



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07K 16/00 (2024.01); A61K 39/395 (2024.01)

(21)(22) Заявка: 2023135667, 28.12.2023

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
28.12.2023

Дата регистрации:  
22.07.2024

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 28.12.2023

(45) Опубликовано: 22.07.2024 Бюл. № 21

Адрес для переписки:

188300, Ленинградская обл., г. Гатчина, мкр.  
Орлова Роща, 1, Федеральное государственное  
бюджетное учреждение "Петербургский  
институт ядерной физики им. Б.П.  
Константинова Национального  
исследовательского центра "Курчатовский  
институт" (НИЦ "Курчатовский институт" -  
ПИЯФ)

(72) Автор(ы):

Демьянов Антон Викторович (RU),  
Жахов Александр Владимирович (RU),  
Гараева Луиза Абдул-Азизовна (RU),  
Емельянова Светлана Сергеевна (RU),  
Никитина Анастасия Владимировна (RU),  
Путевич Елена Дмитриевна (RU),  
Биджиева Медина Сагитовна (RU),  
Потысьева Алина Сергеевна (RU),  
Волницкий Андрей Васильевич (RU),  
Кванчяни Варвара Валерьевна (RU),  
Сидорова Жанна Юрьевна (RU),  
Виноградова Дарья Сергеевна (RU),  
Грачев Александр Альбертович (RU),  
Толичева Ольга Андреевна (RU),  
Бурдаков Владимир Станиславович (RU),  
Касацкий Павел Сергеевич (RU),  
Верлов Николай Александрович (RU),  
Штам Татьяна Александровна (RU),  
Трашков Александр Петрович (RU),  
Коневега Андрей Леонидович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное  
учреждение "Петербургский институт  
ядерной физики им. Б.П. Константинова  
Национального исследовательского центра  
"Курчатовский институт" (НИЦ  
"Курчатовский институт" - ПИЯФ) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: US 20230235046 A1, 27.07.2023. EP  
3445785 A1, 27.02.2019. EP 3445785 B1,  
22.06.2022. EA 41532 B1, 03.11.2022. Dunkel J.,  
Viitala M., Karikoski M., Rantakari P., Virtakoivu  
R., Elima K., Hollm&eacute;n M., Jalkanen S.,  
Salmi M. Enhanced Antibody Production in  
Clever-1/Stabilin-1-Deficient Mice. Front  
Immunol. 2018 Oct 8;9:2257. doi: (см. прод.)

(54) Антитела против рецептора стабилин-1 (stabilin-1) человека

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биохимии, в частности к моноклональному антителу, способному специфически связываться с рецептором стабилин-1 человека, а именно мышинным моноклональным антителам против стабилин-1. Антитела против рецептора стабилин-1 человека с высокой аффинностью с

$K_D=2.23 \times 10^{-12}$  М связывают рекомбинантный белок стабилин-1 человека и нативный стабилин-1 на поверхности макрофагов человека, обеспечивая накопление антител в опухолевом узле. Изобретение может быть эффективно использовано для лечения заболеваний, ассоциированных со стабилин-1 человека. 4 ил.

(56) (продолжение):

10.3389/fimmu.2018.02257. PMID: 30349531; PMCID: PMC6187969.

R U 2 8 2 3 3 0 9 C 1

R U 2 8 2 3 3 0 9 C 1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

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

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC  
*C07K 16/00 (2024.01); A61K 39/395 (2024.01)*

(21)(22) Application: **2023135667, 28.12.2023**

(24) Effective date for property rights:  
**28.12.2023**

Registration date:  
**22.07.2024**

Priority:

(22) Date of filing: **28.12.2023**

(45) Date of publication: **22.07.2024** Bull. № 21

Mail address:

188300, Leningradskaya obl., g. Gatchina, mkr.  
Orlova Roshcha, 1, Federalnoe gosudarstvennoe  
byudzhethnoe uchrezhdenie "Peterburgskij institut  
yadernoj fiziki im. B.P. Konstantinova  
Natsionalnogo issledovatelskogo tsentra  
"Kurchatovskij institut" (NITS "Kurchatovskij  
institut" - PIYAF)

(72) Inventor(s):

**Demyanov Anton Viktorovich (RU),  
Zhakhov Aleksandr Vladimirovich (RU),  
Garaeva Luiza Abdul-Azizovna (RU),  
Emelyanova Svetlana Sergeevna (RU),  
Nikitina Anastasiya Vladimirovna (RU),  
Putevich Elena Dmitrievna (RU),  
Bidzhieva Medina Sagitovna (RU),  
Potyseva Alina Sergeevna (RU),  
Volnitskij Andrej Vasilevich (RU),  
Kvanchiani Varvara Valerevna (RU),  
Sidorova Zhanna Yurevna (RU),  
Vinogradova Darya Sergeevna (RU),  
Grachev Aleksandr Albertovich (RU),  
Tolicheva Olga Andreevna (RU),  
Burdakov Vladimir Stanislavovich (RU),  
Kasatskij Pavel Sergeevich (RU),  
Verlov Nikolaj Aleksandrovich (RU),  
Shtam Tatyana Aleksandrovna (RU),  
Trashkov Aleksandr Petrovich (RU),  
Konevega Andrej Leonidovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethnoe  
uchrezhdenie "Peterburgskij institut yadernoj  
fiziki im. B.P. Konstantinova Natsionalnogo  
issledovatelskogo tsentra "Kurchatovskij institut"  
(NITS "Kurchatovskij institut" - PIYAF) (RU)**

(54) **ANTIBODIES AGAINST HUMAN STABILIN-1 RECEPTOR**

(57) Abstract:

FIELD: biochemistry.

SUBSTANCE: invention relates to biochemistry,  
in particular to a monoclonal antibody capable of  
specifically binding to a human stabilin-1 receptor,  
namely to murine monoclonal antibodies against  
stabilin-1. Antibodies against human stabilin-1 receptor  
with high affinity with  $K_D=2.23 \times 10^{-12}$  M binds

recombinant human stabilin-1 protein and native  
stabilin-1 on the surface of human macrophages,  
providing accumulation of antibodies in the tumour  
node.

EFFECT: invention can be effectively used for  
treating diseases associated with human stabilin-1.

1 cl, 4 dwg

RU 2 823 309 C1

RU 2 823 309 C1

Изобретение относится к области биохимии, в частности к моноклональному антителу, способному специфически связываться с рецептором стабилин-1 человека, а именно мышинным моноклональным антителом против стабилин-1. Изобретение может быть использовано для лечения заболеваний, ассоциированных со стабилин-1 человека.

