是常规的双特异性抗体, 其可以是以各种方式进行制造(Holliger P. & Winter G. Current Opinion Biotechnol. 4, 446-449: 1993), 如化学制备、或来自杂交的杂交瘤, 或可以是以上所提到的任意的双特异性抗体片段。这些抗体的获得可以通过化学方法或体细胞的方法, 但同样地并优选基因工程方法, 所述方法允许实施异源二聚化, 这样有
- 10 利于所得抗体的纯化工艺。双特异性抗体的例子包括那些 BiTETM 方法, 该方法中带有不同的特异性两个抗体的结合结构域可以被使用并直接地通过短的柔性肽连接。这在短的单个多肽链上结合两个抗体。双链抗体和 scFc 在没有 Fc 区域下被构建, 仅使用变异区, 潜在地降低了抗独特型反应的效果。

- 双特异性抗体可以被构建为全 IgG, 双特异性 (Fab')₂、(Fab')₂PEG、双链抗体或其他的双特
- 15 异性 scFv。进一步可以使用本领域已知常规方法两个双特异性抗体进行连接以形成四价抗体。

- 相对于双特异性全抗体, 双特异性双链抗体也是特别有用的, 因为它们能够轻易地在大肠杆菌中被构建和表达。使用噬菌体展示库(WO1994/13804, 适当结合特异性的双链抗体(和许多其他的多肽, 如抗体片段)能够轻易地被选择。如果双链抗体的一个臂被保持恒定, 然后制备库, 其中其他的臂被变异, 选择适当特异性的抗体。双特异性全抗体可以通过不同的工程方法进行制备, 所述方法描述在 Ridgeway 等人(Ridgeway, J.B.B.等人, Protein Eng. 9, 616-621, 1996)或 WO1996/27011, WO1998/50431 和 WO2006/028936。
- 20

- “经修饰的重链恒定区”指包含恒定结构域 CH1、铰链、CH2 及 CH3 的重链恒定区, 其中一个或多个恒定结构域来自不同同型(例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)。在某些实施方案中, 经修饰的恒定区包括人 IgG2 CH1 结构域及融合至人 IgG1 CH2 结构域的人 IgG2 铰链及人 IgG1 CH3 结构域。在某些实施方案中, 这些经修饰恒定区亦包括相对于野生型氨基酸序列, 一个或多个结构域内的氨基酸修饰。
- 25

如本文所使用的, “同型”指由重链恒定区基因编码的抗体类别(例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD 及 IgE 抗体)。

- “异型”指特定同型群内的天然存在的变体, 这些变体相差几个氨基酸(例如, 参见 Jefferis 等人(2009)mAbs 1:1)。本文所述抗体可具有任何异型。
- 30

除非本文在别处另有说明，否则所有氨基酸编号均根据 Kabat 系统的 EU 索引(Kabat,E.A.等人 (1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, U.S.Department of Health and Human Services, NIH 公布第 91-3242 号)。

“识别抗原的抗体”及“特异性针对抗原的抗体”在本文中可与术语“特异性结合至抗原的抗体”互换使用。

如本文所使用的，术语“分离的抗体”欲指这样的抗体，其实质游离于其他具有不同抗原特异性的抗体(例如，特异性结合至 LIF 的分离的抗体实质游离于特异性结合除 LIF 外的抗原的抗体)。然而，特异性结合至 LIF 的表位的分离的抗体可具有针对不同物种的其他 LIF 蛋白的交叉反应性。

“效应物功能”指抗体 Fc 区与 Fc 受体或配体的相互作用，或源自其的生物化学事件。示例性“效应物功能”包括 C1q 结合、补体依赖性细胞毒性(CDC)、Fc 受体结合、FcγR 介导的效应物功能(例如 ADCC 及抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP))及下调细胞表面受体(例如 B 细胞受体；BCR)。这些效应物功能通常需要组合 Fc 区与结合结构域(例如抗体可变结构域)。

“Fc 受体”或“FcR”是结合至免疫球蛋白的 Fc 区的受体。结合至 IgG 抗体的 FcR 包括 FcγR 家族的受体，包括这些受体的等位基因变体及可变剪接形式。FcγR 家族由三种活化性受体(在小鼠中为 FcγR I、FcγRIII及 FcγRIV；在人类中为 FcγR I A、FcγR II A 及 FcγRIIIA)及一种抑制性受体(FcγR II B)组成。人 FcγR 的多种特性概述于表 A 中。大部分固有效应细胞类型共表达一种或多种活化 FcγR 及抑制性 FcγR II B，而天然杀伤(NK)细胞选择性表达一种活化 Fc 受体(小鼠中的 FcγRIII 及人中的 FcγRIIIA)，但不表达小鼠及人中的抑制性 FcγR II B。人 IgG1 结合至大部分人 Fc 受体且认为其所结合的活化 Fc 受体类型等效于鼠类 IgG2a。

表 A.人 FcγR 的特性

Fcγ	等位基因变体	对人 IgG 的亲合力	同型偏好性	细胞分布
FcγR I	未阐述	高 (K _D 约 10nM)	IgG1=3>4>>2	单核细胞、巨噬细胞、活化嗜中性细胞、树突细胞
FcγR II A	H131	低至中等	IgG1>3>2>4	嗜中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、树突状细胞、血小板
	R131	低	IgG1>3>4>2	
FcγRIIIA	V158	中等	IgG1=3>>4>2	NK 细胞、单核细胞、巨噬细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞、树突状细胞
	F158	低	IgG1=3>>4>2	
FcγR II B	I232	低	IgG1=3=4>2	B 细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞、肥大细胞

“铰链”、“铰链结构域”或“铰链区”或“抗体铰链区”指重链恒定区的连结 CH1 结构域与 CH2 结构域且包括铰链之上部分、中间部分及下部分的结构域(Roux 等人, J.Immunol.1998

161:4083)。铰链提供抗体的结合区域与效应物区域之间的不同柔性且亦提供两个重链恒定区之间的分子间二硫键连接的位点。

术语“铰链”包括野生型铰链以及其变体(例如非天然存在的铰链或经修饰铰链)。例如,术语“IgG2 铰链”包括野生型 IgG2 铰链及具有 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、1-3 个、1-5 个、3-5 个和/或至多 5 个、4 个、3 个、2 个或 1 个突变(例如取代、缺失或添加)的变体。

术语“CH1 结构域”指将可变结构域与重链恒定结构域中的铰链连接的重链恒定区。术语“CH1 结构域”包括野生型 CH1 结构域以及其变体(例如非天然存在的 CH1 结构域或经修饰的 CH1 结构域)。例如,术语“CH1 结构域”包括野生型 CH1 结构域及其具有 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、1-3 个、1-5 个、3-5 个和/或至多 5 个、4 个、3 个、2 个或 1 个突变(例如取代、缺失或添加)的变体。示例性 CH1 结构域包括具有改变抗体的生物活性(例如 ADCC、CDC 或半衰期)的突变的 CH1 结构域。

术语“CH2 结构域”指连接重链恒定结构域中的铰链与 CH3 结构域的重链恒定区。术语“CH2 结构域”包括野生型 CH2 结构域以及其变体(例如非天然存在的 CH2 结构域或经修饰的 CH2 结构域)。例如,术语“CH2 结构域”包括野生型 CH2 结构域及其具有 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、1-3 个、1-5 个、3-5 个和/或至多 5 个、4 个、3 个、2 个或 1 个突变(例如取代、缺失或添加)的变体。示例性 CH2 结构域包括具有改变抗体的生物活性(例如 ADCC、CDC 或半衰期)的突变的 CH2 结构域。

术语“CH3 结构域”指在重链恒定结构域中为 CH2 结构域的 C 末端的重链恒定区。术语“CH3 结构域”包括野生型 CH3 结构域以及其变体(例如非天然存在的 CH3 结构域或经修饰的 CH3 结构域)。例如,术语“CH3 结构域”包括野生型 CH3 结构域及其具有 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、1-3 个、1-5 个、3-5 个和/或至多 5 个、4 个、3 个、2 个或 1 个突变(例如取代、缺失或添加)的变体。示例性 CH3 结构域包括具有改变抗体的生物活性(例如 ADCC、CDC 或半衰期)的突变的 CH3 结构域。

“CL 结构域”指轻链的恒定结构域。术语“CL 结构域”包括野生型 CL 结构域及其变体。
“天然序列 Fc 区”或“天然序列 Fc”包含与自然界中发现的 Fc 区的氨基酸序列相同的氨基酸序列。天然序列人 Fc 区包括天然序列人 IgG1Fc 区;天然序列人 IgG2Fc 区;天然序列人 IgG3Fc 区;及天然序列人 IgG4Fc 区以及其天然变体。天然序列 Fc 包括 Fc 的多个异型(例如,参见 Jefferis 等人(2009)mAbs 1:1)。

术语“表位”或“抗原决定簇”指抗原(例如 LIF)上免疫球蛋白或抗体特异性结合的位点。蛋白质抗原内的表位可自连续氨基酸(通常为线性表位)或通过蛋白质的三级折叠并置的非连续氨基

酸二者形成(通常为构象表位)。在暴露于变性溶剂时,通常但不始终保留自连续氨基酸形成的表位,而在用变性溶剂处理时通常丢失由三级折叠形成的表位。在独特空间构象中,表位通常包括至少 3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个、10 个、11 个、12 个、13 个、14 个或 15 个氨基酸。确定由给定抗体结合表位的方法(即表位定位)为本领域所熟知,且包括例如免疫印迹及免疫沉淀分析,其中测试重叠或连续肽(例如来自 LIF)与给定抗体(例如抗 LIF 抗体)的反应性。确定表位的空间构象的方法包括本领域中的技术及那些本文所述者,例如 x 射线结晶学、2 维核磁共振及 HDX-MS(例如,参见 Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology,第 66 卷,G.E.Morris 编辑(1996))。

“与另一抗体竞争与靶结合”的抗体指抑制(部分抑制或完全抑制)另一抗体与靶的结合的抗体。可使用已知竞争实验(例如实施例所述的那些)来确定两种抗体是否彼此竞争结合至靶,即一种抗体是否抑制另一抗体与靶的结合以及抑制程度。在某些实施方案中,抗体与另一抗体竞争与靶的结合,且抑制至少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 100%的该结合。抑制或竞争的程度可依赖于哪种抗体为“封闭抗体”(即先与靶一起温育的冷抗体)而不同。竞争测定可如例如以下文献中所述来实施: Ed Harlow 及 David Lane,Cold Spring Harb Protoc; 2006; doi:10.1101/pdb.prot4277 或“Using Antibodies”, Ed Harlow 及 David Lane,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY,USA 1999 的第 11 章。竞争性抗体结合至相同表位、重叠表位或毗邻表位(例如,由位阻作用所证实的)。

其他竞争性结合测定包括:固相直接或间接放射性免疫测定(RIA)、固相直接或间接酶免疫测定(EIA)、夹心竞争测定(参见 Stahli 等人,Methods in Enzymology 9:242(1983));固相直接生物素-抗生物素蛋白 EIA(参见 Kirkland 等人,J.Immunol.137:3614(1986));固相直接标记测定、固相直接标记夹心分析(参见 Harlow 及 Lane,Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Press(1988));使用 I-125 标记的固相直接标记 RIA(参见 Morel 等人,Mol.Immunol.25(1):7(1988));固相直接生物素-抗生物素蛋白 EIA(Cheung 等人,Virology 176:546(1990));及直接标记 RIA。(Moldenhauer 等人,Scand.J.Immunol.32:77(1990))。

如本文所使用的,术语“Kassoc”或“Ka”欲指具体抗体-抗原相互作用的缔合速率常数(association rate constant),而如本文所使用,术语“Kdis”或“Kd”欲指具体抗体-抗原相互作用的解离速率常数(dissociation rate constant)。如本文所使用,术语“K_D”欲指平衡解离常数,其系自 Kd 对 Ka 的比率(即 Kd/Ka)获得且以摩尔浓度(M)表示。可使用本领域充分确立的方法测定抗体的 K_D 值。测定抗体的 K_D 的优选方法系通过使用表面等离子共振,优选使用生物传感器系统,例如 Biacore®表面等离子共振系统或流式细胞术或 Scatchard 分析。

