

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092276** (13) **A2**

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

(43) Дата публикации заявки
2021.01.29

(51) Int. Cl. *C07K 16/24* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2011.04.05

(54) **АНТИТЕЛО, РАСПОЗНАЮЩЕЕ ЛЕЙКЕМИЧЕСКИЙ ИНГИБИТОРНЫЙ ФАКТОР (LIF) ЧЕЛОВЕКА, И ПРИМЕНЕНИЕ АНТИТЕЛ ПРОТИВ LIF ПРИ ЛЕЧЕНИИ ЗАБОЛЕВАНИЙ, СВЯЗАННЫХ С НЕЖЕЛАТЕЛЬНОЙ ПРОЛИФЕРАЦИЕЙ КЛЕТОК**

(31) 10380049.6

(32) 2010.04.05

(33) EP

(62) 201201373; 2011.04.05

(71) Заявитель:

**ФУНДАСИО ПРИВАДА
ИНСТИТУТ Д'ИНВЕСТИГАСИО
ОНКОЛОХИКА ВАЛЬ Д'ЭБРОН
(ВХИО); ФУНДАСИО ПРИВАДА
ИНСТИТУСИО КАТАЛАНА ДЕ
РЕСЕРКА И ЭСТУДИС АВАНКАТС
(ИКРЕА) (ES)**

(72) Изобретатель:

**Суарес Хоан Сеане, Фольгьера Худит
Анидо, Бордериас Андреа Саэс (ES)**

(74) Представитель:

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

(57) Изобретение касается антител, направленных против лейкемического ингибиторного фактора (LIF) человека, и клеточной линии гибридомы, вырабатывающей такие антитела. Изобретение также касается способа блокирования/ингибирования пролиферации стволовых клеток и способа диагностики *in vitro* заболеваний, связанных с нежелательной пролиферацией клеток у субъекта, или же определения предрасположенности субъекта к таким заболеваниям, связанным с нежелательной пролиферацией клеток, или же прогнозирования *in vitro* средней вероятной продолжительности жизни у субъектов, страдающих такими заболеваниями. Терапевтический потенциал данных антител основывается на том, что ингибирование LIF может использоваться в лечебных композициях для лечения заболеваний, связанных с нежелательной пролиферацией.

A2

202092276

202092276

A2

АНТИТЕЛО, РАСПОЗНАЮЩЕЕ ЛЕЙКЕМИЧЕСКИЙ ИНГИБИТОРНЫЙ ФАКТОР (LIF) ЧЕЛОВЕКА, И ПРИМЕНЕНИЕ АНТИТЕЛ ПРОТИВ LIF ПРИ ЛЕЧЕНИИ ЗАБОЛЕВАНИЙ, СВЯЗАННЫХ С НЕЖЕЛАТЕЛЬНОЙ ПРОЛИФЕРАЦИЕЙ КЛЕТОК

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение в основном касается гибридной линии клеток (гибридомы лимфоцитов) для получения моноклональных антител, распознающих лейкемический ингибиторный фактор (LIF) человека, однородной популяции таких антител и применения таких антител для прогнозирования, диагностики и лечения заболеваний, связанных с изменением уровня или активности LIF, как-то заболеваний, связанных с нежелательной пролиферацией клеток, более конкретно рака и еще более конкретно глиомы.

Уровень техники

Лейкемический ингибиторный фактор (LIF) человека – это цитокин типа интерлейкина 6 (IL-6), участвующий в ряде биологических активностей и оказывающий влияние на различные типы клеток. LIF человека представляет собой полипептид из 202 аминокислот.

LIF является важной сигнальной молекулой, в частности, он играет роль при заболеваниях, связанных с нежелательной пролиферацией клеток, как-то различных типах рака. Способность к самовоспроизведению некоторых опухолевых клеток может быть увеличена индукцией LIF или Sox2 (Ikushima et al., *Cell Stem Cell*, 5:504-514, 2009; Penuelas et al., *Cancer Cell*, 15:315-327, 2009). LIF также связывали и с другими биологическими активностями, как-то ингибированием имплантации бластоцист (Sengupta et al., 2006, *Contraception*, 74, 419-425) и дифференцировкой эпидермальных меланоцитов (Hirobe, 2002, *J. Cell. Phys.*, 192:315-326).