5 Моноклональные антитела (МАТ) к стабилин-1 представляют собой перспективный класс биологически активных веществ. Они выступают в качестве эффективных инструментов в лечении различных заболеваний, особенно онкологических, благодаря своей способности регулировать сигнальные пути, вовлеченные в ангиогенез и иммунный ответ.

10 Стабилин-1 (stabilin-1, также известный как Clever-1 и FEEL-1) представляет собой рецептор, экспрессируемый на лимфатических эндотелиальных клетках, синусоидальных эндотелиальных клетках и иммуносупрессивных моноцитах и макрофагах [Kzhyshkowska J. Gratchev A. Goerd S. Stabilin-1, a homeostatic scavenger receptor with multiple functions J. Cell. Mol. Med.2006 10 635 649]. Выделяют две субпопуляции макрофагов: воспалительные  
15 M1- макрофаги, отвечающие за уничтожение чужеродных агентов как напрямую, так и за счет привлечения и активации других клеток иммунной системы и M2-макрофаги, выполняющие адаптивную, регенераторную и противовоспалительную функции. Одним из ключевых маркеров M2-макрофагов является мембранный гликопротеин, способный химически связывать модифицированные липопротеиды низкой плотности и  
20 модулировать регуляторные свойства макрофагов - стабилин-1.

Макрофаги, помимо различия в выполняемых функциях, обладают свойством пластичности, которое позволяет им изменять свой фенотип и функции в ответ на сигналы микроокружения, в частности опухолевой стромы при злокачественных  
25 заболеваниях. Роль опухолевой стромы в патогенезе злокачественных опухолей не подвергается сомнению. Макрофаги - одни из ключевых элементов опухолевой стромы. Макрофаги, ассоциированные с опухолью (MAO), являются макрофагами 2-го типа активации, которые обладают выраженной противовоспалительной активностью и отвечают за подавление воспалительной реакции и восстановления ткани в очаге  
30 воспаления. MAO вносят значительный вклад в прогрессию опухолей за счет стимуляции пролиферации клеток, ангиогенеза и подавления противоопухолевого иммунного ответа. К их маркерам относится и стабилин-1. Анализ различных форм рака у человека выявил заметную связь между количеством стабилин-1-положительных макрофагов и исходом заболевания.

Роль стабилин-1 в росте и распространении рака впервые была показана на моделях  
35 мышей с нокаутом Stab 1  $-/-$ , у которых развивались первичные опухоли и метастазы меньшего размера. Последующие исследования на мышах и людях показали, что иммунотерапевтическая блокада стабилин-1 может активировать Т-клеточные ответы, и что этот ответ в основном опосредован фенотипическим изменением макрофагов и моноцитов с иммуносупрессивных на провоспалительные [Dunkel, J., Viitala, M., Karikoski,  
40 M., Rantakari, P., Virtakoivu, R., Elima, K. et al. Enhanced antibody production in Clever-1/ Stabilin-1-deficient mice. Front. Immunol. 9,2257 (2018)].

Известно одно терапевтическое антитело против стабилина-1 (Stabilin-1, Clever-1) человека, которое в настоящее время находится на стадии клинических испытаний (MATINS, NCT03733990). Бексмарилимаб (FP-1305) - гуманизированное моноклональное  
45 антитело изотипа IgG4, которое продемонстрировало значимую противоопухолевую активность в доклинических и одном клиническом исследованиях. Исследование FP-1305, NCT03733990) - это первое открытое адаптивное клиническое исследование фазы 1/2 с участием избранных метастатических или неоперабельных солидных опухолей с

целью изучения безопасности и эффективности Бексмарилимаба. Выбранные опухоли включают кожную меланому, поджелудочную железу, яичники, эстроген-рецептор-положительные опухоли молочной железы, колоректальный рак, рак желудка, рак желчного пузыря и холангиокарциному, все из которых, как известно, содержат большое количество стабиллин-1-положительных макрофагов. Ранние результаты исследования Бексмарилимаба, в которую вошли 11 пациентов, получавших лечение, показывают многообещающую переносимость, клиническую противоопухолевую активность и мобилизацию естественных клеток-киллеров, В-клеток и Т-клеток после лечения [Bono, P., Hollmen, M., Jaakkola, P., Shetty, S., Thibault, A., de Jonge, M. et al. LBA29 Immune activation with a novel immune switch anti-macrophage antibody (anti-Clever-1 mAb; FP-1305) in phase I/II first-in-human MATINS trial in patients with advanced solid tumours. *Ann. Oncol.* 30, mdz394-018 (2019)]. Данные тестирования препарата, успешно проходящего клинические испытания, подчеркивают актуальность и востребованность разработки новых молекул в данной области.

Технической задачей, на решение которой направлено настоящее изобретение, является расширение спектра моноклональных антител против стабиллин-1.

Технический результат - получение нового моноклонального мышинового антитела (МАТ) ТШК 10, которое с высокой аффинностью ( $K_D=2,23 \times 10^{12}$  М) связывает рекомбинантный белок стабиллин-1 человека и нативный стабиллин-1 на поверхности макрофагов человека, обеспечивая накопление антитела в опухолевом узле.

Поставленная задача решается созданием моноклонального антитела мыши способного специфически связываться с рецептором стабиллин-1 человека, содержащего переменный домен тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 1, переменный домен легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 2 и гиперпеременные участки тяжелой и легкой цепей с последовательностями SEQ ID NO: 3-8.

В настоящем изобретении технический результат достигнут получением нового моноклонального мышинового антитела (МАТ) ТШК 10, изотипа IgG2a, специфически связывающего рекомбинантный белок стабиллин-1 человека с высокой аффинностью ( $K_D=2.23 \times 10^{12}$  М), а также связывающего нативный стабиллин-1 на поверхности макрофагов человека. При этом, МАТ ТШК 10 накапливалось в области опухолевого узла перевитых клеток рака кишечника мыши в экспериментах *in vivo*. Полученное МАТ ТШК 10 может быть использовано для получения химерных и гуманизированных антител и адресной доставки с их помощью тераностического радиофармацевтического препарата или цитотоксических веществ к опухоли.

Способ получения антител

Технология получения мышинных антител включала в себя иммунизацию мышей антигеном рекомбинантного белка стабиллин-1 человека, получение и отбор позитивных гибридных клонов - продуцентов моноклональных антител с помощью иммуноферментного анализа (ИФА), наработку антител в асцитах мышей, выделение и очистку антител на белок А-сефарозе и разноплановые исследования полученных антител. Нуклеотидные последовательности переменных доменов легкой и тяжелой цепей полученного мышинового моноклонального антитела были изучены с помощью генетического секвенирования.

