

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038980**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.11.17

(21) Номер заявки
201890739

(22) Дата подачи заявки
2016.09.13

(51) Int. Cl. **A61K 39/395** (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)

(54) АНТИ-S100A8 ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЛЕЙКЕМИИ

(31) **62/218,000; 62/259,738**

(32) **2015.09.14; 2015.11.25**

(33) **US**

(43) **2018.09.28**

(86) **PCT/CA2016/051078**

(87) **WO 2017/045070 2017.03.23**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЮНИВЕРСИТЕ ЛАВАЛЬ (CA)

(72) Изобретатель:
**Тессье Филипп, Лаёдж, Малика,
Бараб Фредерик, Паж Натали (CA)**

(74) Представитель:
Агуреев А.П., Фелицына С.Б. (RU)

(56) **WO-A1-2006005186**

BARABE et al., "Myeloid-related protein S100A9 induces cellular differentiation in acute myeloid leukemia through TLR2 and TLR4 receptors". Blood, 3 December 2015 (03-12-2015), vol. 126, no. 23, pp. 3858, ISSN 0006-4971

SPIJKERS-HAGELSTEIN, JAP et al., "Elevated S100A8/S100A9 expression causes glucocorticoid resistance in MLL-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia". Leukemia, June 2012 (06-2012), vol. 26, no. 6, pp. 1255-1265, ISSN 0887-6924

YANG, L. et al., "S100A8-targeting siRNA enhances arsenic trioxide-induced myeloid leukemia cell death by down-regulating autophagy". Int. J. Mol. Med., January 2012 (01-2012), vol. 29, no. 1, pp. 65-72, ISSN 1107-3756

YANG, M. et al., "S100A8 contributes to drug resistance by promoting autophagy in leukemia cells". PLoS ONE, 12 May 2014 (12-05-2014), vol. 9, no. 5, pp. e97242, ISSN 1932-6203

(57) Описание изобретения касается белка анти-S1008 для лечения лейкемии. В частности, представлено антитело против S1008 для лечения лейкемии, которое специфически связывается с участком белка S100A8 и/или с гетеродимером S100A8/S100A9.

B1

038980

038980

B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее описание относится к белку анти-S1008 для лечения лейкемии.

Предшествующий уровень техники

Острая лейкемия является результатом ряда генетических и эпигенетических событий, происходящих в стволовых или гемопоэтических клетках-предшественниках и вызывающих клональную экспансию клеток-предшественников с ослабленной способностью к дифференцировке. Последние 20 лет были очень плодотворными в выявлении часто повторяющихся генетических повреждений при острой лейкемии. Улучшение выживаемости при лейкемии в основном обусловлено лучшей стратификацией по риску, что позволяет регулировать интенсивность терапии, а также аллогенной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток. Однако препараты, которые применяются при лечении острой миелоидной лейкемии (AML), в основном остались такими же, как 25-30 лет назад, и прогноз остается плохим. Выживаемость на 5 лет составляет всего 55% у детей с AML и еще меньше у взрослых (30-40%) и пожилых (>65 лет) людей (<15%). Поэтому для улучшения выживаемости без лейкемии у больных острой лейкемией необходимо опробовать новые и инновационные подходы.

Таким образом, все еще существует потребность в получении композиций или методик для лечения лейкемии.

Сущность изобретения

Итак, в соответствии с настоящим изобретением предусмотрены анти-S100A8 для лечения лейкемии.

В одном воплощении анти-S100A8 представляет собой антитело.

В другом воплощении анти-S100A8 специфически связывается с участком белка S100A8.

В следующем воплощении анти-S100A8 специфически связывается с гомодимером S100A8/S100A8 или гетеродимером S100A8/S100A9.

В дополнительном воплощении белок S100A8 представлен S100A8 человека.

В другом воплощении S100A8 человека включает аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1.

В следующем воплощении анти-S100A8 представляет собой моноклональное или поликлональное антитело.

В одном воплощении анти-S100A8 представляет собой мышинное антитело, козье антитело, человеческое антитело или кроличье антитело.

В другом воплощении анти-S100A8 представляет собой гуманизованное антитело.

В одном воплощении антитело против S100A8 содержит эпитопсвязывающий фрагмент, выбранный из группы, состоящей из Fv, F(ab') и F(ab')₂.

В другом воплощении антитело против S100A8 содержит переменную область тяжелой цепи, которая кодируется нуклеотидной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 3.

В дополнительном воплощении антитело против S100A8 содержит переменную область тяжелой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 4.

В другом воплощении антитело против S100A8 содержит переменную область легкой цепи, которая кодируется нуклеотидной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 5.

В другом воплощении антитело против S100A8 содержит переменную область легкой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 6.

В другом воплощении анти-S100A8 входит в состав для инъекций.

В другом воплощении анти-S100A8 входит в состав для введения с химиотерапевтическим средством.

В одном воплощении химиотерапевтическое средство представлено по меньшей мере одним из даунорубицина, доксорубицина и цитарабина.