术语“EC50”在使用抗体或其抗原结合片段的体外或体内分析背景下指诱导 50%最大反应，即介于最大反应与基线之间之中途的反应的抗体或其抗原结合部分的浓度。

术语“IC50”，在功能性分析中，IC50 为能将生物应答降低到其最大值 50%的结合成员的浓度，以 nM 为单位。在配体-结合研究中，IC50 为降低受体结合到最大特异性结合水平的 50%的浓度。IC50 可以通过绘制最大生物活性应答的百分数作为结合成员浓度的 log 的函数，并使用软件程序如 Origin (OriginLab 软件公司，Northampton, Massachusetts, USA)，以将 S 函数拟合数据以生成 IC50 值。使用一种或多种本领域技术人员已知的和/或本文所描述或参考的分析法进行测定或测量效价。结合成员的中和效价可用表述为几何平均数(Geomean)。

如本文所使用的术语“天然存在”在应用于目标时指可在自然界中发现目标的事实。例如，存在于可自自然界来源分离且尚未在实验室中经人有意修饰的生物体(包括病毒)中的多肽或多核苷酸序列是天然存在的。

“多肽”指包含至少两个连续连接的氨基酸残基的链，且链的长度无上限。蛋白质中之一或多个氨基酸残基可含有修饰，例如(但不限于)糖基化、磷酸化或二硫键。“蛋白质”可包含一个或多个多肽。

如本文所使用，术语“核酸分子”意欲包括 DNA 分子及 RNA 分子。核酸分子可为单链或双链，且可为 cDNA。亦提供本文所述 SEQ ID NOs 中所述序列的“保守序列修饰”，即不消除由核苷酸序列编码或含有氨基酸序列的抗体与抗原的结合的核苷酸及氨基酸序列修饰。这些保守序列修饰包括保守核苷酸及氨基酸取代以及核苷酸及氨基酸添加及缺失。例如，可通过本领域已知的标准技术(例如定点诱变及 PCR 介导的诱变)将修饰引入本文所述的 SEQ ID NOs 中。保守序列修饰包括保守氨基酸取代，其中氨基酸残基被替换为具有类似侧链的氨基酸残基。具有类似侧链的氨基酸残基的家族是本领域中已有定义的。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电极性侧链的氨基酸(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、具有 β 分枝侧链的氨基酸(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)及具有芳香族侧链的氨基酸(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。

对于核酸而言，术语“实质同源性”表示，两个核酸或其指定序列在最佳比对及比较(其中适当插入或缺失核苷酸)时有至少约 80%的核苷酸、通常至少约 90%至 95%、且更优选至少约 98%至 99.5%的核苷酸相同。作为另一选择，当区段在选择性杂交条件下与链的互补物杂交，则存在实质同源性。

对于多肽而言，术语“实质同源性”表示，两个多肽或其指定序列在最佳比对及比较(其中适当插入或缺失核苷酸)时有至少约 80% 的氨基酸、通常至少约 90% 至 95%、且更优选至少约 98% 至 99.5% 的氨基酸相同。

5 两条序列之间的同一性%在最佳比对序列时随这些序列所共享的相同位置数而变化(即同源性% = 相同位置数/总位置数 × 100)，其中最佳比对系考虑到为达成两条序列的最佳比对而需要引入的空位数及每一空位的长度来确定。两条序列之间的序列比较及同一性百分数测定可使用数学算法来完成，如下文非限制性实施例中所述。

10 两条核苷酸序列之间的同一性百分数可使用 GCG 软体包(可在 <http://www.gcg.com> 上获得)中的 GAP 程序、使用 NWSgapdna.CMP 矩阵及空位权重 40、50、60、70 或 80 以及长度权重 1、2、3、4、5 或 6 来测定。两条核苷酸或氨基酸序列之间之同一性百分数亦可使用已纳入比对程序(ALIGN program, 2.0 版)中的 E.Meyers 及 W.Miller(CABIOS,4:11-17(1989))算法、使用 PAM120 权重残基表、空位长度罚分 12 及空位罚分 4 来测定。另外，两条氨基酸序列之间的同一性百分数可使用已纳入 GCG 软体包(可在 <http://www.gcg.com> 上获得)中的空位程序中的 Needleman 及 Wunsch(J.Mol.Biol.(48):444-453(1970))算法、使用 Blossum 62 矩阵或 PAM250 矩阵及空位权重 16、14、12、10、8、6 或 4 以及长度权重 1、2、3、4、5 或 6 来测定。

20 本文所述的核酸及蛋白质序列可进一步用作“询问序列”来实施针对公共数据库的检索，以例如鉴定相关序列。这些检索可使用 Altschul 等人(1990)J.Mol.Biol.215:403-10 的 NBLAST 及 XBLAST 程序(2.0 版)来实施。BLAST 核苷酸检索可使用 NBLAST 程序、评分=100、字长=12 来实施，以获得与本文所述核酸分子同源的核苷酸序列。BLAST 蛋白质检索可使用 XBLAST 程序、评分=50、字长=3 来实施，以获得与本文所述蛋白质分子同源的氨基酸序列。为获得用于比较目的的空位比对，可如 Altschul 等人(1997)Nucleic Acids Res.25(17):3389-3402 中所述使用空位 BLAST。在使用 BLAST 及空位 BLAST 程序时，可使用各程序(例如 XBLAST 及 NBLAST)的预设参数。参见 www.ncbi.nlm.nih.gov。

25 这些核酸可存在于完整细胞中，存在于细胞溶解物中，或以部分纯化或实质上纯净的形式存在。当通过标准技术实施纯化以清除其他细胞组分或其他污染物例如其他细胞核酸(例如染色体的其他部分)或蛋白质时，核酸是“分离的”或“实质上纯净”的，这些标准技术包括碱/SDS 处理、CsCl 显带、柱层析、琼脂糖凝胶电泳及本领域熟知的其他方法。参见 F.Ausubel 等人编辑.Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York(1987)。

核酸(例如 cDNA)可根据标准技术进行突变以提供基因序列。对于编码序列, 这些突变可视需要影响氨基酸序列。具体而言, 涵盖与天然 V 序列、D 序列、J 序列、恒定序列、切换序列及本文所述的其他这些序列实质上同源或源自其的 DNA 序列。

如本文所使用, 术语“载体”欲指能够转运与其连接的另一核酸的核酸分子。一类载体为“质粒”, 其指其他 DNA 区段可连接至其中的环形双链 DNA 环。另一类载体为病毒载体, 其中其他 DNA 区段可连接至病毒基因组中。某些载体能够在已引入其的宿主细胞中进行自主复制(例如, 具有细菌复制起点的细菌载体及游离型哺乳动物载体)。其他载体(例如非游离型哺乳动物载体)可在引入宿主细胞中时整合至该宿主细胞的基因组中, 并藉此随宿主基因组一同复制。另外, 某些载体能够引导与其可操作连接的基因的表达。这些载体在本文中称为“重组表达载体”(或简称为“表达载体”)。一般而言, 用于重组 DNA 技术中的表达载体通常呈质粒形式。在本说明书中, “质粒”与“载体”可互换使用, 这是因为质粒是载体的最常用形式。然而, 本发明亦包括提供等效功能的其他形式的表达载体, 例如病毒载体(例如复制缺陷型反转录病毒、腺病毒及腺相关病毒)。

如本文所使用, 术语“重组宿主细胞”(或简称为“宿主细胞”)欲指包含并非天然存在于细胞中的核酸的细胞, 且可为已引入重组表达载体中的细胞。应理解, 这些术语不仅欲指具体个体细胞, 亦欲指此细胞的子代。由于突变或环境影响可使后续各代发生某些改变, 故该子代实际上可能与亲代细胞不同, 但仍包括于如本文所使用的术语“宿主细胞”的范畴内。

如本文所使用的, 术语“抗原”指任何天然或合成免疫原性物质, 例如蛋白质、肽或半抗原。抗原可为 LIF 或其片段。

如本文所使用, 术语“抑制”或“阻断”(例如, 提及 LIF 结合或活性的抑制/阻断)可互换使用, 且涵盖部分及完全抑制/阻断二者。

如本文所使用, “癌症”指以身体中的不受控异常细胞生长为特征的一大类疾病。由于失调的细胞分裂可形成恶性的肿瘤或细胞, 它们侵袭邻近组织且可经由淋巴系统或血流转移至身体远端。

如本文所使用, 术语“治疗”或“处理”指对受试者实施任何类型的干预或过程, 或向受试者施用活性剂, 以逆转、缓和、改善、抑制或减缓或预防与疾病相关的症状、并发症、病况或生物化学标记的进展、发展、严重程度或复发。预防指对未患疾病的受试者施用来预防疾病发生, 或者若疾病发生, 最小化其影响。

术语“有效剂量(effective dose 或 effective dosage)”定义为足以达成或至少部分达成期望效应的量。药物或治疗剂的“治疗有效量”或“治疗有效剂量”是该药物在单独使用或与另一治疗剂组合使用时可促进疾病消退的任何量, 该疾病消退由疾病症状的严重程度的减轻、无疾病症状期的频率及持续时间的增加、或因患病所致的损害或失能的防止所证实。药物的“预防有效量”或“预防

有效剂量”是该药物在单独施用或与另一治疗剂组合施用于具有罹患疾病或遭受疾病复发的风险的受试者时，抑制该疾病的发展或复发的量。治疗剂或预防剂促进疾病消退或抑制疾病的发展或复发的能力可使用本领域技术人员已知的多种方法来评估，例如在临床试验期间在人受试者中评估，在可预测在人中的功效的动物模型系统中评估，或通过体外测定中测定药剂的活性来评估。

- 5 术语“患者”及“受试者”指接受预防或治疗性治疗的任何人或非人动物。例如，可使用本文所述的方法及组合物来治疗患有癌症的受试者。术语“非人动物”包括所有脊椎动物，例如哺乳动物及非哺乳动物，例如非人灵长类动物、绵羊、狗、牛、鸡、两栖动物、爬行动物等。

实施例

实施例 1 抗人 LIF 单克隆抗体的筛选与鉴定

10 1.1 杂交瘤法制备抗人 LIF 单克隆抗体 38E10E1C11

- 按单克隆抗体制备方法（Kohler 和 Milstein（1975）Nature256:495），用重组人 LIF 蛋白（购自于 Sino Biological）免疫 BABL/c 小鼠，初次免疫使用 25μg 重组人 LIF 蛋白与等体积的弗氏完全佐剂，背部皮下多点注射，四周后第二次免疫，使用弗氏不完全佐剂加 25μg 重组人 LIF 蛋白，20 天后通过间接 ELISA 方法检测小鼠血清抗体效价。间隔 2-3 周后，经腹腔注射 50μg 重组人 LIF 蛋白加强免疫，3 天后处死动物取脾细胞进行融合。

- 取对数生长期的骨髓瘤细胞 SP2/0 计数，同时制备免疫鼠的脾细胞悬液，按常规方法用 50%PEG 使脾细胞与 SP2/0 细胞进行融合。融合后的细胞加入滋养层细胞（六周龄 BABL/c 鼠腹腔巨噬细胞）的 96 孔板内，已含 1%HAT、20%胎牛血清的 DMEM 筛选培养。当克隆长至 1/3 板底时，收集培养上清。以重组人 LIF 蛋白包被 ELISA 板，间接 ELISA 法检测培养上清中抗 LIF 抗体，
- 20 筛选分泌抗人 LIF 抗体的克隆，进一步利用有限稀释法进行单克隆化获得一株可稳定分泌高亲和力的抗人 LIF 单克隆抗体的细胞株，将其分泌的抗体标记为 38E10E1C11，经测定，编码 38E10E1C11 抗体轻链及重链的全长基因序列分别为 SEQ ID NO:42 和 SEQ ID NO:44 所示，对应的 38E10E1C11 抗体的轻链及重链的全长氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:41 和 SEQ ID NO:43 所示；编码 38E10E1C11 抗体轻链及重链的可变区基因序列分别如 SEQ ID NO:76 和 SEQ ID NO:77 所示，对应的 38E10E1C11 抗体的轻链及重链的可变区的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:74 和 SEQ ID NO: 75 所示；按 Kabat 编码规则获知 38E10E1C11 抗体的 LCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示，LCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示，LCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:3 所示，HCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:4 所示，HCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:45 所示，HCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:6 所示，对该抗体进行免疫球蛋白类型及亚型鉴定（结果为 IgG1 亚类，κ 型轻链）。
- 25
- 30