Заявленное изобретение иллюстрируется следующими графическими материалами:

На Фиг. 1 показаны результаты электрофореза моноклонального антитела ТШК10. А - не восстанавливающие условия, Б - восстанавливающие условия. 1 - белковый маркер молекулярного веса, 2 - моноклональное антитело ТШК 10.

На Фиг. 2 показаны результаты иммуноферментного анализа (ИФА) моноклонального антитела ТШК 10 к антигену-мишени стабилин-1 человека (А) и мыши (Б).

На Фиг. 3 показаны данные проточной цитометрии при визуализации нативного стабилин-1 моноклональными антителами ТШК 10 на поверхности макрофагов человека.

На Фиг. 4 показан флуоресцентный прижизненный имиджинг мышей с привитыми опухолями СТ-26 (верхний ряд) и здоровых лабораторных мышей (нижний ряд) через 48 часов после внутривенного введения МАТ ТШК 10 к рецептору стабилин-1, меченных флюорохромом Cyanine7.

Сущность и промышленная применимость изобретения поясняются следующими примерами:

Пример 1.1. Получение гибридом, продуцирующих моноклональные антитела мыши к белку стабилин-1 человека

На первом этапе проведена 1-я иммунизация шести мышей Balb/c препаратом рекомбинантного стабилин-1 человека (Recombinant Stabilin 1 (СТАВ 1 человека), RPC872Hu01, Cloud-CloneCorp.). Мыши иммунизировались в апоневроз задних конечностей в полном адьюванте Фрейнда (ПАФ). Для иммунизации раствор препарата смешивали с равным объемом ПАФ (100 мкл/мышь) из расчета 20 мкг антигена на мышь. Через 2 недели после первой иммунизации все мыши были повторно иммунизированы раствором препарата рекомбинантного СТАБИЛИН-1 человека в смеси с неполным адьювантом Фрейнда (1:1), в объеме 100 мкл/мышь, в апоневроз задних конечностей, из расчета 20 мкг антигена на мышь. На четвертый день после последней иммунизации у наркотизированных и умерщвленных животных забирали лимфоциты паховых и брюшных лимфоузлов для гибридизации с миеломой SP2/0. Полученные лимфоциты смешивали с клетками миеломы в соотношении 1:1. Гибридизацию проводили по методу Мильштейна-Келлера [Kohler G. and Milstein S. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity // Nature, 1975, 256 (5517): 495-497] инкубацией клеток в 50% растворе полиэтиленгликоля (ПЭГ) (молекулярная масса 1500 Да) в течение 1,5 мин, после чего к суспензии последовательно с интервалом 1 мин добавляли среду RPMI-1640 объемами, равными первоначальному объему раствора ПЭГ. После гибридизации клетки дважды отмывали культуральной средой и высевали в 96-луночные культуральные планшеты с суточными перитонеальными макрофагами, вносили гибридные клетки в количестве  $1,5 \times 10^5$  клеток на лунку. Селекцию гибридов проводили в среде RPMI-1640 с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки, содержащей  $10^{-4}$  М гипоксантина,  $4 \times 10^{-7}$  М аминоптерина и  $1,6 \times 10^{-5}$  М тимидина. Итого в гибридизацию пошло 50 млн. лимфоцитов и 50 млн. клеток SP2/0, которые после гибридизации рассеяли на 10 плат. Через 10 дней платы исследовали под микроскопом. В платах с клетками лимфоузлов было от 1 до 4 клонов, поэтому платы скринировали целиком. Скрининг позитивных клонов, секретирующих моноклональные антитела (МАТ) проводили методом непрямого твердофазного ИФА, регистрируя связывание антител с антигеном, иммобилизованным в лунках планшета с высокой сорбционной емкостью. Для иммобилизации антигена в лунки 96-луночного планшета для ИФА вносили антиген стабилин-1 (Recombinant Stabilin 1 (СТАВ1 человека), RPC872Hu01, Cloud-CloneCorp.) в концентрации 5 мкг/мл, приготовленный на 0,01 М карбонатном буферном растворе, pH 9,6 в объеме 100 мкл (Буфер А) и выдерживали при комнатной температуре в течение 16 ч. Лунки планшета отмывали забуференным

физиологическим раствором, содержащим 0,05% Твин-20 (ЗФР-Т) и вносили в них супернатант культуральной жидкости гибридных клеток в объеме 50 мкл и 100 мкл ЗФР-Т. Планшет инкубировали при температуре плюс 37°C в течение 1 ч. После этого лунки планшета трижды отмывали раствором ЗФР-Т и добавляли в лунки антитела против иммуноглобулинов мыши, меченные пероксидазой хрена, в рабочем разведении. Планшет инкубировали при температуре плюс 37°C в течение 1 ч, затем пятикратно отмывали раствором ЗФР-Т, после чего добавляли хромогенный субстрат тетраметилбензидин (ТМБ). Клоны клеток, продуцирующие моноклональные антитела к препарату рекомбинантного стабилин-1 человека, отбирали на основании положительной иммуноферментной реакции, которая проявлялась в виде окрашивания продукта хромогена - ТМБ. Реакцию останавливали добавлением в лунки по 50 мкл 4N серной кислоты. Планшеты сканировали на планшетном ридере, измеряя поглощение при 450 нм. В результате была отобрана гибридома, продуцирующая МАТ к рекомбинантному стабилин-1 человека, которая была обозначена как: ТШК 10.

Отобранный положительный клон многократно клонировали методом конечных разбавлений с отбором наиболее продуктивных и стабильных клонов. Клетки высевали в ячейки планшетов, содержащие перитонеальные макрофаги нормальных мышей (фидер), в концентрациях приблизительно 2 клетки на ячейку с тем расчетом, чтобы в большинстве ячеек вырос единственный клон. Полученные одиночные клоны скринировали посредством ИФА, алгоритм проведения скрининга был аналогичным алгоритму первичного скрининга клонов. Если все клоны каждого типа антител оказывались положительными, то клетки любого положительного клона нарабатывали в культуральных флаконах путем культивирования при температуре плюс 37°C в атмосфере, содержащей 5% углекислого газа. В качестве среды для культивирования использовали RPMI-1640, содержащую 20% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин, 50 мкг/мл гентамицина. Культивирование проводили до получения необходимого количества клеток для введения в мышей (с целью наработки антител в асцитах) и для криоконсервации, из расчета 2 млн на мышь 5 млн на ампулу. На 10 день после посева на клонирование платы с клетками клонов исследовали под микроскопом и отмечали лунки, в которых присутствовал только один клон. Культуральные жидкости одиночных клонов отбирали для анализа методом ИФА.