В другом воплощении анти-S100A8 входит в состав для одновременного или отдельного введения с химиотерапевтическим средством.

В следующем воплощении анти-S100A8 входит в состав для введения субъекту после химиотерапевтического лечения.

Также здесь предусмотрены композиции, содержащие описанные здесь анти-S100A8 и носитель.

В одном воплощении описанная здесь композиция предназначена для лечения лейкемии.

В одном воплощении лейкемия представлена острой лимфобластной лейкемией (ALL), острой миелоидной лейкемией (AML), хронической лимфоцитарной лейкемией (CLL), хронической миелоидной лейкемией (CML) или хронической миеломоноцитарной лейкемией (CMML).

В одном воплощении описанная здесь композиция предназначена для стимулирования дифференцировки клеток.

В одном воплощении описанная здесь композиция предназначена для подавления пролиферации клеток.

В одном воплощении описанная здесь композиция предназначена для лечения острой миелоидной лейкемии (AML).

Также предусмотрен способ лечения лейкемии у субъекта, включающий стадию введения субъекту

анти-S100A8 или описанной здесь композиции.

Также предусмотрен способ стимулирования дифференцировки клеток у субъекта, включающий стадию введения субъекту анти-S100A8 или описанной здесь композиции.

Также предусмотрен способ подавления пролиферации клеток у субъекта, включающий стадию введения субъекту анти-S100A8 или описанной здесь композиции.

Также предусмотрен способ стимулирования дифференцировки клеток *ex vivo*, включающий стадию введения анти-S100A8 или описанной здесь композиции.

Также предусмотрен способ подавления пролиферации клеток *ex vivo*, включающий стадию введения анти-S100A8 или описанной здесь композиции.

Кроме того, предусмотрено применение анти-S100A8 или описанной здесь композиции для лечения лейкемии у субъекта.

Также предусмотрено применение анти-S100A8 или описанной здесь композиции при изготовлении лекарственного средства для лечения лейкемии у субъекта.

Также предусмотрено применение анти-S100A8 или описанной здесь композиции для стимулирования дифференцировки клеток.

Также предусмотрено применение анти-S100A8 или описанной здесь композиции для подавления пролиферации клеток.

В одном воплощении субъектом является млекопитающее.

В другом воплощении субъектом является мышь или человек.

В одном воплощении описанная здесь композиция дополнительно содержит пептид S100A9 или его пептидомиметик.

В другом воплощении представленное здесь анти-S100A8 входит в состав для введения с пептидом S100A9.

В другом воплощении пептид S100A9 представлен белком S100A9 человека.

В следующем воплощении данный пептид включает аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7.

В дополнительном воплощении данный пептид по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70% или по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичен SEQ ID NO: 7.

В другом воплощении данный пептид состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 7.

Краткое описание фигур

Теперь обратимся к прилагаемым чертежам.

На фиг. 1 представлена секреция S100A8/A9 в сыворотке мышей с первичной лейкемией, причем первичную лейкемию вызывали введением гемопоэтических стволовых клеток/клеток-предшественников мыши, трансфицированных ретровирусом, экспрессирующим GFP, а также гены HOXA9 и MEIS1 либо слитый ген MLL-ENL, и измеряли концентрации S100A8/A9 в сыворотке методом ELISA (данные представляют собой среднее $\pm$ SEM из трех независимых измерений).

На фиг. 2 представлен уровень секреции S100A8, S100A9 и S100A8/A9 в сыворотке мышей с первичной лейкемией, причем первичную лейкемию вызывали введением гемопоэтических стволовых клеток/клеток-предшественников мыши, трансфицированных ретровирусом, экспрессирующим GFP и гены HOXA9 и MEIS1, а затем индуцировали вторичную лейкемию введением 100 000 клеток костного мозга от лейкемической мыши контрольным мышам и измеряли концентрации S100A8/A9 в сыворотке методом ELISA (данные представляют собой среднее $\pm$ SEM из трех независимых измерений).

На фиг. 3 представлена корреляция между секрецией S100A8/A9 и присутствием лейкемических клеток в периферической крови, причем первичную лейкемию вызывали введением гемопоэтических стволовых клеток/клеток-предшественников мыши, трансфицированных ретровирусом, экспрессирующим GFP и гены HOXA9 и MEIS1, а затем индуцировали вторичную лейкемию введением 100 000 клеток костного мозга от лейкемической мыши наивным мышам и определяли содержание лейкемических клеток в крови методом проточной цитометрии, а также измеряли концентрации S100A8/A9 в сыворотке методом ELISA (данные представляют собой среднее $\pm$ SEM из трех независимых измерений).

На фиг. 4 показано, что антитело против S100A8 по одному из воплощений продлевает выживаемость мышей со вторичной лейкемией, вызванной введением лейкемических клеток HOXA9-MEIS1, при этом вторичным мышам после сублетального облучения вводили по 100000 клеток костного мозга от мыши с первичной лейкемией HOXA9-MEIS1 три раза в неделю с 3-го по 35-й день вместе с кроличьими pAbs против S100A8 или неспецифическими IgGs кролика (150 мкг/инъекция), крысиным mAb против S100A9 или контрольным изотипным Ab (IgG1 крыс) либо PBS (контроль) (по 6 мышей на 1 группу).