在获得能够稳定分泌抗体的杂交瘤细胞株之后，使用 thermo fisher 的 CD hybridoma 无血清培养基驯化细胞，让其适应无血清悬浮震荡培养，之后利用无血清培养基表达纯化抗体。

1.2 噬菌体展示技术制备抗人 LIF 单克隆抗体 P36-033

用重组人 LIF 蛋白免疫 BABL/c 小鼠，初次免疫使用 25 μ g 重组人 LIF 蛋白与等体积的弗氏完全佐剂，背部皮下多点注射，四周后第二次免疫，使用弗氏不完全佐剂加 25 μ g 重组人 LIF 蛋白，20 天后通过间接 ELISA 方法检测小鼠血清抗体效价。间隔 2-3 周后，经腹腔注射 50 μ g 重组人 LIF 蛋白加强免疫，3 天后处死动物取脾细胞。采用 invitrogen 公司的 TRIZOL Reagent 提取脾细胞总 RNA，invitrogen cDNA 反转录试剂盒进行反转录，合成 cDNA，利用小鼠轻重链可变区简并引物扩增抗体基因，构建到噬菌体展示载体中，构建噬菌体抗体库，利用 thermo 的全自动磁珠分选系统 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010 1015 1020 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055 1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105 1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155 1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200 1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250 1255 1260 1265 1270 1275 1280 1285 1290 1295 1300 1305 1310 1315 1320 1325 1330 1335 1340 1345 1350 1355 1360 1365 1370 1375 1380 1385 1390 1395 1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440 1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490 1495 1500 1505 1510 1515 1520 1525 1530 1535 1540 1545 1550 1555 1560 1565 1570 1575 1580 1585 1590 1595 1600 1605 1610 1615 1620 1625 1630 1635 1640 1645 1650 1655 1660 1665 1670 1675 1680 1685 1690 1695 1700 1705 1710 1715 1720 1725 1730 1735 1740 1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775 1780 1785 1790 1795 1800 1805 1810 1815 1820 1825 1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860 1865 1870 1875 1880 1885 1890 1895 1900 1905 1910 1915 1920 1925 1930 1935 1940 1945 1950 1955 1960 1965 1970 1975 1980 1985 1990 1995 2000 2005 2010 2015 2020 2025 2030 2035 2040 2045 2050 2055 2060 2065 2070 2075 2080 2085 2090 2095 2100 2105 2110 2115 2120 2125 2130 2135 2140 2145 2150 2155 2160 2165 2170 2175 2180 2185 2190 2195 2200 2205 2210 2215 2220 2225 2230 2235 2240 2245 2250 2255 2260 2265 2270 2275 2280 2285 2290 2295 2300 2305 2310 2315 2320 2325 2330 2335 2340 2345 2350 2355 2360 2365 2370 2375 2380 2385 2390 2395 2400 2405 2410 2415 2420 2425 2430 2435 2440 2445 2450 2455 2460 2465 2470 2475 2480 2485 2490 2495 2500 2505 2510 2515 2520 2525 2530 2535 2540 2545 2550 2555 2560 2565 2570 2575 2580 2585 2590 2595 2600 2605 2610 2615 2620 2625 2630 2635 2640 2645 2650 2655 2660 2665 2670 2675 2680 2685 2690 2695 2700 2705 2710 2715 2720 2725 2730 2735 2740 2745 2750 2755 2760 2765 2770 2775 2780 2785 2790 2795 2800 2805 2810 2815 2820 2825 2830 2835 2840 2845 2850 2855 2860 2865 2870 2875 2880 2885 2890 2895 2900 2905 2910 2915 2920 2925 2930 2935 2940 2945 2950 2955 2960 2965 2970 2975 2980 2985 2990 2995 3000 3005 3010 3015 3020 3025 3030 3035 3040 3045 3050 3055 3060 3065 3070 3075 3080 3085 3090 3095 3100 3105 3110 3115 3120 3125 3130 3135 3140 3145 3150 3155 3160 3165 3170 3175 3180 3185 3190 3195 3200 3205 3210 3215 3220 3225 3230 3235 3240 3245 3250 3255 3260 3265 3270 3275 3280 3285 3290 3295 3300 3305 3310 3315 3320 3325 3330 3335 3340 3345 3350 3355 3360 3365 3370 3375 3380 3385 3390 3395 3400 3405 3410 3415 3420 3425 3430 3435 3440 3445 3450 3455 3460 3465 3470 3475 3480 3485 3490 3495 3500 3505 3510 3515 3520 3525 3530 3535 3540 3545 3550 3555 3560 3565 3570 3575 3580 3585 3590 3595 3600 3605 3610 3615 3620 3625 3630 3635 3640 3645 3650 3655 3660 3665 3670 3675 3680 3685 3690 3695 3700 3705 3710 3715 3720 3725 3730 3735 3740 3745 3750 3755 3760 3765 3770 3775 3780 3785 3790 3795 3800 3805 3810 3815 3820 3825 3830 3835 3840 3845 3850 3855 3860 3865 3870 3875 3880 3885 3890 3895 3900 3905 3910 3915 3920 3925 3930 3935 3940 3945 3950 3955 3960 3965 3970 3975 3980 3985 3990 3995 4000 4005 4010 4015 4020 4025 4030 4035 4040 4045 4050 4055 4060 4065 4070 4075 4080 4085 4090 4095 4100 4105 4110 4115 4120 4125 4130 4135 4140 4145 4150 4155 4160 4165 4170 4175 4180 4185 4190 4195 4200 4205 4210 4215 4220 4225 4230 4235 4240 4245 4250 4255 4260 4265 4270 4275 4280 4285 4290 4295 4300 4305 4310 4315 4320 4325 4330 4335 4340 4345 4350 4355 4360 4365 4370 4375 4380 4385 4390 4395 4400 4405 4410 4415 4420 4425 4430 4435 4440 4445 4450 4455 4460 4465 4470 4475 4480 4485 4490 4495 4500 4505 4510 4515 4520 4525 4530 4535 4540 4545 4550 4555 4560 4565 4570 4575 4580 4585 4590 4595 4600 4605 4610 4615 4620 4625 4630 4635 4640 4645 4650 4655 4660 4665 4670 4675 4680 4685 4690 4695 4700 4705 4710 4715 4720 4725 4730 4735 4740 4745 4750 4755 4760 4765 4770 4775 4780 4785 4790 4795 4800 4805 4810 4815 4820 4825 4830 4835 4840 4845 4850 4855 4860 4865 4870 4875 4880 4885 4890 4895 4900 4905 4910 4915 4920 4925 4930 4935 4940 4945 4950 4955 4960 4965 4970 4975 4980 4985 4990 4995 5000 5005 5010 5015 5020 5025 5030 5035 5040 5045 5050 5055 5060 5065 5070 5075 5080 5085 5090 5095 5100 5105 5110 5115 5120 5125 5130 5135 5140 5145 5150 5155 5160 5165 5170 5175 5180 5185 5190 5195 5200 5205 5210 5215 5220 5225 5230 5235 5240 5245 5250 5255 5260 5265 5270 5275 5280 5285 5290 5295 5300 5305 5310 5315 5320 5325 5330 5335 5340 5345 5350 5355 5360 5365 5370 5375 5380 5385 5390 5395 5400 5405 5410 5415 5420 5425 5430 5435 5440 5445 5450 5455 5460 5465 5470 5475 5480 5485 5490 5495 5500 5505 5510 5515 5520 5525 5530 5535 5540 5545 5550 5555 5560 5565 5570 5575 5580 5585 5590 5595 5600 5605 5610 5615 5620 5625 5630 5635 5640 5645 5650 5655 5660 5665 5670 5675 5680 5685 5690 5695 5700 5705 5710 5715 5720 5725 5730 5735 5740 5745 5750 5755 5760 5765 5770 5775 5780 5785 5790 5795 5800 5805 5810 5815 5820 5825 5830 5835 5840 5845 5850 5855 5860 5865 5870 5875 5880 5885 5890 5895 5900 5905 5910 5915 5920 5925 5930 5935 5940 5945 5950 5955 5960 5965 5970 5975 5980 5985 5990 5995 6000 6005 6010 6015 6020 6025 6030 6035 6040 6045 6050 6055 6060 6065 6070 6075 6080 6085 6090 6095 6100 6105 6110 6115 6120 6125 6130 6135 6140 6145 6150 6155 6160 6165 6170 6175 6180 6185 6190 6195 6200 6205 6210 6215 6220 6225 6230 6235 6240 6245 6250 6255 6260 6265 6270 6275 6280 6285 6290 6295 6300 6305 6310 6315 6320 6325 6330 6335 6340 6345 6350 6355 6360 6365 6370 6375 6380 6385 6390 6395 6400 6405 6410 6415 6420 6425 6430 6435 6440 6445 6450 6455 6460 6465 6470 6475 6480 6485 6490 6495 6500 6505 6510 6515 6520 6525 6530 6535 6540 6545 6550 6555 6560 6565 6570 6575 6580 6585 6590 6595 6600 6605 6610 6615 6620 6625 6630 6635 6640 6645 6650 6655 6660 6665 6670 6675 6680 6685 6690 6695 6700 6705 6710 6715 6720 6725 6730 6735 6740 6745 6750 6755 6760 6765 6770 6775 6780 6785 6790 6795 6800 6805 6810 6815 6820 6825 6830 6835 6840 6845 6850 6855 6860 6865 6870 6875 6880 6885 6890 6895 6900 6905 6910 6915 6920 6925 6930 6935 6940 6945 6950 6955 6960 6965 6970 6975 6980 6985 6990 6995 7000 7005 7010 7015 7020 7025 7030 7035 7040 7045 7050 7055 7060 7065 7070 7075 7080 7085 7090 7095 7100 7105 7110 7115 7120 7125 7130 7135 7140 7145 7150 7155 7160 7165 7170 7175 7180 7185 7190 7195 7200 7205 7210 7215 7220 7225 7230 7235 7240 7245 7250 7255 7260 7265 7270 7275 7280 7285 7290 7295 7300 7305 7310 7315 7320 7325 7330 7335 7340 7345 7350 7355 7360 7365 7370 7375 7380 7385 7390 7395 7400 7405 7410 7415 7420 7425 7430 7435 7440 7445 7450 7455 7460 7465 7470 7475 7480 7485 7490 7495 7500 7505 7510 7515 7520 7525 7530 7535 7540 7545 7550 7555 7560 7565 7570 7575 7580 7585 7590 7595 7600 7605 7610 7615 7620 7625 7630 7635 7640 7645 7650 7655 7660 7665 7670 7675 7680 7685 7690 7695 7700 7705 7710 7715 7720 7725 7730 7735 7740 7745 7750 7755 7760 7765 7770 7775 7780 7785 7790 7795 7800 7805 7810 7815 7820 7825 7830 7835 7840 7845 7850 7855 7860 7865 7870 7875 7880 7885 7890 7895 7900 7905 7910 7915 7920 7925 7930 7935 7940 7945 7950 7955 7960 7965 7970 7975 7980 7985 7990 7995 8000 8005 8010 8015 8020 8025 8030 8035 8040 8045 8050 8055 8060 8065 8070 8075 8080 8085 8090 8095 8100 8105 8110 8115 8120 8125 8130 8135 8140 8145 8150 8155 8160 8165 8170 8175 8180 8185 8190 8195 8200 8205 8210 8215 8220 8225 8230 8235 8240 8245 8250 8255 8260 8265 8270 8275 8280 8285 8290 8295 8300 8305 8310 8315 8320 8325 8330 8335 8340 8345 8350 8355 8360 8365 8370 8375 8380 8385 8390 8395 8400 8405 8410 8415 8420 8425 8430 8435 8440 8445 8450 8455 8460 8465 8470 8475 8480 8485 8490 8495 8500 8505 8510 8515 8520 8525 8530 8535 8540 8545 8550 8555 8560 8565 8570 8575 8580 8585 8590 8595 8600 8605 8610 8615 8620 8625 8630 8635 8640 8645 8650 8655 8660 8665 8670 8675 8680 8685 8690 8695 8700 8705 8710 8715 8720 8725 8730 8735 8740 8745 8750 8755 8760 8765 8770 8775 8780 8785 8790 8795 8800 8805 8810 8815 8820 8825 8830 8835 8840 8845 8850 8855 8860 8865 8870 8875 8880 8885 8890 8895 8900 8905 8910 8915 8920 8925 8930 8935 8940 8945 8950 8955 8960 8965 8970 8975 8980 8985 8990 8995 9000 9005 9010 9015 9020 9025 9030 9035 9040 9045 9050 9055 9060 9065 9070 9075 9080 9085 9090 9095 9100 9105 9110 9115 9120 9125 9130 9135 9140 9145 9150 9155 9160 9165 9170 9175 9180 9185 9190 9195 9200 9205 9210 9215 9220 9225 9230 9235 9240 9245 9250 9255 9260 9265 9270 9275 9280 9285 9290 9295 9300 9305 9310 9315 9320 9325 9330 9335 9340 9345 9350 9355 9360 9365 9370 9375 9380 9385 9390 9395 9400 9405 9410 9415 9420 9425 9430 9435 9440 9445 9450 9455 9460 9465 9470 9475 9480 9485 9490 9495 9500 9505 9510 9515 9520 9525 9530 9535 9540 9545 9550 9555 9560 9565 9570 9575 9580 9585 9590 9595 9600 9605 9610 9615 9620 9625 9630 9635 9640 9645 9650 9655 9660 9665 9670 9675 9680 9685 9690 9695 9700 9705 9710 9715 9720 9725 9730 9735 9740 9745 9750 9755 9760 9765 9770 9775 9780 9785 9790 9795 9800 9805 9810 9815 9820 9825 9830 9835 9840 9845 9850 9855 9860 9865 9870 9875 9880 9885 9890 9895 9900 9905 9910 9915 9920 9925 9930 9935 9940 9945 9950 9955 9960 9965 9970 9975 9980 9985 9990 9995 10000 10005 10010 10015 10020 10025 10030 10035 10040 10045 10050 10055 10060 10065 10070 10075 10080 10085 10090 10095 10100 10105 10110 10115 10120 10125 10130 10135 10140 10145 10150 10155 10160 10165 10170 10175 10180 10185 10190 10195 10200 10205 10210 10215 10220 10225 10230 10235 10240 10245 10250 10255 10260 10265 10270 10275 10280 10285 10290 10295 10300 10305 10310 10315 10320 10325 10330 10335 10340 10345 10350 10355 10360 10365 10370 10375 10380 10385 10390 10395 10400 10405 10410 10415 10420 10425 10430 10435 10440 10445 10450 10455 10460 10465 10470 10475 10480 10485 10490 10495 10500 10505 10510 10515 10520 10525 10530 10535 10540 10545 10550 10555 10560 10565 10570 10575 10580 10585 10590 10595 10600 10605 10610 10615 10620 10625 10630 10635 10640 10645 10650 10655 10660 10665 10670 10675 10680 10685 10690 10695 10700 10705 10710 10715 10720 10725 10730 10735 10740 10745 10750 10755 10760 10765 10770 10775 10780 10785 10790 10795 10800 10805 10810 10815 10820 10825 10830 10835 10840 10845 10850 10855 10860 10865 10870 10875 10880 10885 10890 10895 10900 10905 10910 10915 10920 10925 10930 10935 10940 10945 10950 10955 10960 10965 10970 10975 10980 10985 10990 10995 11000 11005 11010 11015 11020 11025 11030 11035 11040 11045 11050 11055 11060 11065 11070 11075 11080 11085 11090 11095 11100 11105 11110 11115 11120 11125 11130 11135 11140 11145 11150 11155 11160 11165 11170 11175 11180 11185 11190 11195 11200 11205 11210 11215 11220 11225 11230 11235 11240 11245 11250 11255 11260 11265 11270 11275 11280 11285 11290 11295 11300 11305 11310 11315 11320 11325 11330 11335 11340 11345 11350 11355 11360 11365 11370 11375 11380 11385 11390 11395 11400 11405 11410 11415 11420 11425 11430 11435 11440 11445 11450 11455 11460 11465 11470 11475 11480 11485 11490 11495 11500 11505 11510 11515 11520 11525 11530 11535 11540 11545 11550 11555 11560 11565 11570 11575 11580 11585 11590 11595 11600 11605 11610 11615 11620 11625 11630 11635 11640 11645 11650 11655 11660 11665 11670 11675 11680 11685 11690 11695 11700 11705 11710 11715 11720 11725 11730 11735 11740 11745 11750 11755 11760 11765 11770 11775 1