В опухолях иницирующие рак клетки (CICs) представляют собой клеточную субпопуляцию, которая обладает характеристиками нормальных стволовых клеток, проявляет устойчивое самовоспроизведение и может давать вторичные опухоли, воспроизводящие характеристики и клеточное разнообразие исходной опухоли. Считается, что клетки CIC ответственны за инициацию, распространение, рецидивы опухолей и их устойчивость к химио- и радиотерапии (Bao et al., *Nature*, 444:7756-760, 2006; Dick, *Blood*, 112:4793-4807, 2008; Gupta et al., *Nat. Methods*, 15:1010-1012, 2009; Visvader and Lindeman, *Nat. Rev. Cancer*, 8:755-768, 2008; Zhou et al., *Nat. Rev. Drug*

Discov. 8:806-823, 2009). Все эти характеристики указывают на то, что клетки CIC представляют собой критические терапевтические мишени и что понимание биологии CICs имеет решающее значение для улучшения противораковой терапии. Ряд маркеров клеточной поверхности, включая CD133 и CD44, оказались полезными для выделения подмножества клеток, обогащенного CICs (Visvader and Lindeman, Nat. Rev. Cancer, 8:755-768, 2008) в различных типах опухолей.

Глиома является наиболее распространенной опухолью мозга. Наиболее агрессивная форма глиомы, глиома IV стадии, также именуется глиобластомой (GBM), которая является одним из самых смертоносных типов рака с медианой выживаемости около 14 месяцев (Stupp et al., N. Engl. J. Med., 352:987-996, 2005). Несмотря на прогресс в понимании молекулярных механизмов, участвующих в генезе и развитии глиомы, прогноз и лечение этого типа опухоли остаются неэффективными. Клетки, инициирующие глиому (GICs), характеризуются высоким онкогенным потенциалом, способностью к самовоспроизведению и способностью к дифференцировке во множественные клеточные линии. Количество клеток, подобных стволовым, в опухоли регулируется их способностью к самовоспроизведению. Клетки GIC и вообще раковые стволовые клетки испытывают симметричное и асимметричное деление, посредством которых стволовая клетка производит две идентичных копии самой себя или же копию стволовой клетки и более дифференцированную клетку (асимметричное деление). Способность к самовоспроизведению раковых стволовых клеток регулируется балансом между симметричным и асимметричным делением, а нарушение механизмов регуляции, контролирующих такое самовоспроизведение, скорее всего, участвует в возникновении опухоли.

Считается, что клетки GICs ответственны за возникновение, распространение и рецидивы опухолей, что означает то, что наиболее эффективная терапия произойдет из терапии, направленной на компартментализацию стволовых клеток глиомы. Опухоль не будет устранена, если не будут ликвидированы клетки GICs.

Сигнальный путь TGF β (трансформирующего фактора роста β) участвует в регуляции многих клеточных активностей, таких как пролиферация и дифференцировка клеток, через регуляцию гена-мишени. Семейство цитокинов TGF β включает сами TGF β (напр., TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3), активины и белки морфогенеза костей. Представители семейства TGF β действуют через активацию рецепторов сериновых/треониновых киназ на поверхности клетки, которая запускает