#### Пример 1.2. Изотипирование МАТ ТШК 10

Для клона ТШК 10 было проведено изотипирование, с целью установления класса иммуноглобулинов. Изотипирование проводили методом непрямого твердофазного ИФА с использованием набора реактивов Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents (SigmaAldrich, кат.№IS02-1КТ), регистрируя связывание антител с антигеном, иммобилизованным в лунках планшета с высокой сорбционной емкостью. Для иммобилизации антигена в лунки 96-луночного планшета для ИФА вносили антиген стабилин-1 в концентрации 5 мкг/мл, приготовленный на 0,01 М карбонатном буферном растворе, рН 9,6 в объеме 100 мкл (БуферА) и выдерживали при комнатной температуре в течение 16 ч. Лунки планшета отмывали забуференным физиологическим раствором, содержащим 0,05% Твин-20 (ЗФР-Т) и вносили в них супернатант культуральной жидкости гибридных клеток в объеме 50 мкл и 100 мкл (ЗФР-Т). Планшет инкубировали при температуре плюс 37°C в течение 1 ч. После этого лунки планшета вновь трижды отмывали раствором ЗФР-Т и добавляли в лунки антитела против изотипов иммуноглобулинов мыши IgG1, IgG2a IgG2b, IgG3, IgGM, IgGA, меченные пероксидазой хрена, в рабочем разведении. Планшет инкубировали при температуре плюс 37°C в течение 1 ч, затем пятикратно отмывали раствором ЗФР-Т, после чего добавляли

хромогенный субстрат тетраметилбензидин (ТМБ). Изотип иммуноглобулинов, продуцируемых клоном, определяли на основании положительной иммуноферментной реакции на антитела к определенному анти-изотипическому антителу, которая проявлялась в виде окрашивания продукта хромогена - ТМБ. Реакцию останавливали добавлением в лунки по 50 мкл 4N серной кислоты. Планшеты сканировали на планшетном ридере, измеряя поглощение при 450 нм. В результате изотипирования полученных моноклональных антител было выявлено, что МАТ ТШК 10 представляют собой изотип IgG2a.

#### Пример 1.3. Нарботка моноклональных антител

Нарботку моноклональных антител ТШК 10 для изучения их свойств осуществляли в организме инбредных мышей линии BALB/c, которым до введения клеток гибридомы внутрибрюшинно (в/бр) вводили 0,5 мл 14-тетраметилпентадекана (пристана). Через 14 дней этим животным также в/бр вводили прививочную дозу  $2 \times 10^6$  гибридных клеток на мыш. Через 10 дней после этого мышей переводили на питьевую диету физиологическим раствором и в течение последующих 2-8 дней наблюдали за ростом объема брюшной полости с асцитической жидкостью. При достижении брюшной полостью заметного объема асцитическую жидкость (объемом 3-5 мл), содержащую моноклональные антитела, отбирали и определяли в ней титр антител методом ИФА. Продукция МАТ в асцитических жидкостях мышей варьировала от 1 до 2 мг/мл.

#### Пример 1.4. Выделение и очистка моноклональных антител

Полученную асцитическую жидкость осветляли центрифугированием (30 мин, 20000 об/мин), после чего моноклональные антитела выделяли из супернатанта осаждением сульфатом аммония, и затем очищали методами аффинной хроматографии с использованием сорбента с белком А. Осаждение сульфатом аммония проводили добавлением к супернатанту порошка  $\text{NH}_2\text{SO}_4$  до концентрации 45% от насыщения. Для формирования осадка раствор оставляли в холодильнике (плюс 2-6°C) на ночь. Осадок отделяли центрифугированием (15 мин, 10000 об/мин), растворяли в минимальном растворе 20 мМ Na-фосфатного буферного раствора с 0,15 М NaCl, pH 7,2 (ФСБ) и затем диализовали приблизительно 16 часов при плюс 2-6°C против 1,5 М глицина с 3 М NaCl, pH 8,6. Диализат с помощью насоса наносили со скоростью 1 мл/мин на колонку (10x50 мм), заполненную 5 мл сорбента с белком А и уравновешенную тем же буферным раствором. После сорбции сорбент промывали 50 мл этого же буферного раствора. Элюцию проводили 20 мл 20 мМ натрий-цитратного буферного раствора, pH 4,0 для элюции антител с изотипом IgG2. Элюат, содержащий антитела, собирали в емкость, контролируя процесс выхода белка с колонки с помощью УФ детектора хроматографа. Далее антитела концентрировали осаждением сульфатом аммония. Осаждение сульфатом аммония проводили добавлением к супернатанту порошка  $\text{NH}_2\text{SO}_4$  до концентрации 45% от насыщения. Для формирования осадка раствор оставляли в холодильнике (плюс 2-6°C) на ночь. Осадок отделяли центрифугированием (15 мин, 10000 об/мин), растворяли в минимальном растворе 20 мМ Na-фосфатного буферного раствора с 0,15 М NaCl, pH 7,2 (ФСБ) и затем диализовали приблизительно 16 часов при плюс 2-6°C против 20 мМ Na-фосфатного буферного раствора с 0,15 М NaCl, pH 7,2. После диализа определяли содержание белка методом спектрофотометрии при длине волны 280 нм, используя молярный коэффициент экстинкции для мышинных IgG.

#### Пример 1.5. Оценка чистоты полученного препарата МАТ ТШК10

Оценку чистоты и гомогенности полученных препаратов антител проводили с

помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в не восстанавливающих и восстанавливающих условиях. По данным электрофореза в не восстанавливающих условиях препарат МАТ ТШК 10 демонстрирует одну мажорную зону, молекулярного веса более 150 кДа, что соответствует молекулярному весу иммуноглобулинов и свидетельствует о чистоте препарата. Результаты электрофореза в полиакриламидном геле в восстанавливающих условиях свидетельствует о том, что антитело ТШК10 характеризуется типичным для иммуноглобулинов класса G наличием двух цепей - тяжелой и легкой, с молекулярными массами 55 и 25 кДа соответственно (Фиг. 1).