将重组人 LIF 蛋白稀释为 1 μ g/ml, 包被酶标板, 每孔加入 100 μ L 蛋白, 4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育过夜, 第二天取出酶标板, 弃去液体, PBST 洗涤三次, 加入含 2% BSA 的 PBS 室温封闭一个小时, PBST 洗涤三次, 加入不同浓度的抗人 LIF 抗体 38E10E1C11、5D8、P36-033, 室温孵育一个小时, 弃去液体, PBST 洗涤四次, 加入 HRP 标记的山羊抗小鼠 Fab 抗体或山羊抗人 FC 抗体, 室温孵育 1 个
5 小时, 弃去液体, PBST 洗涤四次, 加入 TMB 显色液, 室温孵育 10 分钟, 加入 2mol/L 浓硫酸终止显色, 酶标仪读取 450nm 吸光值, 结果详见图 1。结果显示 38E10E1C11 和 P36-033 对人 LIF 蛋白的结合活性要强于 5D8。

实施例 3 抗人 LIF 抗体与鼠 LIF 蛋白的结合试验

将重组小鼠 LIF(购自于 ACRO Biosystems)蛋白稀释为 1 μ g/mL, 包被酶标板, 每孔加入 100 μ L
10 蛋白, 4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育过夜, 第二天取出酶标板, 弃去液体, PBST 洗涤三次, 加入含 2% BSA 的 PBS 室温封闭一个小时, PBST 洗涤三次, 加入不同浓度的抗人 LIF 抗体 38E10E1C11、5D8、P36-033, 室温孵育 1 个小时, 弃去液体, PBST 洗涤四次, 加入 HRP 标记的山羊抗小鼠 Fab 抗体或山羊抗人 FC 抗体, 室温孵育 1 个小时, 弃去液体, PBST 洗涤四次, 加入 TMB 显色液, 室温孵育 10 分钟, 加入 2mol/L 浓硫酸终止显色, 酶标仪读取 450nm 吸光值, 结果详见图 2。结果显示 38E10E1C11
15 抗体对小鼠 LIF 蛋白没有结合活性。P36-033 对小鼠 LIF 蛋白有结合活性, 但结合活性要弱于 5D8 抗体。

实施例 4 抗人 LIF 抗体与食蟹猴 LIF 蛋白的结合试验

将重组猴 LIF 蛋白(购自于 Sino Biological) 稀释为 0.5 μ g/mL, 包被酶标板, 每孔加入 100 μ L
20 蛋白, 4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育过夜, 第二天取出酶标板, 弃去液体, PBST 洗涤三次, 加入含 2% BSA 的 PBS 室温封闭一个小时, PBST 洗涤三次, 加入不同浓度的抗人 LIF 抗体 38E10E1C11、5D8、P36-033, 室温孵育 1 个小时, 弃去液体, PBST 洗涤四次, 加入 HRP 标记的山羊抗小鼠 Fab 抗体或山羊抗人 Fc 抗体, 室温孵育 1 个小时, 弃去液体, PBST 洗涤四次, 加入 TMB 显色液, 室温孵育 10 分钟, 加入 2mol/L 浓硫酸终止显色, 酶标仪读取 450nm 吸光值, 结果详见图 3。结果显示 38E10E1C11 和 P36-033 的结合活性好于 5D8。

25 实施例 5 抗人 LIF 抗体亲和力测定

用 KinExA 4000 测定纯化单克隆抗体与重组人 LIF 蛋白亲和力, 向 200mg PMMA hard beads 中加入 30 μ g 38E10E1C11 抗体, 补加包被溶液至 1.0mL。缓冲液组成为 1 $\times$ PBS, pH7.4, 0.02% Na₃N。确保珠子完全悬浮在溶液中。室温旋转珠子 2 小时。珠子自然沉降或低速短暂离心, 去上清, 用含 1%BSA 的 PBS 封闭 1 小时。准备 15 mL 300 pM 抗原溶液和 15 mL 240 pM Ab2 (38E10E1C11) 溶
30 液。取 0.6 mL 300 pM 抗原和 0.6 mL 240 pM 抗体 Ab2 (38E10E1C11) 各自放入不同的样品管中。

将两个管中的样品充分混匀，合到一管，此时抗原的浓度为 150 pM，抗体 Ab2 (38E10E1C11) 的浓度为 120 pM，放在管架中相应的位置。准备 16 组，每组的样品孵育时间不同。加入 1 µg/ml Streptavidin Protein, DyLight 650 溶液，上机检测，设置孵育时间为 24 小时。在 KinExatm Pro 软件中，用未知配体模型计算平衡离解常数(Kd)进行 n-曲线分析，结果详见图 4。结果显示 38E10E1C11 单抗与人 LIF 蛋白结合的亲和力为 $4.52 \times 10^{-12} \text{M}$ 。

实施例 6 P36-033、38E10E1C11 mAb 与 LIFR 竞争结合人 LIF 蛋白

将重组人 LIF 蛋白按照 1 µg/mL 的浓度包被酶标板，加入 0.6125 µg/mL 的 LIFR (与人 F_c 融合表达) 蛋白 50 µL/孔，同时加入不同浓度的 LIF 抗体 38E10E1C11、P36-033 和经过 CHO 细胞重组表达的 38E10E1C11R (SEQ ID NOs: 41 and 43)，50 µL/孔，室温孵育 2 小时，PBST 洗涤四次后，加入 HRP 标记的羊抗人 F_c 二抗，室温孵育 1 小时，PBST 洗涤四次后，加入 TMB 显色液室温显色 10 分钟，酶标仪读取 450nm 吸光值，数据采用 Origin pro 9 软件进行分析和作图。结果详见图 5，结果显示 38E10E1C11 mAb 和 38E10E1C11R 能够抑制人 LIF 与人 LIFR 的结合，而 P36-033 不能抑制人 LIF 与人 LIFR 的结合。

实施例 7 P36-033、38E10E1C11 mAb 与 GP130 竞争结合人 LIF 蛋白

将重组人 LIF 蛋白按照 1 µg/mL 的浓度包被酶标板，加入 20 µg/mL 的 GP130 (与人 F_c 融合表达) 蛋白 50 µL/孔，同时加入不同浓度的 P36-033 抗体或不同浓度的 38E10E1C11 抗体，50 µL/孔，同时设置只加抗体不加 GP130 的对照孔，室温孵育 2 小时，PBST 洗涤四次后，加入 HRP 标记的羊抗人 F_c 二抗，室温孵育 1 小时，PBST 洗涤四次后，加入 TMB 显色液室温显色 10 分钟，酶标仪读取 450nm 吸光值，数据采用 Origin pro 9 软件进行分析和作图。结果详见图 6，结果显示 P36-033 和 38E10E1C11 能够抑制人 LIF 与人 GP130 的结合。