внутриклеточные сигнальные пути с участием нижеследующего эффектора SMAD, который после активации переносится прямо в ядро и активирует транскрипцию. Показано, что TGF β может усиливать способность GICs к самовоспроизведению посредством индукции LIF или Sox2 (Ikushima et al., *Cell Stem Cell*, 5:504-514, 2009; Penuelas et al., *Cancer Cell*, 15:315-327, 2009). Важная роль TGF β в раковом сигнальном пути (Massague, *Cell*, 134:215-230, 2008) вызвала клиническую разработку противораковых стратегий, основанных на разработке ингибиторных соединений против TGF β (Seoane et al., *Clin. Transl. Oncol.*, 10:14-19, 2008; Yingling et al., *Nat. Rev. Drug Discov.*, 3:1011-1022, 2004). При глиоме повышение активности TGF β означает плохой прогноз для больных (Bruna et al., *Cancer Cell*, 11:147-160, 2007) и проявляет разнообразный онкогенный ответ, который включает индукцию ангиогенеза, иммуносупрессию, инвазию и пролиферацию клеток (Bruna et al., *Cancer Cell*, 11:147-160, 2007; Rich, *Front. Biosci.* e245-260, 2003). Представители семейства TGF β регулируют экспрессию ингибиторов ДНК-связывающего белка 1 (Id1). Ингибиторы ДНК-связывающего белков (Ids) являются факторами транскрипции, которые регулируют клеточный цикл и дифференцировку клеток и играют важную роль в контроле самовоспроизведения стволовых клеток (Perk et al., *Nat. Rev. Cancer*, 5:603-614, 2005; Ying et al., *Cell*, 115:281-292, 2003). В нормальных эпителиальных клетках TGF β репрессирует, а BMP индуцирует транскрипцию Id1 (Massague, *Cell*, 134:215-230, 2008). Однако в эндотелиальных клетках и в некоторых раковых клетках TGF β способен индуцировать экспрессию Id1 (Goumans et al., *EMBO J.*, 1743-1753, 2002; Padua et al., *Cell*, 133:66-77, 2008). Id1 экспрессируется и во взрослых нейрональных стволовых клетках типа B1, играющих важную роль в регуляции способности к самовоспроизведению этих клеток (Nam and Benezra, *Cell Stem Cell*, 5:515-526, 2009). Оказалось, что при раке Id1 возрастает в некоторых опухолях (Perk et al., *Cancer Res.*, 2006:10870-10877, 2006), причем отмечено, что он участвует в метастазировании (Gupta et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104:19506-19511, 2007).

Предпочтительным способом лечения глиомы является хирургическое вмешательство. Тем не менее, хирургическое лечение обычно сопровождается вспомогательной фармакологической терапией или лучевой терапией. Предпочтительным препаратом для лечения глиомы является комбинация, называемая PCV, которая включает прокарбазин, CCNU (ломустин) и винкристин, темозоломид в комбинации с лучевой терапией.

Таким образом, необходимо иметь альтернативные способы лечения, лишённые известных недостатков существующих процедур, которые смогут эффективно устранять клетки GICs.

Несколько антител, специфичных к LIF, описаны в US 5,654,157A, US 5,654,157, Kim et al. (J. Immunol. Meth., 156: 9-17, 1992), Alphonso et al. (J. Leukocyte Biology (Abstracts of the 28th National Meeting of the Society for Leukocyte Biology, vol. 0, no. SP.2 (1991) (NY, N.E., p. 49) (Mabs D4.16.9, D25.1.4 и D62.3.2), Sengupta et al. (Contraception 74:419-425, 2010). Однако антигенные участки в белке LIF, с которыми связываются эти антитела, не были подробно охарактеризованы. Кроме того, применение этих антител для лечения рака, в частности глиомы и более конкретно глиобластомы, не было раскрыто. Как должно быть известно специалистам из других примеров в данной области, связывание антител с определённым участком или эпитопом антигена может иметь решающее значение для успеха лечения. Например, известны различные антитела против HER2, из которых только одно — трастузумаб — оказалось особенно полезным для лечения рака молочной железы.

Сущность изобретения

В первом аспекте изобретение касается моноклонального антитела, направленного против лейкемического ингибиторного фактора (LIF) человека.

В другом аспекте изобретение касается линии клеток гибридомы, вырабатывающей однородную популяцию антител, направленных против лейкемического ингибиторного фактора (LIF) человека, которые в дальнейшем именуется антителом против LIF. В предпочтительном воплощении изобретение касается линии клеток гибридомы с номером доступа DSM ACC3054, которая депонирована 1 апреля 2010 г. в Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.

В следующем аспекте изобретение касается способов иммуноанализа, включающих данное антитело.

В следующем аспекте изобретение касается терапевтически эффективного количества антитела против LIF для лечения заболеваний, связанных с нежелательной пролиферацией клеток.

В предпочтительном аспекте изобретение касается терапевтически эффективного количества моноклонального антитела против LIF по настоящему изобретению для лечения заболеваний, связанных с нежелательной пролиферацией

клеток.