На фиг. 5 показано, что антитело против S100A8 по одному из воплощений уменьшает потерю веса у мышей со вторичной лейкемией, вызванной введением лейкемических клеток HOXA9-MEIS1, при этом вторичным мышам после сублетального облучения вводили по 100 000 клеток костного мозга от мыши с первичной лейкемией HOXA9-MEIS1 три раза в неделю с 3-го по 35-й день вместе с кроличьими

pAbs против S100A8 или неспецифическими IgGs кролика (150 мкг/инъекция) (по 6 мышей на группу).

На фиг. 6 показано, что антитело против S100A8 по одному из воплощений замедляет появление лейкемических клеток в периферической крови, при этом вторичным мышам после сублетального облучения вводили по 100000 клеток костного мозга от мыши с первичной лейкемией HOXA9-MEIS1 три раза в неделю с 3-го по 35-й день вместе с кроличьими pAbs против S100A8 или неспецифическими IgGs кролика (150 мкг/инъекция) (по 6 мышей на группу) и определяли содержание лейкемических клеток методом проточной цитометрии.

На фиг. 7 показано, что антитело против S100A8 по одному из воплощений усиливает дифференцировку бластных клеток AML, при этом вторичным мышам после сублетального облучения вводили по 100000 клеток костного мозга от мыши с первичной лейкемией HOXA9-MEIS1 три раза в неделю с 3-го по 35-й день вместе с кроличьими pAbs против S100A8 или неспецифическими IgGs кролика (150 мкг/инъекция) (по 6 мышей на группу), а умирающих мышей забивали, собирали периферическую кровь, селезенку и костный мозг и анализировали клетки методом проточной цитометрии на экспрессию маркеров дифференцировки (CD11b и Gr1) (данные от одной мыши, которые репрезентативны для 3 других).

На фиг. 8 показано, что антитело против S100A8 по одному из воплощений подавляет пролиферацию бластных клеток AML, при этом вторичным мышам после сублетального облучения вводили по 100000 клеток костного мозга от мыши с первичной лейкемией HOXA9-MEIS1 три раза в неделю с 3-го по 35-й день вместе с кроличьими pAbs против S100A8 или неспецифическими IgGs кролика (150 мкг/инъекция) (по 6 мышей на группу), а умирающих мышей забивали, собирали костный мозг и анализировали клеточный цикл по окрашиванию йодидом пропидия (данные представляют собой средние из трех экспериментов).

На фиг. 9 представлено усиление дифференцировки клеток AML у обработанных анти-S100A8 мышей, при этом вторичным мышам после сублетального облучения вводили по 100000 клеток костного мозга от мыши с первичной лейкемией HOXA9-MEIS1 три раза в неделю с 3-го по 35-й день вместе с кроличьими pAbs против S100A8 или неспецифическими IgGs кролика (150 мкг/инъекция) (по 6 мышей на группу), а умирающих мышей забивали, собирали периферическую кровь и костный мозг, а затем окрашивали клетки по Wright-Giemsa для выявления клеточной морфологии (данные от одной мыши, которые репрезентативны для 3 других).

На фиг. 10 показано, что антитело против S100A8 по одному из воплощений способствует дифференцировке и остановке роста лейкемических клеток человека, при этом клетки из пуповинной крови человека, экспрессирующие слитый ген MLL-AF9, стимулировали mAb 1F8 против S100A8 (20 мкг/мл) или контрольным изотопным Ab в течение 72 ч, причем в (A) представлено исследование методом проточной цитометрии клеток, помеченных антителом против CD14; а в (B) - анализ клеточного цикла по окрашиванию йодидом пропидия.

На фиг. 11 показано, что антитело против S100A8 в сочетании с пептидом S100A9 по одному из воплощений продлевает выживаемость мышей со вторичной лейкемией, вызванной введением лейкемических клеток HOXA9-MEIS1, при этом вторичным мышам после сублетального облучения вводили клетки костного мозга от мыши с первичной лейкемией HOXA9-MEIS1 вместе с антителом против S100A8, пептидом S100A9 или их комбинацией.

Раскрытие сущности изобретения

Предусмотрены анти-S100A8 для лечения или профилактики лейкемии.

Соответственно, здесь описано применение анти-S100A8 в виде антитела для лечения или профилактики лейкемии.

При этом лейкемия может быть представлена острой лимфобластной лейкемией (ALL), острой миелоидной лейкемией (AML), хронической лимфоцитарной лейкемией (CLL), хронической миелоидной лейкемией (CML) и/или хронической миеломоноцитарной лейкемией (CMML).