Пример 2. Исследование свойств моноклональных антител ТШК 10. Оценка эффективности связывания моноклонального антитела ТШК 10 с рекомбинантным белком стабиллин-1

Для определения связывания моноклональных антител ТШК 10 к антигену-мишени стабиллин-1 применяли твердофазный вариант ИФА. В качестве твердой фазы использовали полистироловые 96-ти луночные планшеты Corning (Costar). В качестве антигена для иммобилизации твердой фазы использовали рекомбинантные белки стабиллин-1 человека (Recombinant Stabilin 1 (STAB1 человека), RPC872Hu01, Cloud-CloneCorp.) и мыши (Recombinant Stabilin 1 (STAB 1 мыши), RPC872Mu01, Cloud-CloneCorp.) в концентрации 2,5 мкг/мл. Адсорбцию антигена проводили в 20 мМ боратном буфере с pH 8,0, содержащем 0,15 М NaCl, в течение 20 часов во влажной камере при +4°C. Моноклональные антитела ТШК 10 наносили в 100 мкл промывочного буфера (фосфатно-солевой буфер, pH 7,4, 0,05% Tween-20), содержащего 1 мг/мл БСА с последовательным разбавлением антител в 2 раза, начиная со стартовой концентрации 2 мкг/мл. Планшеты инкубировали 1 час при 37°C и перемешивании. По окончании инкубации проводили отмывку не связавшихся с антигеном антител промывочным буфером и вносили в лунки раствор конъюгированных с пероксидазой хрена иммуноглобулинов козы к иммуноглобулинам мыши (Sigma-Aldrich, США) в разведении 1:20.000. Планшеты инкубировали 1 час при 37°C и перемешивании. По окончании инкубации проводили отмывку не связавшихся антител промывочным буфером. Проявление связавшихся вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена, проводили с помощью раствора 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ). Реакцию останавливали добавлением 1М серной кислоты при этом ТМБ приобретает желтый цвет с максимальной поглощающей способностью при 450 нм. Количество преобразованного ТМБ детектировали с помощью планшетного ридера EnSpire Multimode Plate Reader (Perkin Elmer, USA) при длине волны 450 нм. Полученные результаты обрабатывали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 9.4.0., фиттируя зависимость оптической плотности при длине волны 450 нм (OD450) от концентрации МАТ кривой Михаэлиса-Ментена [[https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/curve-fitting/reg\\_michaelis\\_menten\\_enzyme.htm](https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/curve-fitting/reg_michaelis_menten_enzyme.htm)] и определяя константу связывания  $K_m$  как концентрацию МАТ, необходимую для достижения половины максимальной OD450.

Иммуноферментный анализ показал (Фиг. 2), что моноклональное антитело ТШК 10 против человеческого стабиллин-1 обладает сильной связывающей активностью с человеческим стабиллин-1 ( $k_m=16$  нМ), при этом демонстрировало невысокую связывающую активность с мышинным антигеном стабиллин-1 ( $k_m=33$  мкМ). Результаты исследований приведены на Фиг. 2.

Для определения константы связывания  $K_d$  моноклонального антитела ТШК 10 проводили измерение параметров взаимодействия полученных МАТ ТШК 10 с человеческим и мышинными антигенами стабиллин-1 методом бислойной интерферометрии

(ВЫ) на приборе Octet® RED 96 Forte Bio (Sartorius) с использованием сенсоров Octet® Anti-Mouse IgG Fc Capture (АМС) и Anti-Human IgG Fc Capture (АНС) и двух рекомбинантных белков стабиллин-1: рекомбинантный стабиллин-1 человека (RPC872Hu01, Cloud-CloneCorp.) и рекомбинантный мышинный стабиллин-1 (RPC872Mu01, Cloud-CloneCorp.). По результатам измерения кинетических свойств связывания антитела ТШК 10 с человеческим рекомбинантным антигеном стабиллин-1 была определена  $Kd=2.23 \cdot 10^{-12}$  М.

Пример 3. Исследование свойств моноклональных антител ТШК 10. Анализ связывания антител ТШК 10 с нативным антигеном стабиллин-1 на поверхности макрофагов человека

Целью этого этапа исследований была проверка связывания нативного антигена на поверхности клеток человека полученными моноклональными антителами ТШК 10. В качестве клеточной модели экспрессии рецептора стабиллин-1, согласно имеющейся на литературе, была использована первичная культура макрофагов человека [Julia Kzhyshkowska. Multifunctional Receptor Stabilin-1 in Homeostasis and Disease. *Ehe Scientific World JOURNAL* (2010) 10, 2039-2053 DOI 10.1100/tsw.2010.189]. Получение макрофагов человека проводили по следующей методике. Для получения моноцитарной фракции использовался метод градиентного центрифугирования (400g, 40 минут), смешанной с PBS, свежесобранной цельной крови здоровых доноров в растворе фикола плотностью 1.077 (Биолот, Россия). Отобранная средняя лимфоцитарная фракция культивировалась на чашках Петри в приготовленной среде для макрофагов (RPMI-1640 (Биолот, Россия), 10% сыворотка крови человека, 20 мкг/мл Гентамицин (Биолот, Россия)) в течение 2-х часов в инкубаторе при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> с последующей сменой среды. Дифференцировка моноцитов в макрофаги осуществлялась в течение четырех суток с ежедневной сменой среды в инкубаторе при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Для дальнейших экспериментов на пятые сутки макрофаги были сняты с подложки чашки Петри при помощи стерильного одноразового шпателя и зафиксированы в 4%-м формальдегиде. Далее макрофаги человека инкубировали с МАТ ТШК 10 в количестве 2 мкг на 10<sup>6</sup> клеток. Окрашивали вторичными антителами anti-mouse-Alexa488 (17 c01220, Hansa BioMedLife Science, Эстония, 1нг/мл) 1 ч, 4°C и визуализировали на проточном цитометре CytoFlex (Beckman Coulter, США) при лазере 480 нм, накапливая 20000 событий.

На Фиг. 3 показаны данные проточной цитометрии при визуализации стабиллин-1 МАТ ТШК 10 на поверхности макрофагов человека. Представленные на цитограммах интенсивности флюоресценции макрофагов человека, связавших тестируемые МАТ ТШК 10, более чем в 100 раз превышают интенсивность флюоресценции макрофагов человека, не специфически окрашенных только вторичными антителами (контроль). Таким образом, результаты приведенные на Фиг. 3, свидетельствуют о том, что тестируемые антитела ТШК 10 связываются на поверхности клеток первичной культуры макрофагов человека.

Пример 4. Анализ связывания антител ТШК 10 с антигеном стабиллин-1 в клетках опухолевого узла в модели лабораторных животных

Для оценки биораспределения МАТ ТШК 10 к рецептору стабиллин-1 в организме здоровых животных и животных с сформировавшимся опухолевым узлом использовали самцов линии DBA/BALB. Исследование проводилось в соответствии с правилами проведения манипуляций с лабораторными животными и с соблюдением биоэтики. Соответствующие протоколы экспериментов были одобрены комитетом по биоэтике Отделения молекулярной и радиационной биофизики НИЦ «Курчатовский институт»

5 -ПИЯФ. Мышам подкожно вводили  $2 \times 10^5$  клеток рака кишечника мыши СТ-26 на мышь. Через 5 дней после прививки опухоли проводили внутривенное введение МАТ ТШК 10 (80 мкг/мышь). Флуоресцентный прижизненный имиджинг лабораторных мышей линии DBA/BALB через 48 часов после внутривенного введения МАТ ТШК 10 к рецептору стабилин-1 (80 мкг/мышь), меченных флюорохромом Cyanine7 (Люмипроб РУС, Россия), проводили на системе доклинической визуализации люминесценции и флуоресценции LumoTrace FLUO (Abisense, Сириус, Россия). Результаты проведенного анализа, представленные на Фиг. 4, показывают, что тестируемые антитела ТШК 10 связываются и накапливаются в клетках опухолевого узла в модели рака кишечника СТ-26 *in vivo*.