В следующем аспекте изобретение касается фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество такого антитела по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель для лечения заболеваний, связанных с нежелательной пролиферацией клеток.

В следующем аспекте изобретение касается способа диагностики *in vitro* заболеваний, связанных с нежелательной пролиферацией клеток у субъекта, или определения предрасположенности субъекта к такому заболеванию, связанному с нежелательной пролиферацией клеток, или определения стадии или тяжести такого заболевания у субъекта, связанного с нежелательной пролиферацией клеток, или мониторинга эффекта терапии, применяемой к субъекту с таким заболеванием, связанным с нежелательной пролиферацией клеток, который включает количественное определение уровня LIF или его функционально эквивалентного варианта или же любой комбинации этих молекул в биологическом образце от данного субъекта. В другом аспекте изобретение касается применения набора, содержащего реагенты для количественного определения уровня экспрессии LIF или его функционально эквивалентного варианта или любой комбинации этих молекул, для диагностики рака у субъекта или определения предрасположенности субъекта к такому раковому заболеванию или определения стадии или тяжести такого ракового заболевания у субъекта или прогнозирования вероятности выживания или средней ожидаемой продолжительности жизни у субъекта, страдающего таким раком, или же мониторинга эффекта терапии, применяемой к субъекту с таким раком, при этом, если реагенты выявляют повышение экспрессии LIF или его функционально эквивалентного варианта или любой комбинации этих молекул относительно контрольного образца, то данный субъект может страдать заболеванием, связанным с нежелательной пролиферацией клеток, или проявлять большую предрасположенность к такому заболеванию, связанному с нежелательной пролиферацией клеток, или проявлять большую тяжесть данного заболевания, или же применяемая терапия не эффективна.

В следующем аспекте изобретение касается способа прогнозирования *in vitro* средней продолжительности жизни у пациентов, страдающих заболеваниями, связанными с нежелательной пролиферацией клеток, который включает количественное определение уровня LIF или его функционально эквивалентного варианта или любой комбинации этих молекул в биологическом образце от данного

субъекта.

Краткое описание фигур

Фиг. 1. Антитело против LIF связывается с С-концевым доменом белка LIF человека, состоящим из аминокислот 160-202.

(А) Схема, на которой представлена вторичная структура гена LIF и последовательные делеции, произведенные в слитом белке LIF-EGFP. (В) Клетки 293Т трансфецировали указанными конструкциями. Через 48 часов клетки лизировали и подвергали иммунопреципитации (ИП) с 1 мкг антитела против LIF в течение ночи при 4°C. Затем к лизатам добавляли белок A/G и извлекали иммунопреципитаты. Фрагменты LIF детектировали на иммуноблотах (WB) с помощью антитела против EGFP. (С) Схема, на которой представлен домен связывания антитела против LIF.

Фиг. 2. Антитело против LIF блокирует индукцию фосфо-Stat3 под действием LIF в клеточной линии глиомы U373 и базальные уровни фосфо-Stat3 в нейросферах GBM, полученных от пациентов.

(А) Клетки U373 обрабатывали с рекомбинантным LIF человека или без него в течение 15 минут в присутствии или в отсутствие указанного моноклонального антитела и определяли уровни фосфо-Stat3 и тубулина методом вестерн-блота. В качестве контроля использовали подобранный по изотипу IgG. (В) Нейросферы GBM подвергали диссоциации и либо оставляли необработанными, либо инкубировали в течение ночи в присутствии моноклонального антитела против LIF или контрольного изотипа IgG и определяли уровни фосфо-Stat3 и тубулина методом вестерн-блота.

Фиг. 3. Полученные от пациентов нейросферы GBM содержат клеточный компартмент CD44^{high}/Id1^{high}

Представлен анализ уровня CD44 в нейросферах GBM методом FACS (фиг. 3А). Видно окрашивание контрольного изотипа. Нейросферы GBM подвергали сортировке методом FACS в соответствии с уровнем CD44, а уровни транскриптов CD44, ID1, ID2 и ID3 определяли методом qRT-ПЦР и вестерн-блота (фиг. 3В и 3С).