Семейство белков S100 включает 22 представителей из числа небольших (10-14 кДа) кислых кальций-связывающих белков, названных S100A1, S100A2 и т.д. в зависимости от времени их обнаружения и хромосомы, на которой они находятся. Эти внутриклеточные белки участвуют в контроле фосфорилирования белков, ферментативной активности, гомеостаза Ca^{2+} и полимеризации промежуточных филаментов. S100A8, S100A9 и S100A12 относятся к подгруппе, называемой миелоидными белками (MRP), так как они преимущественно экспрессируются в нейтрофилах (30% цитоплазматического белка) и моноцитах, которые происходят из миелоидных предшественников.

S100A8 и S100A9 устроены в виде нековалентно связанных гомодимеров. Кроме того, в присутствии кальция S100A8 и S100A9 образуют нековалентный гетеродимер, называемый S100A8/A9 или кальпротектин, который предположительно участвует в клеточном контроле концентраций кальция.

S100A8 и S100A9 устроены в виде нековалентно связанных гомодимеров. К тому же S100A8 и S100A9 образуют нековалентный гетеродимер под названием S100A8/A9 или кальпротектин в присутствии кальция, причем этот гетеродимер предположительно участвует в клеточном контроле концентрации кальция. Внутри клетки кальпротектин связывается с липидами и активирует NADPH-оксидазу внутри нейтрофилов, по крайней мере частично путем переноса арахидоновой кислоты на NADPH-оксидазу. Предполагается, что S100A8 и S100A9 связываются с RAGE, сквенджер-рецептором (CD36) или Toll-

подобным рецептором 4 (TLR4).

Пептидная последовательность S100A8 человека состоит из

MLTELEKALNSIIDVYHKYSLIKGNFHAVYRDDLLKKLLETCPQYIRKKGADVW

FKELDINTDG AVNFQEFLILVIKMGVAANKKSHEESHKE (SEQ ID NO: 1).

Соответственно, раскрыты гуманизованные антитела и антитела из различных видов против S100A8, в особенности S100A8 человека, белковые последовательности которых могут быть модифицированы для увеличения их сходства с вариантами антител, вырабатывающихся естественным образом у людей. Гуманизация может потребоваться тогда, когда процесс разработки определенных антител включает их получение в другой иммунной системе, отличной от человека (как-то у мышей). Методы гуманизации антител служат для получения молекул с минимальной иммуногенностью при введении людям, сохраняя при этом специфичность и сродство от исходного нечеловеческого антитела. Белковые последовательности антител, полученных таким образом, частично отличаются от гомологичных антител, встречающихся в природе у людей, поэтому они являются потенциально иммуногенными при введении больным людям.

Предусмотренные здесь гуманизованные антитела могут быть получены по технологии обогащения типа фагового дисплея или иммунизации трансгенных мышей, несущих репертуар генов антител человека, которые являются мощными средствами для получения человеческих антител.

В частности, описанное здесь антитело специфически связывается с эпитопом на S100A8.

В одном конкретном воплощении антитело содержит эпитопсвязывающий фрагмент, выбранный из числа Fv и/или F(ab')₂ и/или F(ab')₂. В частности, антитело включает эпитопсвязывающее одноцепочечное антитело.

В частности, предусмотренное здесь антитело включает вариабельную область тяжелой цепи, которая кодируется нуклеотидной последовательностью

GGATCCCAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCAGGGGCAGAGCTTGTGAAGCCAGGG

GCCTCAGTCAAGTTGTCCTGCACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAGACACCTATTTG

CACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGAGCAGGGCCTGGAGTGGGTTGGAAGGATTGATCC

TGCGAATGGTGATACAAAAGACCCGAAGTCCAGGCCAAGGCCACAAACAGCGACA

CAACCCCAACACAGCCTACGTGCACCTCAACAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCG

TCTATTTCTGTACTGGGGGATGGCAGATGGGGGGCCGGTACTTCGATGTCTGGGGCG

CAGGGACAACGGTCAACGTCCTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCCATCTGTCTATGGTG

GCGGTGGTTCT (SEQ ID NO: 3).

В одном конкретном воплощении антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, которая состоит из

GSQVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYIHWVKQRPEQGLEWVGRI

DPANGDTKYDPKFQAKATITADTTSNTAYVHLNSLTSEDYAVYFCTGGWQMGGRYFD

VWGAGTTV TVSSAKTTPPSVYGGGGS (SEQ ID NO: 4).

В частности, предусмотренное здесь антитело включает вариабельную область легкой цепи, которая кодируется нуклеотидной последовательностью

GAGTTGGAGACCCAGCCCCGCTCCAGCGACCGGGGCAGAGGGCCACCATCTCA

TACAGGGCCAGCAAAAGTGTCAGTACATCTGGCTATAGTTATATGCACTGGAACCA

ACAGAAACCAGGACAGCCACCCAGACTCCTCATCTATCTTGTATCCAACCTAGAAATC

TGGGGTCCCTGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCAACAT

CCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCACATTAGGGAGC

TTACACGTTCCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAA (SEQ ID NO: 5).