10 Пример 5. Определение нуклеотидных последовательностей и анализ генов переменных областей легкой и тяжелой цепей мышинового моноклонального антитела ТШК 10

15 Рибонуклеиновую кислоту (РНК) из клеток клона ТШК 10 выделяли с помощью набора GeneJET RNA Purification kit (Thermo scientific, Lithuania) и затем на матрице данной РНК методом обратной транскрипции получали кДНК с помощью праймера oligo(dT)18 и обратной транскриптазы MMLV (ЗАО «Евроген», Россия) по инструкции изготовителя. Далее с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПНР) с использованием известных наборов праймеров и высокоточной смеси ДНК- полимераз High Fidelity PCR Enzyme Mix (Thermo scientific, Lithuania) получали фрагменты ДНК, кодирующие переменные участки тяжелой и легкой цепей антитела. ПЦР-продукты переменных фрагментов легкой и тяжелой цепей иммуноглобулинов анализировали с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле. Полосы продуктов ожидаемого размера в районе 450 пар оснований вырезали из геля, элюировали с помощью набора реагентов для выделения ДНК из агарозного геля (ЗАО «Евроген», Россия). После этого полученные ПЦР-продукты анализировали секвенированием. Секвенирование проводили на капиллярном секвенаторе AB3500 (Applied Biosystems, США) с помощью коммерческого набора BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США), очистку образцов перед анализом проводили с помощью набора BigDye® X Terminator™ Purification Kit (Applied Biosystems, США).

25 Найденные последовательности полученных фрагментов ДНК, кодирующих переменные области тяжелой и легкой цепей моноклонального антитела ТШК 10 представлены в SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2 соответственно.

30 Функциональный и структурный анализ переменных фрагментов легкой и тяжелой цепи исследуемого антитела, проведенный с помощью инструмента IMGT/V-QUEST и базы данных IMGT [[www.imgt.org](http://www.imgt.org)], показал расположение рамочных и образующих комплементарность участков (CDR-участков). Найденные последовательности CDR-участков представлены в SEQ ID NO: 3-5 и SEQ ID NO: 6-8 для тяжелой и легкой цепей соответственно.

35 Таким образом, заявляемые антитела против рецептора стабилин-1 человека, являются новыми моноклональными мышинными антителами МАТ ТШК 10 с полученной аминокислотной последовательностью, имеющими изотип IgG2a и обладающими при этом специфичностью и высокой аффинностью к стабилин-1 человека ( $K_d = 2.23 \times 10^{-12}$  М), а также связывающего нативный стабилин-1 на поверхности макрофагов человека. Вместе с тем, МАТ ТШК 10 эффективно накапливается в области опухолевого узла перевитых клеток рака кишечника мыши в экспериментах *in vivo*. Полученное МАТ ТШК 10 может быть использовано для получения химерных и гуманизированных антител и адресной доставки с их помощью тераностического

радиофармацевтического препарата или цитотоксических веществ к опухоли.

Финансирование: работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение №075-15-2021-1360 от 12.10.2021.

5 Антитела против рецептора стабилин-1 (stabilin-1) человека

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра (НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ)

10 Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Centre «Kurchatov Institute») (NRC «Kurchatov Institute») - PNPI)

Перечень последовательностей антитела против рецептора стабилин-1 (stabilin-1) человека

Последовательность ДНК, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи мышинового моноклонального антитела к стабилину-1 - ТШК 10

15 SEQ ID NO: 1

ДНК

Mus musculus

(1)...(360)

20	CAG	GTG	CAG	CTG	AAG	GAG	TCA	GGA	CCT	GGC	CTG	GTG
	Gln	Val	Gln	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val
	GCG	CCC	TCA	CAG	AGC	CTG	TCC	ATC	ACA	TGC	ACT	GTC
	Ala	Pro	Ser	Gln	Ser	Leu	Ser	Ile	Thr	Cys	Thr	Val
25	TCA	GGG	TTC	TCA	TTA	ACT	AGC	GAT	GGT	GTA	AGC	TGG
	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Thr	Ser	Asp	Gly	Val	Ser	Trp
	TTT	CGC	CAG	CCT	CCA	GGA	AAG	GGT	CTG	GAG	TGG	CTG
	Phe	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu
30	GGA	GTA	ATA	TGG	GGT	GAC	GGG	AGC	ACA	AAT	TAT	CAT
	Gly	Val	Ile	Trp	Gly	Asp	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	His
	TCA	GCT	CTC	ATA	TCC	AGA	CTG	AGC	ATC	AGC	AAG	GAT
	Ser	Ala	Leu	Ile	Ser	Arg	Leu	Ser	Ile	Ser	Lys	Asp
35	AAC	TCC	AAG	AGC	CAA	GTT	TTC	TTA	AAA	CTG	AAC	AGT
	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Leu	Lys	Leu	Asn	Ser
	CTG	CAA	ACT	GAT	GAC	ACA	GCC	ACG	TAC	TAC	TGT	GCC
	Leu	Gln	Thr	Asp	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala
40	AAA	CCT	TAT	TAC	TAC	GGT	AGT	AGG	TGG	TAC	TTC	GAT
	Lys	Pro	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Arg	Trp	Tyr	Phe	Asp
	GTC	TGG	GGC	GCA	GGG	ACC	ACG	GTC	ACC	GTC	TCC	TCA
	Val	Trp	Gly	Ala	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser

45 Последовательность ДНК, кодирующая вариабельную область легкой цепи мышинового моноклонального антитела к стабилину-1 - ТШК 10

SEQ ID NO: 2

ДНК

Mus musculus

(1)...(321)