实施例 8 38E10E1C11 mAb 特异性检测

将人 LIF、人 IL-6、人 OSM、人 CNTF (均购自于 Sino Biological) 按照 1 µg/mL 浓度包被酶标板，加入不同浓度的 LIF 抗体 38E10E1C11、P36-033、5D8 室温孵育 1 小时，PBST 洗涤四次后，加入 HRP 标记的羊抗鼠 Fab 二抗，室温孵育 1 小时，PBST 洗涤四次后，加入 TMB 显色液室温显色 10 分钟，酶标仪读取 450nm 吸光值，数据采用 Origin pro 9 软件进行分析和作图。结果详见图 7，结果显示 38E10E1C11 单抗、P36-033 单抗仅与人 LIF 蛋白结合而与人 IL-6、OSM、CNTF 没有结合，5D8 抗体除结合人 LIF 蛋白外还与人 OSM 及人 CNTF 蛋白结合。

实施例 9 38E10E1C11 mAb 能够用于人 LIF 蛋白的 western blot 检测

将重组人 LIF 蛋白稀释为图 8 中所示浓度，或将培养三天的 CT26 和 CT26-hLIF 细胞上清，加入 5XSDS-PAGE 上样缓冲液，煮沸 10 分钟，然后取 10 µL 样品进行 SDS-PAGE 电泳，然后将电泳

条带转移到 PVDF 膜上进行 western blot 检测, 检测用的一抗为 38E10E1C11 抗体, 抗体浓度为 1 μ g/mL, 室温孵育 2 小时, TBST 缓冲液洗涤三次后加入 1: 3000 稀释的 HRP 标记的羊抗小鼠二抗, 室温孵育 2 小时, 室温孵育 1 小时, TBST 缓冲液洗涤三次后, 加入增强型化学发光液 (Perice) 孵育, 利用 Amersham Imager 600 超灵敏多功能成像仪进行检测和拍照。结果详见图 8, 结果显示

- 5 38E10E1C11 mAb 能够用于人 LIF 蛋白的 western blot 检测。

实施例 10 抗人 LIF 抗体细胞活性检测

10.1 HCT116 细胞 STAT3 激活抑制试验检测

HCT116 细胞消化并离心后, 重悬细胞, 以 1mL, 5 $\times 10^5$ 个细胞/孔, 铺 12 孔板。37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 过夜培养。第二天弃去原培养基, 加入含有 100ng/mL 重组人 LIF 蛋白和不同浓度抗 LIF 抗体的细胞培养基, 设置不加重组人 LIF 蛋白和只加重重组人 LIF 蛋白不加抗体的对照孔, 37 $^{\circ}$ C 培养箱孵育 30min。然后将培养基取出, 向 12 孔板中每孔加 100 μ L 1x 裂解液, 冰上裂解 30min。将裂解液转移到 1.5mL 离心管中, 13,000rpm, 10min 离心, 收集上清液。取上清液进行 western blot 检测 STAT3 的磷酸化情况。结果详见图 9 中的子图 A 和图 11, 由结果可知 38E10E1C11 抗体和 P36-033 抗体能够抑制人 LIF 蛋白诱导的 HCT116 细胞中 STAT3 的磷酸化。

- 15 10.2 KP4 细胞 STAT3 激活抑制试验检测 LIF 抗体活性

KP4 细胞消化并离心后, 重悬细胞, 以 1mL, 5 $\times 10^5$ 个细胞/孔, 铺 12 孔板。37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 过夜培养。第二天弃去原培养基, 加入含有 50ng/mL 重组人 LIF 蛋白和不同浓度抗 LIF 抗体的细胞培养基, 设置不加重组人 LIF 蛋白和只加重重组人 LIF 蛋白不加抗体的对照孔, 37 $^{\circ}$ C 培养箱孵育 30min。然后将培养基取出, 向细胞中加入 1x 细胞裂解液, 每孔 100 μ L, 冰上裂解 30min。将裂解液转移到 1.5mL 离心管中, 13,000rpm, 10min 离心, 收集上清液。取上清液进行 western blot 检测 STAT3 的磷酸化情况。图 9 中的子图 B 结果显示 38E10E1C11 抗体能够抑制人 LIF 蛋白诱导的 KP4 细胞中 STAT3 的磷酸化。

10.3 KP4 细胞 STAT3 激活抑制试验检测 LIF 抗体活性

KP4 细胞消化并离心后, 重悬细胞, 以 1mL, 5 $\times 10^5$ 个细胞/孔, 铺 12 孔板。37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 过夜培养。第二天弃去原培养基, 将不同浓度抗 LIF 抗体和 CT26-hLIF 细胞培养基按体积比 1:1 配置后加入细胞中, 设置 CT26 培养上清的对照孔, 37 $^{\circ}$ C 培养箱孵育 30min。然后将培养基取出, 向细胞中加入 1x 细胞裂解液, 每孔 100 μ L, 冰上裂解 30min。将裂解液转移到 1.5mL 离心管中, 13,000rpm, 10min 离心, 收集上清液。取上清液进行 western blot 检测 STAT3 的磷酸化情况。图 10 显示本发明 38E10E1C11 抗体阻断 CT26-hLIF 细胞分泌的人 LIF 对于胰腺癌细胞 KP4 的 STAT3 的激活。

- 30 10.4 M1 细胞增殖实验检测 LIF 抗体活性

M1 离心后, RPMI1640 培养基洗涤两次, 按照 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 的密度接种 96 孔板, 每孔接种 100ul 细胞, 加入含有 10ng/mL 重组人 LIF 蛋白和不同浓度抗 LIF 抗体的培养基, 使每孔的最终体积为 200uL, 同时设置不加 LIF 的对照孔, 37°C 培养箱培养 72 小时, 加入 CCK-8 检测细胞增殖情况。结果详见图 12, 结果显示单抗 38E10E1C11 和单抗 P36-033 都能够逆转人 LIF 蛋白对 M1 细胞的增殖抑制。

实施例 11 抗人 LIF 抗体体内抗肿瘤活性检测

经过 ELISA 检测 38E10E1C11 抗体与小鼠 LIF 蛋白没有交叉反应, 为进行体内活性评价, 需构建过表达人 LIF 蛋白的 CT26 细胞株, 根据文献报道人 LIF 蛋白能够结合小鼠细胞表面的 LIFR 和 GP130 从而激活下游信号, 因此推测高表达人 LIF 的 CT26 分泌的人 LIF 蛋白能够抑制小鼠的免疫系统, 加入抗 LIF 蛋白的抗体能够解除这种抑制效果, 从而发挥抗肿瘤作用。

11.1 过表达人 LIF 基因的 CT26 细胞株的建立

将构建好的含有人 LIF 基因的慢病毒感染小鼠结肠癌细胞株 CT26, 感染 48 小时检测 LIF 蛋白表达情况, 有限稀释法对细胞株进行克隆化, 加入终浓度为 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ puromycin 的培养基进行加压筛选, 最终得到高表达人 LIF 蛋白的 CT26 稳定细胞株 CT26-hLIF。

11.2 CT26-hLIF BABL/C 皮下种植模型检测抗人 LIF 抗体的抗肿瘤活性

CT26-hLIF 细胞培养在含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中, 收集对数生长期的细胞, PBS 重悬至 10^7 个细胞/mL 后接种 BABL/c 小鼠皮下。接种一天后对小鼠进行分组, 分别注射溶媒对照, 抗人 LIF 抗体, 给药浓度为 15mg/kg 体重, 每周给药两次, 连续给药 4 周, 每周测量肿瘤体积两次, 绘制肿瘤生长曲线, 计算肿瘤抑制率。结果详见图 13, 结果显示单抗 38E10E1C11 能够抑制 CT26-hLIF 细胞在 BABL/c 小鼠体内增殖。

11.3 测试不同胰腺癌细胞株对于 LIF 蛋白刺激的敏感性

将人胰腺癌细胞株 Panc02.03、KP4、MIA paca2 接种 6 孔板, 每孔接种 10^6 个细胞, 过夜培养后更换新鲜培养基, 加入 50ng/mL 重组人 LIF 蛋白和抗人 LIF 抗体 38E10E1C11, 同时设置不加 LIF 的对照孔, 37°C 培养箱孵育 30min, 然后移除培养基, 向细胞中加入 1x 细胞裂解液, 每孔 200uL, 冰上裂解 30min。将裂解液转移到 1.5mL 离心管中, 13,000rpm, 10min 离心, 收集上清液。取上清液进行 western blot 检测 STAT3 的磷酸化情况。结果详见图 14, 由结果可知, KP4 细胞株对于人 LIF 蛋白刺激最为敏感。

实施例 12 38E10E1C11 单克隆抗体和 P36-033 单克隆抗体的重组表达及验证

将 38E10E1C11 和 P36-033 单克隆抗体的轻重链抗体基因利用同源重组技术构建到真核表达载体 PCDNA3.1+中, 利用 thermo 的 ExpiCHO 表达系统表达重组抗体, 利用 Protein G 亲和层析纯化

抗体, 利用常州天地人和公司的 Endotoxin Removal Beads 对纯化的抗体进行内毒素去除。具体实验方法参照实施例 10.2, 图 15 显示经 CHO 细胞重组表达的 38E10E1C11 抗体(标注为 38E10E1C11R)能够抑制人 LIF 蛋白诱导的 KP4 细胞中 STAT3 的磷酸化。

实施例 13 38E10E1C11 抗体识别表位的鉴定

- 5 前期实验证实 38E10E1C11 (SEQ ID NOs: 41 和 43) 抗体识别的是人 LIF 蛋白 (SEQ ID NO: 58) 表面的线性表位, 此抗体不能识别小鼠 LIF 蛋白, 能够阻断人 LIF 蛋白与人 LIFR 蛋白的结合, 根据此三点提示, 同时结合多种在线蛋白线性表位预测软件分析, 推测此抗体的识别表位位于人 LIF 蛋白 160-202 这段氨基酸序列中, 于是合成了如下的杂合 LIF 蛋白, Mut3 (SEQ ID NO: 59) 为将人 LIF 蛋白的 182-202 位点的氨基酸序列替换为小鼠 LIF 蛋白氨基酸序列, Mut4 (SEQ ID NO: 60)
- 10 为将人 LIF 蛋白的 166-202 位点的氨基酸序列替换为小鼠 LIF 蛋白氨基酸序列, 将含有 Mut3, Mut4 杂合蛋白以及全长人 LIF 蛋白的质粒转染 293T 细胞, 培养三天后取细胞上清进行 SDS-PAGE 电泳和转膜, 以 293T 细胞培养上清作为阴性对照, 使用 38E10E1C11 作为一抗, HRP 标记的羊抗小鼠 Fab 作为二抗进行检测, 同时利用 M1 细胞增殖实验检测杂合蛋白的活性和验证 38E10E1C11 对杂合蛋白的中和活性。同时设置多组对照孔, 加入人重组 LIF 蛋白 (rhLIF, 购自于义翘神州, 货号
- 15 分别为: 14890-HNAH) 的对照孔, 加入 rhLIF 和 38E10E1C11 的对照孔, 不加 rhLIF 和不加 LIF 抗体的对照孔。结果显示 38E10E1C11 抗体能够识别变性全长 LIF 蛋白, Mut3 蛋白, 但不能识别 Mut4 蛋白 (图 16 中的子图 A), M1 细胞增殖实验显示 38E10E1C11 抗体能够逆转全长 LIF 蛋白和 Mut3 蛋白对 M1 细胞增殖的抑制而不能逆转 Mut4 蛋白的抑制作用 (图 16 中的子图 B), 综上所述 38E10E1C11 抗体的识别表位位于 LIF 蛋白的 167-181 位氨基酸之中, 即
- 20 TYGPDTSKGKDV FQKK 这段氨基酸之中 (SEQ ID NO: 61)