В одном конкретном воплощении антитело содержит вариабельную область легкой цепи, которая состоит из

DWMTQSPASLAVSLGQRAISYRASKSVSSGYSYMHWNQQKPGQPRLLIYLVSN

LESGVPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYCQHIRELTRSEGGPSWK (SEQ ID NO:

6).

Описанные здесь Ab против S100 могут применяться вместе с подходящим физиологическим или фармацевтическим носителем. Такие композиции включают терапевтически эффективное количество антитела и физиологически или фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент. К таким носителям относятся, без ограничения, физиологический раствор, забуференный физраствор, декстроза, вода, глицерин, этанол и их комбинации. Лекарственная форма должна соответствовать способу введения.

Приведенные здесь антитела, действующие в качестве ингибитора или антагониста белка S100A8, можно вводить сами по себе или в комбинации с другими антителами, направленными на другие ком-

плементарные мишени, включая, без ограничения, другие полинуклеотиды или полипептиды S100.

Предусмотренные здесь антитела можно выгодно использовать в комбинации с другими моноклональными или химерными антителами, с цитокинами или с белками S100. Антитела можно вводить отдельно или в сочетании с другими видами лечения.

Например, описанные здесь антитела можно вводить в комбинации одновременно или отдельно, к примеру, с таким химиотерапевтическим средством, как даунорубин (Cerubidine), доксорубин (Adriamycin) или цитарабин. Как правило, предпочтительным является введение продуктов, происходящих из того же вида или реагирующих с тем же видом (в случае антител), что у самого пациента. Так, в предпочтительном воплощении больным людям или животным для лечения или профилактики вводятся человеческие антитела, фрагменты, производные или аналоги.

Предпочтительно для лечения заболеваний, связанных с полинуклеотидами или полипептидами S100, включая их фрагменты, применяются высокоаффинные и/или сильнодействующие ингибирующие и/или нейтрализующие *in vivo* антитела против предусмотренных здесь полипептидов или полинуклеотидов S100, их фрагментов или участков. Такие антитела, фрагменты или участки предпочтительно должны обладать сродством к предусмотренным здесь полипептидам S100.

В частности, предусмотрен способ лечения лейкемии, включающий стадию введения нуждающегося в этом субъекту эффективного количества приведенного здесь антитела или приведенной здесь композиции.

Исследовательская сеть Атласа раковых геномов (TCGA) провела секвенирование полного генома/полного экзона при 200 случаях AML у взрослых вместе с анализом РНК, микроРНК и метилирования ДНК. S100A8 и S100A9 оказались в числе пяти лучших дискриминантных генов для одной важной подгруппы, состоящей в основном из миеломоноцитарной и моноцитарной AML, с высоким уровнем RPKM (Cancer Genome Atlas Research, N., 2013, The New England Journal of Medicine, 368: 2059-2074). Высокие концентрации белков S100A8 и S100A9 обнаруживаются в сыворотке пациентов с острой и хронической миелоидной лейкемией (Ivanov et al., 1996, Immunology Letters, 49:7-13), и эти концентрации коррелируют со стимулирующей рост активностью в этих сыворотках. Кроме того, S100A8 был идентифицирован как прогностический фактор плохой выживаемости у больных AML *de novo* (Nicolas et al., 2011, Leukemia: Official Journal of The Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K., 25:57-65). Конститутивная гиперэкспрессия S100A8/A9 также связана с устойчивостью к лечению преднизолом при B-ALL с трансформацией MLL, а принудительная экспрессия S100A8/A9 в клетках B-ALL, трансформированных MLL, превращает чувствительные к преднизону клетки в нечувствительные к преднизону *in vitro* (Spijkers-Hagelstein et al., 2012, Leukemia: Official Journal of The Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K., 26: 1255-1265).

Для изучения возможного участия белков S100A8 и S100A9 при AML измеряли их экспрессию на двух хорошо изученных моделях миелоидной лейкемии, вызванной гиперэкспрессией Нох9 и кофактора Meis1 либо экспрессией онкогена MLL-ENL в гемопоэтических предшественниках и стволовых клетках (HPSC), трансплантированных реципиентам после летального облучения. Как и у больных AML, наблюдалось существенное повышение концентрации S100A8/A9 в плазме первичных реципиентов - мышей, экспрессирующих Нох9 и Meis1 (H9M) и MLL-ENL (5,0 мкг/мл $\pm$ 1,0 мкг/мл и 3,8 мкг/мл $\pm$ 0,5 мкг/мл, соответственно), по сравнению с контрольными мышами (0,5 мкг/мл $\pm$ 0,08 мкг/мл) (см. фиг. 1). Уровни S100A8/A9 в плазме вторичных реципиентов H9M также повышались примерно в 10 раз. Несмотря на преобладание гетеродимерной формы, в плазме мышей с AML наблюдались и гомодимерные S100A8 и S100A9 (см. фиг. 2). У реципиентов AML проявлялось повышение концентрации S100A8/A9 в супернатантах костного мозга и селезенки, указывая на то, что внеклеточные жидкости также были обогащены этими белками. Концентрация S100A8/A9 постепенно возрастала по мере прогрессирования лейкемии и сильно коррелировала с выходом лейкоэмических клеток из костного мозга в кровь (см. фиг. 3).