Фиг. 4. Популяция CD44^{high}/Id1^{high} в нейросферах GBM обогащена клетками, иницирующими глиому

(А) Представлен анализ уровня CD44 в нейросферах GBM1, культивированных в присутствии или в отсутствие 10% FBS в течение 10 дней. (В) Клетки GBM1 подвергали сортировке методом FACS и высевали на анализ формирования

нейросфер. Через 7 дней определяли количество нейросфер. (C, D и E) Клетки нейросфер подвергали сортировке по уровню CD44 и указанное количество клеток инокулировали в головной мозг мышей с ослабленным иммунитетом. (C) Через сорок дней после операции делали снимки методом MRI целого мозга мышей, инокулированных 10^5 клеток (стрелками отмечены опухоли). (D) Представлена встречаемость опухолей. (E) Представлена иммуногистохимия указанных белков и окрашивание опухолей методом H&E.

Фиг. 5. Антитело против LIF снижает уровень популяции CD44^{high}/Id1^{high} в нейросферах GBM

Нейросферы GBM подвергали диссоциации и культивировали в присутствии моноклонального антитела против LIF или контрольного изотипа IgG в течение 7 дней в присутствии (A) или в отсутствие (B) EGF и FGF. Клетки окрашивали с помощью моноклонального антитела против CD44-FITC в присутствии пропидия йодида для исключения мертвых клеток и определяли долю клеток с высоким содержанием CD44 методом FACS.

Фиг. 6. Антитело против LIF снижает уровни CD44 и Id1 в полученных от пациентов нейросферах GBM

Нейросферы GBM подвергали диссоциации и культивировали в присутствии моноклонального антитела против LIF или контрольного изотипа IgG в течение 7 дней в отсутствие EGF и FGF и анализировали уровни мРНК указанных генов методом qRT-ПЦР. В качестве внутреннего контроля для нормализации использовали GAPDH.

Фиг. 7. Обработка антителом против LIF *in vivo* уменьшает клеточный компармент CD44^{high}/Id1^{high}

(A) Схема, на которой представлена экспериментальная процедура. (B) Нейросферы GBM инокулировали в мозг мышей с ослабленным иммунитетом. Через 30 дней после прививки образовалась опухоль, а когда опухоль становилась оформленной, мышей обрабатывали PBS или 500 мкг моноклонального антитела против LIF через каждые 3 дня в течение 10 дней. Мозг мышей подвергали диссоциации и отделяли раковые клетки человека путем сортировки MHC-I-положительных клеток. Определяли уровни экспрессии мРНК ID1 и CD44 методом qRT-ПЦР. В качестве внутреннего контроля для нормализации использовали GAPDH.

Фиг. 8. Уровень мРНК LIF у больных глиомой связан со средней продолжительностью жизни. Кривые Kaplan-Meier показывают, что общая

выживаемость у больных глиомой с повышенным в ≥ 2 раза уровнем мРНК LIF значительно меньше, чем у остальных пациентов ($p = 7,2E-8$) по критерию log-rank. Данные получены по программе Банка молекулярных данных по неоплазии мозга (REMBRANDT) из Национального института рака.

Фиг. 9. Уровень мРНК LIF у больных глиобластомой (GBM) связан со средней продолжительностью жизни. Кривые Kaplan-Meier показывают, что общая выживаемость у больных GBM с повышенным в ≥ 9 раз уровнем мРНК LIF значительно меньше, чем у остальных пациентов ($p = 6,9E-4$) по критерию log-rank. Данные получены по программе Банка молекулярных данных по неоплазии мозга (REMBRANDT) из Национального института рака.

Раскрытие сущности изобретения

Антитела по настоящему изобретению

Авторы настоящего изобретения создали новое моноклональное антитело, направленное против лейкемического ингибиторного фактора (LIF) человека.

Поэтому в первом аспекте изобретение касается антитела, направленного против LIF человека, которое является моноклональным. Термин “моноклональное антитело” в настоящем изобретении относится к практически однородной популяции антител, в которой индивидуальные молекулы антител, составляющих популяцию, практически идентичны по средству и специфичности, за исключением возможных естественных мутаций, которые могут присутствовать в незначительном количестве.