实施例 14 人源化抗 LIF 抗体设计及表达纯化

- 将从小鼠免疫得到的单克隆抗体 38E10E1C11 进行人源化。采用标准 CDR 嫁接方法进行人源化。用标准分子克隆技术从 38E10E1C11 杂交瘤中克隆重链区和轻链区, 并用 Sanger 法进行测序。然后对人类重链和轻链可变序列进行 BLAST 搜索, 并从每个序列中选择 3 或 4 个序列作为人源化的受体框架。将 38E10E1C11 的重链和轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 克隆到 3 个不同的重链受体框架(H1-H3)和 4 个不同的轻链框架(L1-L4)中, 同时对 38E10E1C11 的 HCDR2(突变前的氨基酸序列如 SEQ ID NO:45 所示)进行点突变 (突变后的氨基酸序列如 SEQ ID NO:5 所示), 重链恒定区选择人 IgG1 亚型, 轻链恒定区选择人 Kappa 链, 将含有人源化抗体重链和人源化抗体轻链基因的表达载体共转染 293S 细胞, 上述所获得的人源化抗 LIF 抗体的重轻链可变区基因序列、可变区氨基酸序列、全长基因序列以及全长氨基酸序列详见表 1, 然后检测 12 种不同的抗体组合在 293S 细胞
- 30

中的表达水平，抗原结合能力和热稳定性。以 38E10E1C11 嵌合抗体（Chimeric）作为阳性对照，后续试验中 38E10E1C11 嵌合抗体均简称为 38E 嵌合抗体或 38E Chimeric（SEQ ID NO:52 and SEQ ID NO:50）。收集培养基，在 Gator（类似于 Octet）上定量其中 IgG 的表达水平，并用 ELISA 进行修正。用 ELISA 的方法比较不同组合的抗原结合能力（表 2，表 3）。

5 酶联免疫吸附试验（ELISA）：

在每个孔包被 100μL 0.5μg/ml 抗原，4℃孵育过夜，用 300μL 洗涤缓冲液洗涤板三次。用 200μL 封闭缓冲液（2%牛血清白蛋白）在室温下封闭 60 分钟。用 300μL 洗涤缓冲液洗涤板三次。加入 100μL 不同浓度的稀释抗 LIF 抗体每孔 100μL，室温孵育 1 小时。用 300μL 洗涤缓冲液洗涤板 4 次。加入 100μL 1:5000 稀释的 HRP 标记的羊抗人 Fc 二抗，室温孵育 1 小时。用 300μL 清洗缓冲液清洗板 6 次。在黑暗条件下，在室温下加入 100μL H₂O₂-Amplx 显色液显色 10 分钟。酶标仪读取 OD 450 值。热处理：表达培养基在 70℃下在 PCR 机上加热 5 分钟，然后快速冷却到室温。进行后续 ELISA 检测，方法同上述。

表 1. 不同人源化轻重链组合在 293S 细胞中表达水平

编号		人源化抗体可变区基因序列	人源化抗体可变区氨基酸序列	人源化抗体全长基因序列	人源化抗体全长氨基酸序列	培养上清抗体浓度 (μg/ml)
H1L1	重链	SEQ ID NO:24 (VH1,nt)	SEQ ID NO: 23 (VH1,aa)	SEQ ID NO:26 (full heavy chain 1,nt)	SEQ ID NO: 25 (full heavy chain 1,aa)	95.5
	轻链	SEQ ID NO:8 (VL1,nt)	SEQ ID NO: 7 (VL1,aa)	SEQ ID NO:10 (full light chain 1,nt)	SEQ ID NO:9 (full light chain 1,aa)	
H2L1	重链	SEQ ID NO:28 (VH2,nt)	SEQ ID NO: 27 (VH2,aa)	SEQ ID NO:30 (full heavy chain 2,nt)	SEQ ID NO: 29 (full heavy chain 2,aa)	120
	轻链	SEQ ID NO:8 (VL1,nt)	SEQ ID NO: 7 (VL1,aa)	SEQ ID NO:10 (full light chain 1,nt)	SEQ ID NO: 9 (full light chain 1,aa)	
H3L1	重链	SEQ ID NO:32 (VH3,nt)	SEQ ID NO: 31 (VH3,aa)	SEQ ID NO:34 (full heavy chain 3,nt)	SEQ ID NO: 33 (full heavy chain 3,aa)	108
	轻链	SEQ ID NO:8 (VL1,nt)	SEQ ID NO: 7 (VL1,aa)	SEQ ID NO:10 (full light chain 1,nt)	SEQ ID NO: 9 (full light chain 1,aa)	
H1L2	重链	SEQ ID NO:24 (VH1,nt)	SEQ ID NO: 23 (VH1,aa)	SEQ ID NO:26 (full heavy chain 1,nt)	SEQ ID NO: 25 (full heavy chain 1,aa)	110
	轻链	SEQ ID NO:12 (VL2,nt)	SEQ ID NO: 11 (VL2,aa)	SEQ ID NO:14 (full light chain 2,nt)	SEQ ID NO: 13 (full light chain 2,aa)	

H2L2	重链	SEQ ID NO:28 (VH2,nt)	SEQ ID NO: 27 (VH2,aa)	SEQ ID NO:30 (full heavy chain 2,nt)	SEQ ID NO: 29 (full heavy chain 2,aa)	89.4
	轻链	SEQ ID NO:12 (VL2,nt)	SEQ ID NO: 11 (VL2,aa)	SEQ ID NO:14 (full light chain 2,nt)	SEQ ID NO:13 (full light chain 2,aa)	
H3L2	重链	SEQ ID NO:32 (VH3,nt)	SEQ ID NO: 31 (VH3,aa)	SEQ ID NO:34 (full heavy chain 3,nt)	SEQ ID NO: 33 (full heavy chain 3,aa)	95.3
	轻链	SEQ ID NO:12 (VL2,nt)	SEQ ID NO: 11 (VL2,aa)	SEQ ID NO:14 (full light chain 2,nt)	SEQ ID NO: 13 (full light chain 2,aa)	
H1L3	重链	SEQ ID NO:24 (VH1,nt)	SEQ ID NO: 23 (VH1,aa)	SEQ ID NO:26 (full heavy chain 1,nt)	SEQ ID NO: 25 (full heavy chain 1,aa)	115
	轻链	SEQ ID NO:16 (VL3,nt)	SEQ ID NO: 15 (VL3,aa)	SEQ ID NO:18 (full light chain 3,nt)	SEQ ID NO: 17 (full light chain 3,aa)	
H2L3	重链	SEQ ID NO:28 (VH2,nt)	SEQ ID NO: 27 (VH2,aa)	SEQ ID NO:30 (full heavy chain 2,nt)	SEQ ID NO: 29 (full heavy chain 2,aa)	123
	轻链	SEQ ID NO:16 (VL3,nt)	SEQ ID NO: 15 (VL3,aa)	SEQ ID NO:18 (full light chain 3,nt)	SEQ ID NO: 17 (full light chain 3,aa)	
H3L3	重链	SEQ ID NO:32 (VH3,nt)	SEQ ID NO: 31 (VH3,aa)	SEQ ID NO:34 (full heavy chain 3,nt)	SEQ ID NO: 33 (full heavy chain 3,aa)	97.6
	轻链	SEQ ID NO:16 (VL3,nt)	SEQ ID NO: 15 (VL3,aa)	SEQ ID NO:18 (full light chain 3,nt)	SEQ ID NO: 17 (full light chain 3,aa)	
H1L4	重链	SEQ ID NO:24 (VH1,nt)	SEQ ID NO: 23 (VH1,aa)	SEQ ID NO:26 (full heavy chain 1,nt)	SEQ ID NO: 25 (full heavy chain 1,aa)	183
	轻链	SEQ ID NO:20 (VL4,nt)	SEQ ID NO: 19 (VL4,aa)	SEQ ID NO:22 (full light chain 4,nt)	SEQ ID NO: 21 (full light chain 4,aa)	
H2L4	重链	SEQ ID NO:28 (VH2,nt)	SEQ ID NO: 27 (VH2,aa)	SEQ ID NO:30 (full heavy chain 2,nt)	SEQ ID NO: 29 (full heavy chain 2,aa)	155
	轻链	SEQ ID NO:20 (VL4,nt)	SEQ ID NO: 19 (VL4,aa)	SEQ ID NO:22 (full light chain 4,nt)	SEQ ID NO: 21 (full light chain 4,aa)	
H3L4	重链	SEQ ID NO:32 (VH3,nt)	SEQ ID NO: 31 (VH3,aa)	SEQ ID NO:34 (full heavy chain 3,nt)	SEQ ID NO: 33 (full heavy chain 3,aa)	172
	轻链	SEQ ID NO:20 (VL4,nt)	SEQ ID NO: 19 (VL4,aa)	SEQ ID NO:22 (full light chain 4,nt)	SEQ ID NO: 21 (full light chain 4,aa)	
38E Chim eric	重链	SEQ ID NO:49 (38E Chimeric VH,nt)	SEQ ID NO: 48 (38E Chimeric VH, aa)	SEQ ID NO:53 (38E Chimericfull heavy chain,nt)	SEQ ID NO: 52 (38E Chimeric full heavy chain,aa)	97.4

	轻链	SEQ ID NO:47 (38E Chimeric VL,nt)	SEQ ID NO: 46 (38E Chimeric VL, aa)	SEQ ID NO:51 (38E Chimericfull light chain,nt)	SEQ ID NO: 50 (38E Chimeric full light chain,aa)	
--	----	---	---	--	---	--

表 2. 不同人源化轻重链组合经 293S 细胞表达上清的 ELISA 结果（非加热）

抗体浓度 (μg/mL)	1	0.2	0.04	0
克隆编号/非加热				
H1L1	11840	10574	6849	2134
H2L1	11953	10737	6369	
H3L1	11367	10041	6222	
H1L2	12118	11246	6682	
H2L2	11699	10321	6517	
H3L2	11266	10575	6599	
H1L3	11846	10790	6435	
H2L3	11967	11286	6266	
H3L3	11280	10978	6755	
H1L4	11929	10931	7321	
H2L4	11821	10859	6877	
H3L4	11918	11226	7055	
38E Chimeric	11353	10414	6783	

表 3. 不同人源化轻重链组合经 293S 细胞表达上清的 ELISA 结果（加热）

抗体浓度 (μg/mL)	1	0.2	0.04	0
克隆编号/加热				
H1L1	9796	9007	5970	27.7
H2L1	9647	8560	5442	
H3L1	9131	7903	5192	
H1L2	9833	8925	5493	
H2L2	9779	8716	5259	
H3L2	9448	8775	5065	
H1L3	9627	8748	4978	
H2L3	9731	9153	4866	
H3L3	9543	8898	5393	
H1L4	10526	9705	5670	
H2L4	10572	9234	5702	
H3L4	9948	9061	5299	
38E Chimeric	10567	8845	4727	

实施例 15 用纯化的 IgG 样品表征所选的人源化候选抗体

- 基于结合亲和力、人源化百分比、抗体表达水平和热稳定性数据，本发明选择了以下 5 个候选
- 5 抗体进行下一步表征：H1L1、H1L4、H2L4、H3L2、H3L4，并将这 5 个候选抗体重新编号为 38E HuH1L1 (SEQ ID NOs: 25 和 9)、38E HuH1L4 (SEQ ID NOs: 25 和 21)、38E HuH2L4 (SEQ ID

NOs: 29 和 21)、38E HuH3L2 (SEQ ID NOs: 33 和 13)、38E HuH3L4 (SEQ ID NOs: 33 和 21), 然后将所选的 VH/VL 质粒共转染 293S 细胞, 收获细胞培养上清, protein A 亲和层析纯化抗体。用纯化的抗体进行结合 ELISA 分析, 比较人源化抗体与 38E 嵌合抗体的特异结合能力。本发明还进行了一些初步分析, 以比较它们的热稳定性和非特异性结合。结果表明, 用纯化的候选抗体与

5 38E 嵌合抗体具有非常相似的抗原结合特性 (图 17A, 17C)。在 70℃ 处理 5 分钟后, 5 个人源化抗体均表现出与嵌合抗体相似的结合能力 (图 17B, 17D)。