	GAT	ATC	CAG	ATG	ACA	CAG	ACT	ACA	TCC	TCC	CTG	TCT
	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Thr	Thr	Ser	Ser	Leu	Ser
10	GCC	TCT	CTG	GGA	GAC	AGA	GTC	ACC	ATC	AGT	TGC	AGG
	Ala	Ser	Leu	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg
	GCA	AGT	CAG	GAC	ATT	AGC	AAT	TAT	TTA	AAC	TGG	TTT
	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Ser	Asn	Tyr	Leu	Asn	Trp	Phe
15	CAG	CAG	AAA	CCA	GAT	GGA	ACT	GTT	AAA	CTC	CTG	ATC
	Gln	Gln	Lys	Pro	Asp	Gly	Thr	Val	Lys	Leu	Leu	Ile
	TAC	TAC	ACA	TCA	AGA	TTA	CAC	TCA	GGA	GTC	CCA	GCA
	Tyr	Tyr	Thr	Ser	Arg	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ala
20	AGG	TTC	AGT	GGC	AGT	GGG	TCT	GGA	ACA	GAT	TAC	TCT
	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Ser
	CTC	ACC	ATT	AGC	AAC	CTG	GAG	CAA	GAA	GAT	ATT	GCC
	Leu	Thr	Ile	Ser	Asn	Leu	Glu	Gln	Glu	Asp	Ile	Ala
25	ACT	TAC	TTT	TGC	CAA	CAG	GGT	AAA	ACG	CTT	CCG	CTC
	Thr	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Gly	Lys	Thr	Leu	Pro	Leu
	ACG	TTC	GGA	GCT	GGG	ACC	AAG	CTG	GGG	CTG	AAA	
	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Gly	Leu	Lys	

30 Последовательность аминокислот участка CDR-1 варибельной области тяжелой цепи мышиноного моноклонального антитела к стабилину-1 - ТШК 10

SEQ ID NO: 3

Белок

Mus musculus

(1)...(8)

Gly Phe Ser Leu Thr Ser Asp Gly

40 Последовательность аминокислот участка CDR-2 варибельной области тяжелой цепи мышиноного моноклонального антитела к стабилину-1 -ТШК 10

45

SEQ ID NO: 4

Белок

5 Mus musculus

(1)...(7)

Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr

10 Последовательность аминокислот участка CDR-3 вариабельной области тяжелой цепи мышиноного моноклонального антитела к стабилину-1 -ТШК 10

SEQ ID NO: 5

Белок

15 Mus musculus

(1)...(14)

Ala Lys Pro Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Trp Tyr Phe Asp Val

20 Последовательность аминокислот участка CDR-1 вариабельной области легкой цепи мышиноного моноклонального антитела к стабилину-1 - ТШК 10.

SEQ ID NO: 6

Белок

25 Mus musculus

(1)...(6)

Gln Asp Ile Ser Asn Tyr

30 Последовательность аминокислот участка CDR-2 вариабельной области легкой цепи мышиноного моноклонального антитела к стабилину-1 - ТШК 10

SEQ ID NO: 7

Белок

35 Mus musculus

(1)...(3)

40 Tyr Thr Ser

Последовательность аминокислот участка CDR-3 вариабельной области легкой цепи мышиноного моноклонального антитела к стабилину-1 - ТШК 10

45

SEQ ID NO: 8

Белок

Mus musculus

(1)...(9)

Gln Gln Gly Lys Thr Leu Pro Leu Thr

10 Перечень последовательностей  
 <?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>  
 <!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing  
 1.3//EN" "ST26SequenceListing\_V1\_3.dtd">  
 <ST26SequenceListing originalFreeTextLanguageCode="ru"  
 15 dtdVersion="V1\_3" fileName="ТШК10.xml" softwareName="WIPO Sequence"  
 softwareVersion="2.3.0" productionDate="2024-04-19">  
 <ApplicationIdentification>  
 <IPOfficeCode>RU</IPOfficeCode>  
 <ApplicationNumberText>2023135667/20 (077963)</ApplicationNumberText>  
 20 <FilingDate>2023-12-28</FilingDate>  
 </ApplicationIdentification>  
 <ApplicantNamelanguageCode="ru">Федеральное государственное  
 бюджетное учреждение «Петербургский институт ядерной физики им. Б. П.  
 Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский  
 25 институт»</ApplicantName>  
 <ApplicantNameLatin>Petersburg Nuclear Physics Institute named by  
 B.P. Konstantinov of National Research Centre &quot;Kurchatov  
 Institute&quot;; (NRC &quot;KurchatovInstitute&quot;; -  
 PNPI)</ApplicantNameLatin>  
 30 <InventionTitlelanguageCode="ru">Антителапротиврецептора  
 стабилин-1 (stabilin-1) человека</InventionTitle>  
 <SequenceTotalQuantity>8</SequenceTotalQuantity>  
 <SequenceDatasequenceIDNumber="1">  
 <INSDSeq>  
 35 <INSDSeq\_length>360</INSDSeq\_length>  
 <INSDSeq\_moltype>DNA</INSDSeq\_moltype>  
 <INSDSeq\_division>PAT</INSDSeq\_division>  
 <INSDSeq\_feature-table>  
 <INSDFeature>  
 40 <INSDFeature\_key>source</INSDFeature\_key>  
 <INSDFeature\_location>1..360</INSDFeature\_location>  
 <INSDFeature\_qual>  
 <INSDQualifier>  
 <INSDQualifier\_name>mol\_type</INSDQualifier\_name>  
 45 <INSDQualifier\_value>other DNA</INSDQualifier\_value>  
 </INSDQualifier>  
 <INSDQualifier id="q2">  
 <INSDQualifier\_name>organism</INSDQualifier\_name>

```

<INSDQualifier_value>Musmusculus</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
5 </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>caggtgcagctgaaggagtcaggacctggcctggtggcgccctcacaga
gcctgtccatcacatgcactgtctcagggttctcattaactagcgatggtgtaagctggtttcgccagcc
tccaggaaaggtctggagtggtgggagtaatatggggtgacgggagcacaattatcattcagctctc
atatccagactgagcatcagcaaggataactccaagagccaagttttcttaaaactgaacagtctgcaa
10 ctgatgacacagccacgtactactgtgccaaaccttattactacggtagtaggtggtacttcgatgtctg
ggcgcgagggaccacggtcaccgtctcctca</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceDatasequenceIDNumber="2">
15 <INSDSeq>
<INSDSeq_length>321</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
20 <INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..321</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
25 <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q4">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
30 <INSDQualifier_value>Musmusculus</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
35 <INSDSeq_sequence>gatatccagatgacacagactacatcctccctgtctgcctctctgggag
acagagtcaccatcagttgcagggcaagtcaggacattagcaattatttaaactggtttcagcagaaacc
agatggaactgttaaactcctgatctactacacatcaagattactcaggagtcaggcaaggttcagt
ggcagtgggtctggaacagattactctctcaccattagcaacctggagcaagaagatattgccacttact
40 tttgccaacagggtaaaacgcttccgctcacgttcggagctgggaccaagctggggctgaaa</INSDSe
q_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceDatasequenceIDNumber="3">
<INSDSeq>
45 <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>