Моноклональное антитело представляет собой однородную популяцию антител, специфичных к одному эпитопу антигена. В настоящем изобретении термин “моноклональное антитело” следует понимать в широком смысле, потому что он охватывает мультиспецифичные антитела и их фрагменты ($F(ab')_2$, Fab и др.), при условии, что они способны специфически распознавать LIF. Фрагменты моноклонального антитела по настоящему изобретению, в качестве неограничивающего примера, могут быть вставлены в рекомбинантные антитела, химерные антитела, гуманизированные антитела, антитела человека и др.

Химерное антитело – это моноклональное антитело, сконструированное путем клонирования или рекомбинации антител из различных видов животных. В типичной, но не ограничивающей конфигурации изобретения, химерное антитело включает часть моноклонального антитела по изобретению, обычно переменный фрагмент (Fv), в том

числе сайты для распознавания и связывания антигена, а другая часть соответствует антителу человека, обычно той его части, которая включает константную область и примыкающие к ней участки.

Гуманизированное антитело – это моноклональное антитело, сконструированное путем клонирования и пересадки гипервариабельных определяющих комплементарность участков (CDR) мышиного моноклонального антитела по изобретению в антитело человека вместо гипервариабельных участков CDR данного антитела человека.

“Человеческое антитело” в настоящем изобретении может означать полностью моноклональное антитело человека. Таким антителом человека является антитело, которое может быть получено из генно-инженерных мышей, так называемых трансгенных мышей, которые были подвергнуты модификации для производства антител человека. Методика получения антител человека из мышей описана, к примеру, в Lonberg and Huszar (*Int. Rev. Immunol.*, 1995; 13(1):65-93), на основе технологии, впервые описанной McCafferty et al. (1990, *Nature* 348 (6301): 552-554).

Кроме того, в контексте настоящего изобретения термин “антитело” также охватывает варианты с измененным профилем гликозилирования, а также гликозилированные или не гликозилированные фрагменты антител, полученные из белка или по рекомбинантной технологии, которые могут состоять из: (i) вариабельных участков антител, связанных друг с другом через связывающий пептид (scFv), (ii) вариабельной области вместе с константным участком CH1 тяжелой цепи (Fd), связанной с легкой цепью посредством цистеинов или связывающих пептидов и дисульфидной связи (scFab), (iii) новых вариантов, как-то одиночных тяжелых цепей, или (iv) любых модификаций, произведенных с фрагментами антител с целью сделать их более сходными, менее иммуногенными (гуманизированными) или более стабильными в биологических жидкостях, и которые в контексте настоящего изобретения способны воспрепятствовать выполнению LIF своей функции (активности), т.е. индуцированию активации сигнального пути JAK-STAT.

Специалистам в данной области должно быть понятно, что варианты антител по настоящему изобретению можно получить стандартными методами генной инженерии или рекомбинантными методами, методами получения антител, методами выделения и очистки от биологических жидкостей или тканей или любыми другими стандартными методами получения белков и антител, широко известными специалистам в данной

области. Иллюстративные неограничивающие примеры методов: методами генной инженерии их можно перестроить и экспрессировать в векторах, предназначенных для получения рекомбинантных антител различного размера, состава и структуры. Обзоры по основным методам получения и очистки антител приведены, к примеру, в:

- “Handbook of Therapeutic Antibodies”, by S. Dübel. Wiley-VCH, 2007, vol: I to III (ISBN 978-3527314539);
- “Antibodies: Volume 1: Production and Purification”, G. Subramanian, ed. Springer, 1st edition, 2004 (ISBN 978-0306482458);
- “Antibodies: Volume 2: Novel Technologies and Therapeutic Use”, G. Subramanian, ed. Springer, 1st edition, 2004 (ISBN 978-0306483158);
- “Molecular Cloning: a Laboratory manual”, J. Sambrook and D.W. Russel, eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3rd edition, 2001 (ISBN 978-0879695774).

В предпочтительном воплощении изобретение касается антитела, распознающего полноразмерный LIF человека, но не распознающего фрагмент LIF, соответствующий аминокислотам 1-72, более предпочтительно не распознающего фрагмент LIF, соответствующий аминокислотам 1-127, и еще более предпочтительно не распознающего фрагмент LIF, соответствующий аминокислотам 1-160.