Для изучения роли S100A8 и S100A9 в прогрессировании лейкемии вторичных реципиентов вызванной H9M AML обрабатывали в/б 10 мг/кг pAb против S100A8 либо mAb против S100A9. Эти антитела взаимодействуют и с гомодимерами S100A8/A8 или S100A9/A9, соответственно, и с гетеродимерами S100A8/A9. Введение антител против S100A8 приводило к явному замедлению прогрессирования лейкемии и значительному продлению выживания по сравнению с контрольными иммуноглобулинами (фиг. 4). Это было связано с уменьшением потери веса и улучшением поведения лейкоэмических мышей при обработке антителом против S100A8 (фиг. 5). У обработанных анти-S100A8 мышей также значительно снижалось содержание лейкоэмических клеток в периферической крови и концентрация S100A8/A9 (фиг. 6). Напротив, не наблюдалось никаких отличий между мышами, получавшими контрольные IgG и анти-S100A9, по уровню S100A8/A9 в плазме, содержанию лейкоэмических клеток в крови или по общей выживаемости (фиг. 4). Анализ мышей, обработанных анти-S100A8, показал повышение экспрессии маркеров зрелых миелоидных клеток CD11b и Gr1 (фиг. 7), клеток в фазах клеточного цикла G0/G1 (фиг. 8) и цитологических модификаций, характерных для гранулоцитарных клеток (фиг. 9), тогда как при обработке анти-S100A9 не наблюдалось никаких изменений, что свидетельствует об усилении дифференцировки клеток AML под действием анти-S100A8, которое индуцировало миелоид-

ную дифференцировку. Соответственно, S100A8 способствует патогенезу AML, нарушая дифференцировку миелоидных клеток.

Для проверки эффекта анти-S100A8 клетки пуповинной крови человека, трансфицированные слитым геном MLL-AF9, стимулировали анти-S100A8 в течение 72 ч. Дифференцировку клеток оценивали по экспрессии CD14 в качестве маркера дифференцировки клеток. mAb 1F8 против S100A8 вызывало удвоение количества клеток, экспрессирующих CD14 (фиг. 10A), что указывает на стимуляцию дифференцировки клеток. Кроме того, mAb 1F8 против S100A8 вызывало увеличение количества клеток в фазах G0/G1 и S (фиг. 10B), что указывает на подавление пролиферации этих клеток.

Как видно из фиг. 11, предусмотренное здесь антитело против S100A8 можно вводить вместе с пептидом S100A9 с тем, чтобы значительно увеличить замедление прогрессирования лейкемии и продлить выживаемость по сравнению с контрольными иммуноглобулинами или по сравнению с введением только антитела против S100A8 или только пептида S100A9.

S100A9, также известный как кальгранулин В и связанный с миелоидами белок-14 (MRP-14), является кальций- и цинк-связывающим белком, принадлежащим к семейству белков S100. S100A9 сильно экспрессируется в клетках миелоидных линий и встречается во внеклеточной среде при воспалительных состояниях. S100A9 образует гетеродимеры с S100A8, другим представителем семейства S100. Однако S100A9 также может образовывать мономеры, которые выполняют определенные функции. S100A9 человека имеет молекулярную массу около 13 кДа и состоит из 114 аминокислотных остатков.

S100A9 человека

10 20 30 40 50

MTCKMSQLER NIETIINTFH QYSVKLGHPD TLNQGEFKEL VRKDLQNFLK

60 70 80 90 100

KENKNEKVIE HIMEDLDTNA DKQLSFEEFI MLMARLTWAS HEKMHEGDEG

110

PGHHNKPLG EGTP (SEQ ID NO: 7)

Соответственно, предусмотрены композиции, включающие в себя антитело против S100A8 и пептид S100A9.

В частности, предусмотрены композиции, включающие антитело против S100A8, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, кодируемую нуклеотидной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 3 или 4, вариабельную область легкой цепи, кодируемую нуклеотидной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 5 или 6, и пептид S100A9, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7, для лечения лейкемии.

Соответственно, введение анти-S100A8 защищает от AML, способствуя дифференцировке лейкемических клеток, что приводит к снижению пролиферации.

Примеры

Настоящее изобретение станет более понятным при обращении к следующим примерам, которые приводятся для иллюстрации воплощений, а не для ограничения его объема.

Пример 1. Трансдукция клеток-предшественников из костного мозга и процедура трансплантации.

Клетки костного мозга, выделенные из обработанных 5-фторурацилом мышей C57BL/6 (8-12-недельные самки), культивировали 2 дня в среде DMEM с 15% фетальной телячьей сыворотки и 10 нг/мл IL-3, 10 нг/мл IL-6 и 100 нг/мл фактора стволовых клеток, что способствует вхождению в клеточный цикл. Затем клетки костного мозга культивировали совместно с облученными клетками GP+E86, трансфицированными MSCV-хоxa9-ires-meisl hpgk-EGFP (клетки, вырабатывающие вирусы), в присутствии 5 мкг/мл полибрена в течение 2 дней.