实施例 16 评价人源化候选抗体的非特异性结合

采用 LIF 阴性的 HEK293 细胞 FACS 作为初步检测, 以评估抗体潜在的非特异性结合风险。

将 HEK293 细胞用胰酶消化后, 用含 1% FBS 的 PBS 洗涤两次, 重悬细胞, 调整细胞密度为

10 1.5-2x10⁶ 个/mL, 将细胞加入到 96 孔 U 形板中。将待检测的抗体浓度调整为 20μg/mL, 然后进行 3 倍倍比稀释, 共稀释 8 个浓度, 设置空白对照和阴性对照 (Rituxan)。将稀释好的抗体和空白对照加入到 96 孔板中的细胞中, 每孔加入 100μL 抗体。4℃ 孵育 1 小时, 1000rpm 离心 5 分钟, 小心弃去上清, 用含 1% FBS 的 PBS 洗涤两次, 最终用 200μL 含 1% FBS 的 PBS 重悬细胞, 进行流式细胞分析。在 HEK293 细胞非特异性结合 FACS 检测中, 38E HuH1L1、38E HuH3L2、38E HuH3L4、

15 38E HuH1L4、38E 嵌合抗体和阴性对照 (Rituxan) 对 HEK293 细胞具有相似的非特异性结合亲和力, 而 38E HuH2L4 对 HEK293 细胞具有更高的非特异性结合 (图 18 中的子图 A 和图 18 中的子图 B)。

实施例 17 CE-SDS 分析抗体纯度

CE-SDS 分析的工作浓度为 1mg/mL, 将抗体样品用上样缓冲液稀释到指定浓度。

20 非还原 CE-SDS 电泳样品的制备: 取稀释好的样品溶液 95μL, 加入 0.8M 碘乙酸铵水溶液 5μL, 5μL 内参, 涡旋混匀。取空白对照 95μL, 加入 0.8M 碘乙酸铵水溶液 5μL, 5μL 内参, 涡旋混匀, 为非还原空白对照。70℃, 金属浴加热 5 分钟, 冷却至室温, 6000rpm 离心 1 分钟。

还原样品溶液制备: 取稀释好的样品溶液 95μL, 加入 2-巯基乙醇溶液 5μL, 内参 5μL, 涡旋混匀。取空白对照 95μL, 加入 2-巯基乙醇溶液 5μL, 内参 5μL, 涡旋混匀, 为还原空白对照。70℃,

25 金属浴加热 15 分钟, 冷却至室温, 6000rpm 离心 1 分钟。

样品分析: 取 75μL 样品加入到测试管中, 将测试管放入测试杯中, 测试杯小心插入进样盘中, 运行测试程序, 还原样品进样时长为 30 秒, 非还原样品进样时长为 40 秒, 毛细管温度为 20℃, 样品温度为 20℃, 聚焦电压为 15KV, 聚焦时间为 40 分钟, 用 PDA 检测器 214nm 波长采集数据。CE 结果表明见表 4, 表 5。

表 4. 还原 CE-SDS 结果

	Peak#	Size(KDa)	Peak Area (%)	Peak ID
38E chimeric	1	27.77	35.5	LC
	2	62.43	64.5	HC
38E HuH1L1	1	25.6	0.57	LMC
	2	27.85	32.02	LC
	3	36.03	1.41	LMC
	4	61.41	66	HC
38E HuH3L2	1	27.41	31.7	LC
	2	33.84	0.35	LMC
	3	62.49	67.95	HC
38E HuH3L4	1	27	34.93	LC
	2	62.06	65.07	HC

表 5. 非还原 CE-SDS 结果

	Size (KDa)	Peak Area (%)	Peak ID
38E chimeric	166.39	>99	intact AB
38E HuH1L1	165.93	92.46	intact AB
38E HuH3L2	167.63	93.01	intact AB
38E HuH3L4	166.37	98.82	intact AB

实施例 18 用差示扫描荧光法 (DSF) /静态光散射技术 (SLS) 分析热稳定性

样品被提交给 UNcle 系统 (Unchained Labs) 进行分析。在 25℃ 至 95℃ 的温度范围内，对

5 DSF 和 SLS 进行 1℃/min 的升温监测。UNcle 在 266nm 和 473nm 处测量 SLS。利用 UNcle 分析软件对 Tm 和 Tagg 进行了计算和分析。

IgG 是具有多个结构域，每个结构域都有自己的熔化温度 (Tm)。CH2 结构域在 PBS 中通常有约 70℃ 的 Tm，CH3 更稳定，其 Tm 约为 80℃。Fabs 由于其序列变化较大，Tm 的范围较大，约为 50-85℃。因此，通过各种分析技术测量的 Tm 值通常是“表观”转变温度，而不是每个结构域

10 的真实 Tm 值。很明显，即使这种 DSF 分析也能产生一个以上的 Tm 值，只有 Tm1 才用于评价治疗用抗体的热稳定性。Tagg 是 SLS 开始检测聚集的温度。Tagg266 在 266nm 处测量 SLS，它更敏感，更适合于检测较小的聚集粒子。Tagg473 在 473nm 处测量 SLS，更适合于检测较大的粒子。

如表 6 所示，三种人源化候选抗体均比 38E 嵌合抗体具有更高的融解温度 (Tm1) 和更小的聚集风险

15

表 6. 差示扫描荧光法 (DSF) /静态光散射技术 (SLS) 分析结果

Sample	DSF(℃)			SLS(℃)	
	Tm1	Tm2	Tm3	Tagg 266	Tagg 473
38E chimeric	69.3			68.5	69.8
38E HuH1L1	72.7	82.8		72.5	73.6
38E HuH3L2	72	82.4		73.3	73.7
38E HuH3L4	71.5	82.1		69.8	70.9

实施例 19 用动态光散射技术（DLS）分析抗体的聚集倾向：

DLS 是在 UNcle 系统（Unchained Labs）上执行的。在 25℃ 下测量 DLS。使用 UNcle 分析软件计算和分析数据。动态光散射（DLS）用于检测抗体样品中的聚集。“模式直径”是指蛋白质颗粒直径，“质量百分比”是指每种粒径分数的百分比。“PDI”是多分散指数，该指数越高，样品的多分散性越强。如果 PDI 不大于 0.25，则样品可视为单分散。如表 7 所示，所有 4 个抗体样本都有一个主“峰”（质量分数超过 99%），38E HuH3L4 的 PDI 优于嵌合抗体，38E HuH3L2 与嵌合抗体相似，38E HuH1L1 的 PDI 比嵌合抗体差。

表 7. 动态光散射技术（DLS）分析结果

Sample	Peak1	质量百分比(%)	PDI	Peak2	质量百分比(%)
	模式直径(nm)			模式直径(nm)	
38E chimeric	10.41	99.90	0.229		
38E HuH1L1	9.68	99.15	0.383	101.16	0.96
38E HuH3L2	10.41	99.62	0.28	99.18	0.38
38E HuH3L4	10.41	100.00	0.043		

实施例 20 抗体亲和力测定

利用 Gator 测定抗 LIF 抗体与人 LIF 蛋白的亲和力。首先将抗人 LIF 抗体用 PBS 稀释至 5 μ g/mL，然后分别加入 96 孔板的第二列 A-F 孔（每孔 200 μ L）；以 PBS 梯度稀释人 LIF 蛋白浓度分别为 100、50、25、12.5、6.25 μ g/mL，分别加入到 96 孔板第四列的 A-E 孔（每孔 100 μ L），F 孔加 PBS 作为空白对照；第一列与第三列的 A-F 孔均加入 PBS（每孔 200 μ L）。将 96 孔板放入到仪器中，用抗人 Fc 生物传感器进行检测。实验结果如表 8 所示，结果显示 3 株人源化抗体与嵌合抗体亲和力接近。

表 8. 人源化抗 LIF 抗体亲和力测定

Sample	Koff (1/s)	Kon (1/Ms)	KD (M)
38E HuH1L1	4.65E-05	5.69E+05	8.17E-11
38E HuH3L2	3.39E-05	6.31E+05	5.38E-11
38E HuH3L4	4.44E-05	5.79E+05	7.66E-11
38E chimeric	1.57E-05	6.77E+05	2.33E-11

实施例 21 人源化抗体和 38E10E1C11 抗体的表达纯化

将人源化抗体 38E HuH3L2 和 38E HuH3L4 的轻重链的可变区与小鼠抗体恒定区（重链恒定区为小鼠 IgG1，轻链恒定区为 kappa 链）连接分别克隆到 pCDNA.3.4 载体中，分别命名为 38E HuH3L2-m（编码 38E HuH3L2-m 抗体重链及轻链的全长基因序列分别如 SEQ ID NO:36 和 SEQ ID NO:38 所示，对应的 38E HuH3L2-m 抗体的重链及轻链的全长氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:35 和

SEQ ID NO:37 所示) 和 38E HuH3L4-m (编码 38E HuH3L4-m 抗体重链及轻链的全长基因序列分别如 SEQ ID NO:36 和 SEQ ID NO:40 所示, 对应的 38E HuH3L4-m 抗体的重链及轻链的全长氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:35 和 SEQ ID NO:39 所示) 利用 thermo fisher 公司的 Expi CHO 表达试剂盒进行基因的转染和抗体表达, 收集细胞培养上清, 利用 protein G 亲和层析柱对抗体进行纯化, 5 纯化后的抗体利用 Amicon® Ultra 超滤管进行超滤浓缩和换液, 最终将抗体溶解在 pH7.4 的 PBS 中。38E10E1C11 抗体也利用相同的方式表达纯化。

实施例 22 人源化抗 LIF 抗体与 LIFR 竞争结合人 LIF 蛋白

将重组人 LIF 蛋白按照 1 μ g/mL 的浓度包被酶标板, 加入 0.6125 μ g/mL 的重组人 LIFR (与人 Fc 融合表达, 购自于 ACRO, 货号: LIR-H4252) 蛋白 50 μ L/孔, 同时加入不同浓度的 LIF 抗体 38E HuH3L2-m (SEQ ID NOs: 35 and 37)、38E HuH3L4-m (SEQ ID NOs: 35 and 39)、38E10E1C11 (SEQ ID NOs: 41 and 43)、P36-033 (SEQ ID NOs: 54 and 56) 100 μ L/孔, 以 anti-CD3 抗体作为阴性对照 (购自于 BioLegend, 货号: 317326) 室温孵育 2 小时, PBST 洗涤四次后, 加入 HRP 标记的羊抗人 Fc 抗体, 室温孵育 1 小时, PBST 洗涤四次后, 加入 TMB 显色液室温显色 10 分钟, 酶标仪读取 450nm 吸光值, 数据采用 Origin pro 9 软件进行分析和作图。结果详见图 19, 结果显示 15 38E10E1C11、38E HuH3L2-m、38E HuH3L4-m 能够抑制重组人 LIF 与人 LIFR 的结合, IC₅₀ 分别为 0.074 μ g/ml、0.145 μ g/ml、0.103 μ g/ml。P36-033 具有微弱的抑制作用, 阴性对照 anti-CD3 抗体不能抑制重组人 LIF 与人 LIFR 的结合。

实施例 23 人源化抗 LIF 抗体不与 GP130 竞争结合人 LIF 蛋白

将重组人 LIF 蛋白按照 1 μ g/mL 的浓度包被酶标板, 加入 12 μ g/mL 的重组人 GP130 (与人 Fc 融合表达, 购自于义翘神州, 货号: 10974-H03H) 蛋白 50 μ L/孔, 同时加入不同浓度的 LIF 抗体 20 38E HuH3L2-m (SEQ ID NOs: 35 and 37)、38E HuH3L4-m (SEQ ID NOs: 35 and 39)、P36-033 (SEQ ID NOs: 56 and 54) 100 μ L/孔, 以 anti-CD28 抗体作为阴性对照 (购自于 BioLegend, 货号: 302914), 室温孵育 2 小时, PBST 洗涤四次后, 加入 HRP 标记的羊抗人 Fc 抗体, 室温孵育 1 小时, PBST 洗涤四次后, 加入 TMB 显色液室温显色 10 分钟, 酶标仪读取 450nm 吸光值, 数据采用 Origin pro 9 软件进行分析和作图。结果详见图 20, 结果显示人源化抗体 38E HuH3L2-m、38E HuH3L4-m 和阴性对照抗体 anti-CD28 抗体不能抑制重组人 LIF 与人 GP130 蛋白的结合, P36-033 25 能够抑制重组人 LIF 与人 GP130 蛋白的结合。