По настоящему изобретению для распознавания LIF или его фрагмента данным моноклональным антителом (фиг. 1) необходим участок, состоящий из аминокислот 160-202 LIF человека. Поэтому в предпочтительном воплощении изобретение касается антитела, распознающего эпитоп на участке, состоящем из аминокислот 160-202 LIF человека.

В еще более предпочтительном воплощении данное антитело распознает эпитоп, содержащийся на одном из следующих участков: участке, соответствующем аминокислотам 160-180, участке, соответствующем аминокислотам 170-190, участке, соответствующем аминокислотам 180-200, участке, соответствующем аминокислотам 182-202 LIF человека.

Авторы настоящего изобретения создали линию клеток гибридомы, которая вырабатывает антитело, распознающее LIF человека. Данное антитело относится к изотипу IgG1. Это антитело распознает фрагмент LIF, не содержащийся на отрезке из аминокислот 1-160. Поэтому в другом воплощении изобретение касается линии клеток гибридомы, вырабатывающей данное антитело. Линия клеток гибридомы с номером доступа DSM ACC3054, вырабатывающая такое антитело, была депонирована 1 апреля

2010 г. Институтом онкологии Vall d'Hebron в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. Таким образом, линия клеток гибридомы с номером доступа DSM ACC3054 входит в настоящее изобретение. Эта линия клеток гибридомы также описана в European Patent Application 10 380 049.6.

Специалистам должно быть понятно, что антитела, которые связываются с перекрывающимися или частично перекрывающимися эпитопами антигена, конкурируют друг с другом за связывание с антигеном. Специалистам также должно быть понятно, что две практически идентичные молекулы антител, как-то две молекулы моноклональных антител, вырабатываемых одной и той же линией клеток гибридомы, будут конкурентно ингибировать связывание друг друга с эпитопом антигена. Поэтому, к примеру, связывание одной молекулы антител, вырабатываемых линией клеток гибридомы DSM ACC3054 настоящего изобретения, конкурентно ингибирует связывание любой другой индивидуальной молекулы антител, вырабатываемых той же самой линией клеток, с LIF человека. Она также будет конкурентно ингибировать связывание любой другой молекулы антител из другого источника, чем DSM ACC3054, если только эта другая молекула антител вообще способна связываться с тем же самым или перекрывающимся эпитопом. Авторы настоящего изобретения охарактеризовали участок LIF, содержащий эпитоп. Следовательно, любое антитело, связывание которого с LIF человека конкурентно ингибируется антителом, определенным выше, также является антителом по изобретению. В частности, любое антитело, связывание которого с LIF человека конкурентно ингибируется антителом, вырабатываемым линией клеток гибридомы с номером доступа DSM ACC3054, депонированной 1 апреля 2010 г. Институтом онкологии Vall d'Hebron в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, также считается антителом по настоящему изобретению.

В другом воплощении изобретение касается применения данного антитела в методе иммуноанализа типа вестерн-блота, иммуногистохимии или ELISA.

Способы лечения по изобретению

В изобретение установлены молекулярные механизмы, лежащие в основе эффекта антител против LIF, предпочтительно антител против LIF настоящего изобретения, на больных людей, страдающих заболеваниями, связанными с нежелательной пролиферацией клеток.

В контексте настоящего изобретения “заболевание, связанное с нежелательной

пролиферацией клеток” включает рост, прогрессирующее и метастазирование рака и опухолей. Примеры заболеваний, связанных с нежелательной пролиферацией клеток, которые можно лечить способами, описанными в настоящем изобретении, включают рак, ретенноз, артериосклероз, ангиогенные заболевания, фиброз, такие дерматологические заболевания, как псориаз, и воспалительные заболевания.

В предпочтительном воплощении изобретения заболеванием, связанным с нежелательной пролиферацией клеток, является рак. Это воплощение является предпочтительным.