Мышей C57BL/6 - реципиентов первичной лейкемии облучали (7 Gy), а затем через 24 ч вводили в/в 4×10^5 инфицированных клеток костного мозга (экспрессирующих Ноха9, Meis1 и Egfp). Мышей каждый день обследовали на признаки лейкемии. Каждую неделю собирали периферическую кровь для определения количества лейкемических клеток (экспрессирующих GFP) методом проточной цитометрии. Умиравших мышей забивали и собирали периферическую кровь и костный мозг.

Вторичную лейкемию индуцировали введением реципиентам после сублетального облучения (4 Gy) 2×10^5 клеток костного мозга от мышей с первичной лейкемией.

Пример 2. Обработка антителом против S100A8.

Мышам-реципиентам C57BL/6 после сублетального облучения (4 Gy) вводили лейкемические клетки, выделенные из костного мозга мышей с первичной лейкемией. Через 14 дней определяли наличие клеток AML (EGFP⁺) в периферической крови методом проточной цитометрии. Начиная с 3-го дня, мышам три раза в неделю вводили в/в по 100 мкг очищенного IgG кролика против S100A8. Мышей, проявляющих признаки заболевания, забивали и собирали периферическую кровь и костный мозг для гистологии и анализа методом проточной цитометрии.

Пример 3. Стимуляция MLL-AF9.

Клетки пуповинной крови человека, трансфицированные слитым геном MLL-AF9, культивировали

в среде IMDM с добавлением 15% фетальной телячьей сыворотки, IL-6 и фактора стволовых клеток. Клетки высевали в 96-луночные микропланшеты (по 200000 клеток на лунку), а затем стимулировали с помощью 20 мкг/мл mAb 1F8 против S100A8 или PBS. Через 72 ч клетки собирали и проводили иммунофенотипирование методом проточной цитометрии после окрашивания антителом против CD14. Клеточный цикл анализировали по окрашиванию иодидом пропидия.

Пример 4. Комбинация анти-S100A8 и пептида S100A9.

Мышам-реципиентам C57BL/6 после сублетального облучения (4 Gy) вводили лейкемические клетки, выделенные из костного мозга мышей с первичной лейкемией. Через 14 дней определяли наличие клеток AML (EGFP⁺) в периферической крови методом проточной цитометрии. Начиная с 3-го дня, мышам три раза в неделю вводили в/б по 100 мкг очищенного IgG кролика против S100A8, 20 мкг белка S100A9 из рекомбинантной мыши или комбинацию анти-S100A8 и белка S100A9. Мышей, проявляющих признаки заболевания, забивали и собирали периферическую кровь и костный мозг для гистологии и анализа методом проточной цитометрии.

Хотя изобретение было описано в связи с конкретными его воплощениями, однако следует понимать, что оно поддается дальнейшим модификациям, а настоящая заявка должна охватывать любые изменения, применения или последующие адаптации, включая такие отклонения от настоящего описания, которые входят в известную или обычную практику в той области, к которой относится изобретение, и которые могут быть применены к существенным признакам, изложенным выше, а также как указано в рамках прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело против кальций-связывающего белка S100A8 (S100A8), где данное антитело против S100A8 содержит вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4, и где данное антитело против S100A8 содержит вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6.

2. Антитело против S100A8 по п.1, где вариабельная область тяжелой цепи кодируется нуклеотидной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 3, а вариабельная область легкой цепи кодируется нуклеотидной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 5.

3. Антитело против S100A8 по п.1, где данное антитело против S100A8 специфически связывается с гомодимером S100A8/S100A8 или гетеродимером S100A8/S100A9.

4. Антитело против S100A8 по любому из пп.1-3, где антитело против S100A8 представляет собой моноклональное антитело.

5. Антитело против S100A8 по любому из пп.1-4 для лечения лейкемии путем ингибирования белка S100A8.

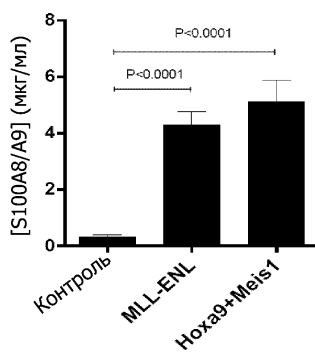
6. Композиция для лечения лейкемии, включающая антитело против S100A8 по любому из пп.1-5 и носитель.

7. Композиция по п.6, где лейкемия представлена острой лимфобластной лейкемией (ALL), острой миелоидной лейкемией (AML), хронической лимфоцитарной лейкемией (CLL), хронической миелоидной лейкемией (CML) или хронической миеломоноцитарной лейкемией (CMML).

8. Композиция по п.7 для лечения острой миелоидной лейкемии (AML) путем стимулирования дифференцировки клетки или подавления роста лейкемических клеток.