实施例 24 人源化抗 LIF 抗体抗原识别特异性检测

将人 LIF、人 IL-6、人 OSM、人 CNTF (四种蛋白均购自于义翘神州, 货号分别为: 14890-HNAH; 30 10395-HNAE; 10452-HNAH; 11841-H07E) 按照 1 μ g/mL 浓度包被酶标板, 加入不同浓度的 LIF

抗体 38E10E1C11、38E huH3L2-m、38E huH3L4-m 室温孵育 1 小时，PBST 洗涤四次后，加入 HRP 标记的羊抗小鼠 Fab 二抗，室温孵育 1 小时，PBST 洗涤四次后，加入 TMB 显色液室温显色 10 分钟，酶标仪读取 450nm 吸光值，数据采用 Origin pro 9 软件进行分析和作图。结果详见图 21，结果显示 38E10E1C11、38E huH3L2-m、38E huH3L4-m 抗体仅与人 LIF 蛋白结合而与人 IL-6、OSM、CNTF 没有结合。

实施例 25 人源化抗 LIF 抗体识别表位的鉴定

在前期实验中本发明发现 38E10E1C11 抗体识别的是 LIF 蛋白的线性表位，因此本发明首先验证 38E 人源化抗体是否识别的仍然是 LIF 蛋白的线性表位。取转染人 LIF 全长基因序列，Mut3 和 Mut4 蛋白序列的 293T 细胞培养 3 天后的上清，阴性对照为 293T 细胞培养上清，加入 5xSDS-PAGE 上样缓冲液，煮沸 10 分钟，然后取 10 μ L 样品进行 SDS-PAGE 电泳，然后将电泳条带转移到 PVDF 膜上进行 western blot 检测，检测用的一抗为 38E huH3L2 或 38E huH3L4 抗体，抗体浓度为 1 μ g/mL，室温孵育 2 小时，PBST 缓冲液洗涤三次后加入 1: 3000 稀释的 HRP 标记的羊抗人 Fc 二抗，室温孵育 2 小时，PBST 缓冲液洗涤三次后，加入增强型化学发光液（Perice，货号为：34079）孵育，利用 Amersham Imager 600 超灵敏多功能成像仪进行检测和拍照。结果见图 22 中的子图 A，结果显示两株人源化抗体均能识别变性的人 LIF 蛋白和 Mut3 蛋白而不能识别 Mut4 蛋白。M1 细胞增值实验也得到相同的结果，结果详见图 22 中的子图 B。因此确定 38E huH3L2 和 38E huH3L4 抗体识别的表位序列为 TYGPDTSKGKDVVFQKK（SEQ ID NO:61）。

实施例 26 KP4 细胞 STAT3 激活抑制试验检测人源化抗 LIF 抗体活性

KP4 细胞消化并离心后，重悬细胞，以 1mL，5x10⁵ 个细胞/孔，铺 12 孔板。37℃，5%CO₂ 过夜培养。第二天弃去原培养基，加入含有 50ng/mL 重组人 LIF 蛋白和不同浓度抗 LIF 人源化抗体的细胞培养基，设置不加重组人 LIF 蛋白和只加重组人 LIF 蛋白不加抗体的对照孔，37℃培养箱孵育 30min。然后将培养基取出，向细胞中加入 1x 细胞裂解液，每孔 100 μ L，冰上裂解 30min。将裂解液转移到 1.5mL 离心管中，13,000rpm，10min 离心，收集上清液。取上清液进行 western blot 检测 STAT3 的磷酸化情况。结果显示人源化抗体 38E huH3L4 和 38E huH3L2 能够抑制 LIF 蛋白诱导的 STAT3 的磷酸化（图 23）。

实施例 27 M1 细胞增殖实验检测人源化抗 LIF 抗体的活性

M1 离心后，RPMI1640 培养基洗涤两次，按照 2.5x10⁵ 个/mL 的密度接种 96 孔板，每孔接种 80 μ L 细胞，加入含有 4ng/mL 重组人 LIF 蛋白和不同浓度抗 LIF 抗体的培养基，使每孔的最终体积为 160 μ L，同时设置不加 LIF 的对照孔，37℃培养箱培养 72 小时，加入 CCK-8 检测细胞增殖情况。结果详见图 24，结果显示人源化抗体 38E huH3L4-m 和 38E huH3L2-m 都能够逆转人 LIF 蛋白对 M1 细胞的增殖抑制，EC50 分别为 6.52 μ g/mL 和 8.93 μ g/mL。

实施例 28: LIF 抗体对 LIF 诱导的 STAT3 磷酸化的抑制作用

接种 100,000 个 KP4 细胞于 96 孔板中; 倍比稀释的 LIF 抗体与 20-100ng/ml LIF 蛋白室温孵育 0.5-1h, 形成 LIF-Ab 混合溶液; 加入 LIF-Ab 混合溶液于细胞孔中, 37℃ 刺激 5-30min; 按

- 5 P-STAT3(TYR705) KITS(Cisbio)和 Total-STAT3 KITS(Cisbio)说明书检测 P-STAT3 和 Total-STAT3 蛋白表达水平, 并计算每个孔的供体和受体的发射信号比: $\text{Ratio} = \text{Signal } 665\text{nm} / \text{Signal } 620\text{nm} \times 10^4$ 。用 GraphPad Prism 软件生成数据图并统计 LIF 抗体的抑制率。结果显示 LIF 抗体 38E HuH3L4 对 LIF 诱导 STAT3 磷酸化有抑制作用, 如图 25 所示, IC_{50} 为 3.415nM。

实施例 29: 检测 LIF 抗体的 ADCC 活性

- 10 LIF 与 GP130 和 LIFR 结合, 人源化 LIF 抗体阻断 LIF 与 LIFR 结合, 但不能阻断 LIF 与 GP130 结合。检测人源化 LIF 抗体是否通过 LIF 介导, 结合至细胞表面, 从而发生 ADCC 作用。用 ADCC 缓冲液(RPMI-1640+1%FBS)依次稀释抗体 Erbitux(爱必妥®, Merck Serono, 阳性对照)和 Human IgG2 (Cat#HG2K, Sino, 阴性对照); 再用含 LIF 蛋白的 ADCC 缓冲液稀释 38E huH3L4 抗体, 三倍稀释, 八个梯度, 备用; 用胰酶 (Cat#25200072, GIBCO) 消化 DLD-1 细胞, 终止反应后吹
- 15 散细胞收集到离心管中, 1500rpm 离心 3min, 弃上清, 用 ADCC 缓冲液重悬细胞并计数, 调整细胞浓度, 备用; 复苏 PBMC 细胞 (Cat#SLB-HP010B, 上海赛笠生物科技有限公司), 加入 10mL ADCC 缓冲液, 2000rpm 离心 10min, 弃上清, 重悬至 ADCC 缓冲液中计数, 调整细胞浓度, 备用; 取出 96 孔 U 底细胞培养板, 依次加入 50μl 靶细胞 DLD-1、50μl 抗体、50μl 效应细胞 PBMC, 效靶比 =30:1, 混匀置于 37℃ 5% CO₂ 孵箱反应 6h, 用 Cyto Tox96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay 试剂盒 (Cat#G1780, Promega) 检测 LDH, 用酶标仪在 490nm 测量吸光值。
- 20

计算各平行孔吸光值均值, 使所有实验孔、靶细胞 LDH 自发释放孔 (TCR)、效应细胞 LDH 自发释放孔 (ECR) 的吸光值均值减去空白培养基 (CMB) 的吸光值均值。靶细胞 LDH 最大释放孔 (TCM) 的吸光值均值减去体积校正对照孔 (VCC) 的吸光值均值。用上述校正后的值按照以下公式, 计算各浓度抗体产生的 Cytotoxicity (%):

- 25 $\text{Cytotoxicity (\%)} = (A - B - C) / (D - C) \times 100\%$
- A: 实验孔校正后的平均吸光值
- B: 效应细胞LDH自发释放孔校正后的平均吸光值
- C: 靶细胞LDH自发释放孔校正后的平均吸光值
- D: 靶细胞LDH最大释放孔校正后的平均吸光值
- 30 如图 26 所示, 38E huH3L4 抗体无 ADCC 活性。

参考文献

1. Nicola NA, Babon JJ. Leukemia inhibitory factor (LIF). *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015; 26(5):533-44.
2. Pastuschek J, Poetzsch J, Morales-Prieto DM, Schleußner E, Markert UR, Georgiev G. Stimulation of the JAK/STAT pathway by LIF and OSM in the human granulosa cell line COV434. *J Reprod Immunol.* 2015; 108:48-55.
3. Liu SC, Tsang NM, Chiang WC, Chang KP, Hsueh C, Liang Y, Juang JL, Chow KP, Chang YS. Leukemia inhibitory factor promotes nasopharyngeal carcinoma progression and radioresistance. *J Clin Invest.* 2013; 123(12):5269-83.
4. Shi Y, Gao W, Lytle NK, Huang P, Yuan X, Dann AM, et al. Targeting LIF-mediated paracrine interaction for pancreatic cancer therapy and monitoring. *Nature.* 2019; 569(7754):131-135.
5. Cartwright P, McLean C, Sheppard A, Rivett D, Jones K, Dalton S. LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development* 2005; 132:885-96.
6. Kuphal S, Wallner S, Bosserhoff AK. Impact of LIF (leukemia inhibitory factor) expression in malignant melanoma. *Exp Mol Pathol* 2013; 95:156-65.
7. Liu B, Lu Y, Li J, Liu Y, Liu J, Wang W. Leukemia inhibitory factor promotes tumor growth and metastasis in human osteosarcoma via activating STAT3. *APMIS* 2015; 123:837-46.
8. Morton SD, Cadamuro M, Brivio S, Vismara M, Stecca T, Massani M, et al. Leukemia inhibitory factor protects cholangiocarcinoma cells from drug induced apoptosis via a PI3K/AKT-dependent Mcl-1 activation. *Oncotarget.* 2015; 6:26052-64.
9. Kamohara H, Ogawa M, Ishiko T, Sakamoto K, Baba H. Leukemia inhibitory factor functions as a growth factor in pancreas carcinoma cells: involvement of regulation of LIF and its receptor expression. *Int J Oncol.* 2007; 30:977-83.
10. Shin JE, Park SH, Jang YK. Epigenetic up-regulation of leukemia inhibitory factor (LIF) gene during the progression to breast cancer. *Mol Cells* 2011; 31:181-9.
11. Li X, Yang Q, Yu H, Wu L, Zhao Y, Zhang C, Yue X, Liu Z, Wu H, Haffty BG, Feng Z, Hu W. LIF promotes tumorigenesis and metastasis of breast cancer through the AKT-mTOR pathway. *Oncotarget.* 2014; 5(3):788-801.
12. Liu SC, Hsu T, Chang YS, Chung AK, Jiang SS, OuYang CN, Yuh CH, Hsueh C, Liu YP, Tsang NM. Cytoplasmic LIF reprograms invasive mode to enhance NPC dissemination through modulating YAP1-FAK/PXN signaling. *Nat Commun.* 2018; 9(1):5105.
13. Viswanadhapalli S, Luo Y, Sareddy GR, Santhamma B, Zhou M, et al. EC359: A First-in-Class Small-Molecule Inhibitor for Targeting Oncogenic LIFR Signaling in Triple-Negative Breast Cancer. *Mol Cancer Ther.* 2019; 18(8):1341-1354.