```

```

<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
5 <INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q6">
10 <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Musmusculus</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
15 </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>GFSLTSDG</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceDatasequenceIDNumber="4">
20 <INSDSeq>
<INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
25 <INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
30 <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q8">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
35 <INSDQualifier_value>Musmusculus</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
40 <INSDSeq_sequence>IWGDGST</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceDatasequenceIDNumber="5">
<INSDSeq>
45 <INSDSeq_length>14</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>

```

```

<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..14</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
5 <INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q10">
10 <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Musmusculus</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
15 </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>AKPYYYGSRWYFDV</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceDatasequenceIDNumber="6">
20 <INSDSeq>
<INSDSeq_length>6</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
25 <INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..6</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
30 <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q12">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
35 <INSDQualifier_value>Musmusculus</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
40 <INSDSeq_sequence>QDISNY</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceDatasequenceIDNumber="7">
<INSDSeq>
45 <INSDSeq_length/>
<INSDSeq_moltype/>
<INSDSeq_division/>
<INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>

```

```

</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceDatasequenceIDNumber="8">
<INSDSeq>
5 <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
10 <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
15 <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q16">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Musmusculus</INSDQualifier_value>
20 </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QQGKTLPLT</INSDSeq_sequence>
25 </INSDSeq>
</SequenceData>
</ST26SequenceListing>

```

### (57) Формула изобретения

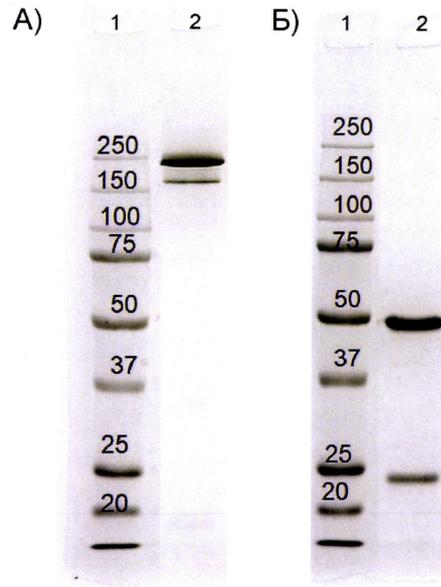
30 Моноклональное антитело, способное специфически связываться со стабиллин-1 человека, содержащее переменный домен тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 1, переменный домен легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 2, гиперпеременные участки тяжелой цепи с последовательностями SEQ ID NO: 3-5 и гиперпеременные участки легкой цепи с последовательностями SEQ ID NO: 6-8.

35

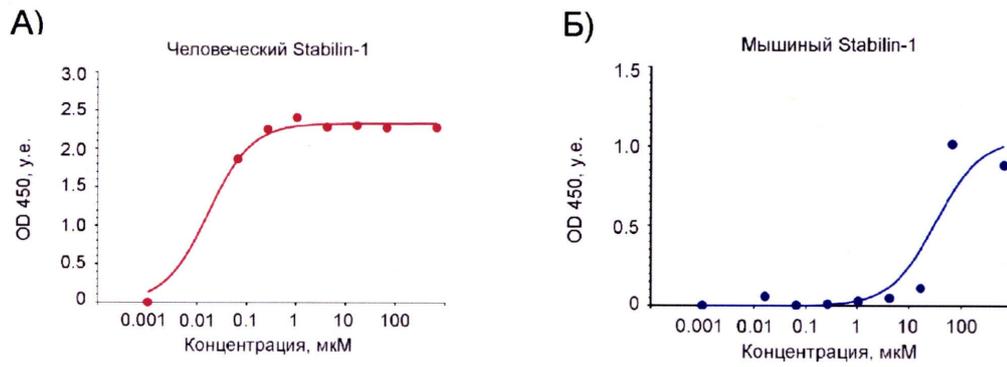
40

45

1

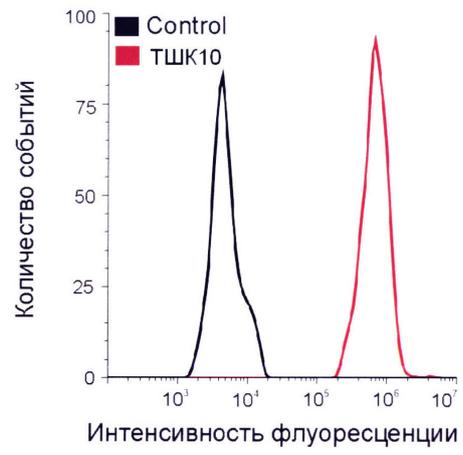


Фиг. 1

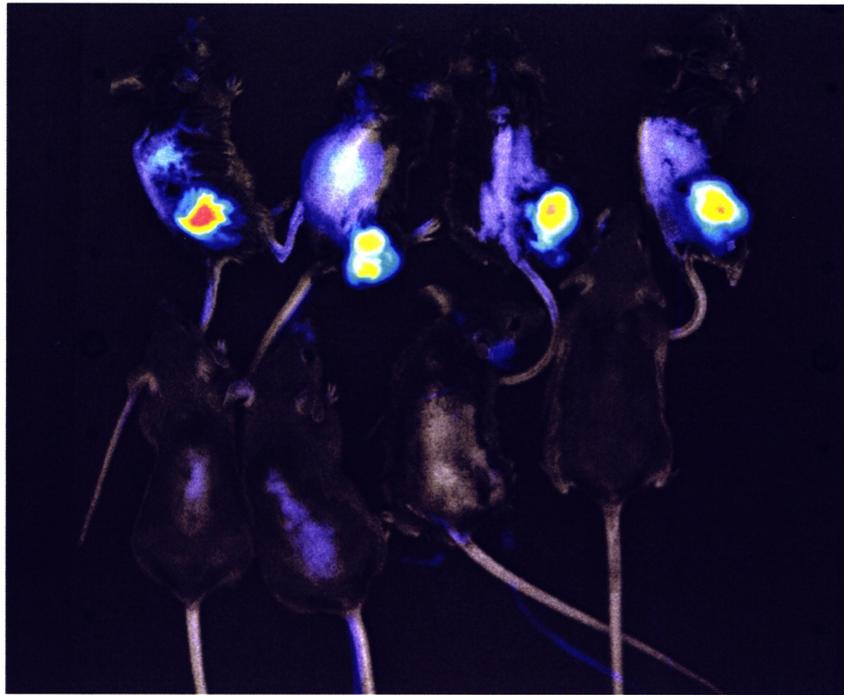


Фиг. 2

2



Фиг. 3



Фиг. 4