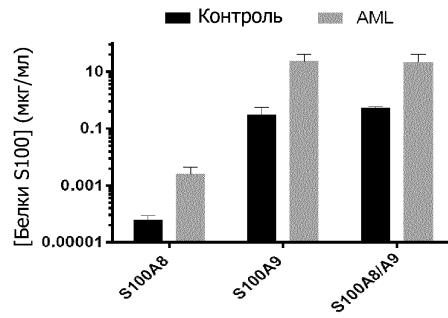
9. Композиция по любому из пп.6-8, дополнительно включающая пептид S100A9.

10. Композиция по п.9, где пептид S100A9 представлен белком S100A9 человека.

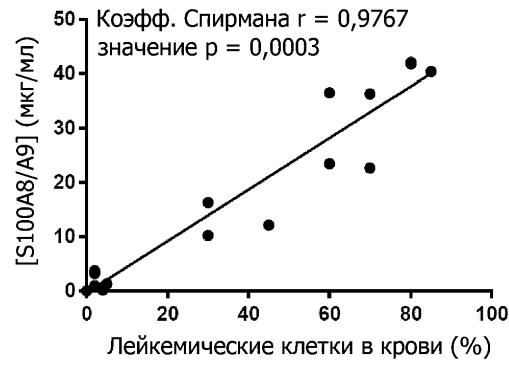


Фиг. 1

038980



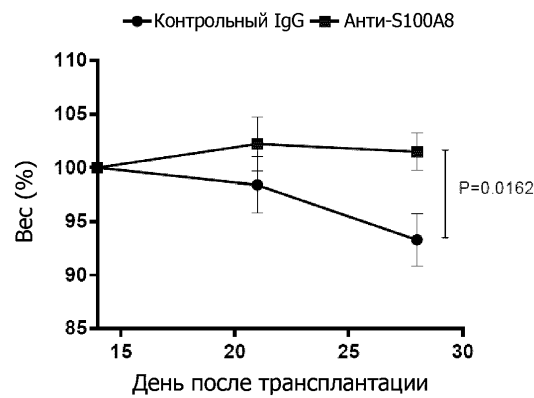
Фиг. 2



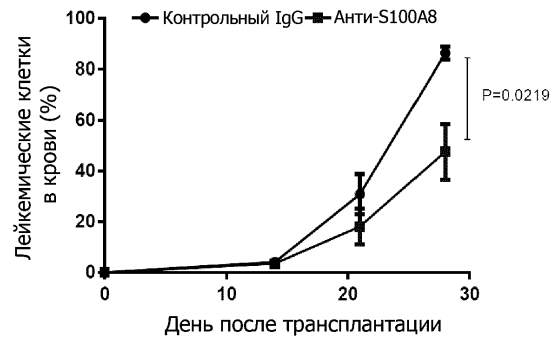
Фиг. 3



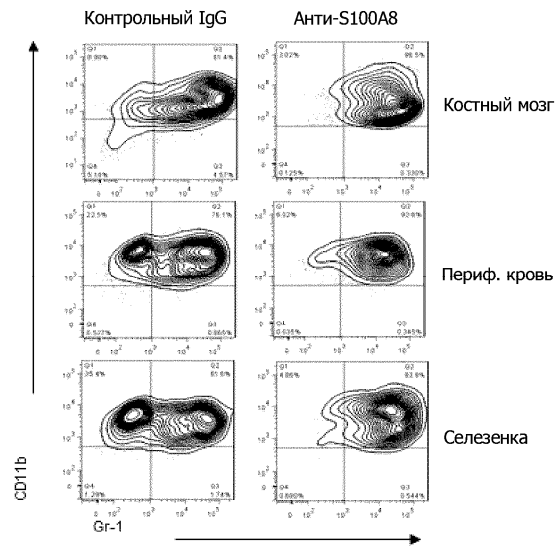
Фиг. 4



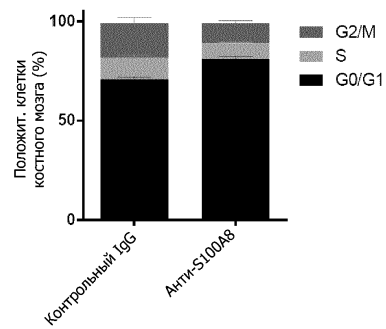
Фиг. 5



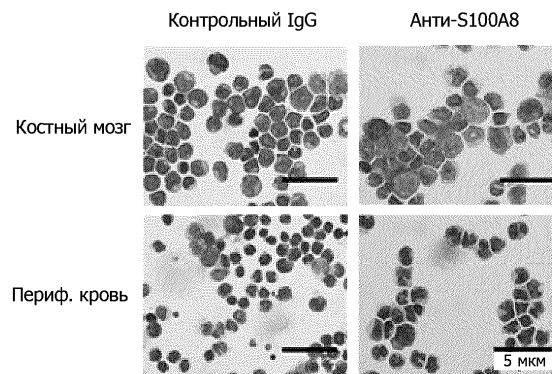
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9