Термины “рак” и “опухоль” относятся к физиологическому состоянию у млекопитающих, характеризующемуся нерегулируемым ростом клеток. Рак – это целый класс заболеваний, при которых группа клеток проявляет неконтролируемый рост или нежелательный рост. Неконтролируемый рост может привести к тому, что эти клетки смогут проникать, вторгаться в соседние ткани или даже разрушать их. Раковые клетки также могут распространяться в другие места, что может приводить к образованию метастазов. Распространение раковых клеток в организме может происходить, к примеру, через лимфу или кровь. Неконтролируемый рост, вторжение и образование метастазов также именуются злокачественностью раковых заболеваний. Злокачественность отличает рак от доброкачественных опухолей, которые обычно не инвазивны и не метастазируют. Соединения настоящего изобретения, без ограничения, применимы для лечения раковых заболеваний из числа опухолей молочной железы, сердца, легких, тонкой кишки, толстой кишки, селезенки, почек, мочевого пузыря, головы, шеи, яичников, предстательной железы, головного мозга, поджелудочной железы, кожи, костей, костного мозга, крови, вилочковой железы, матки, яичек и печени. В частности, к опухолям, которые можно лечить соединениями настоящего изобретения, относятся аденома, аденокарцинома, ангиосаркома, астроцитомы, эпителиальная карцинома, герминома, глиобластома, глиома, гемангиоэндотелиома, гемангиосаркома, гематома, гепатобластома, лейкемия, лимфома, медуллобластома, меланома, нейробластома, остеосаркома, ретинобластома, рабдомиосаркома, саркома и тератома. В частности, опухоль/рак выбираются из группы акролентиккулярной меланомы, старческого кератоза, аденокарциномы, аденоидной кистозной карциномы, аденомы, аденосаркомы, плоскоклеточной аденокарциномы, астроцитарных опухолей, карциномы бартолиновой железы, базальноклеточной карциномы, бронхиальной карциномы, капиллярного карциноида, карциномы, карциносаркомы,

холангиокарциномы, хондросаркомы, цистаденомы, опухоли эндодермального синуса, гиперплазии эндометрия, стромальной саркомы эндометрия, эндометриоидной аденокарциномы, эпендимальной саркомы, саркомы Юинга, очаговой гиперплазии лимфатических узлов, гастрономы, герминомы, глиобластомы, глюкоганомы, гемангиобластомы, гемангиоэндотелиомы, гемангиомы, гепатоаденомы, аденоматоза печени, печеночно-клеточной карциномы, инсулинита, интраэпителиальной неоплазии, интраэпителиальной плоскоклеточной неоплазии, инвазивной плоскоклеточной карциномы, крупноклеточной карциномы, липосаркомы, карциномы легких, лимфобластной лейкемии, лимфоцитарной лейкемии, лейомисаркомы, меланомы, злокачественной меланомы, злокачественной мезотелиальной опухоли, опухоли нервных оболочек, медуллобластомы, медуллоэпителиомы, мезотелиомы, мукоэпидермоидной карциномы, миелоидного лейкоза, нейробластомы, нейроэпителиальной аденокарциномы, узелковой меланомы, остеосаркомы, карциномы яичников, папиллярной серозной аденокарциномы, опухолей гипофиза, плазмоцитомы, псевдосаркомы, рака простаты, легочной бластомы, почечно-клеточной карциномы, ретинобластомы, рабдомиосаркомы, саркомы, серозной карциномы, плоскоклеточной карциномы, мелкоклеточной карциномы, карциномы мягких тканей, соматостатин-секретирующих опухолей, плоскоклеточного рака, плоскоклеточной карциномы, недифференцированной карциномы, увеальной меланомы, бородавчатого рака, рака влагалища/вульвы, VIPомы, опухоли Вилма. Еще более предпочтительно опухоль/рак, который можно лечить соединениями изобретения, представляет собой рак головного мозга, рак головы и шеи, колоректальный рак, острую миелоидную лейкемию, пре-В-клеточную острую лимфобластную лейкемию, рак мочевого пузыря, астроцитому, предпочтительно астроцитому II, III или IV стадии, глиобластому, предпочтительно мультиформную глиобластому, мелкоклеточный рак и немелкоклеточный рак, предпочтительно немелкоклеточный рак легких, аденокарциному легких, метастатическую меланому, андроген-независимый метастатический рак простаты, андроген-зависимый метастатический рак простаты, аденокарциному простаты и рак молочной железы, предпочтительно рак протоков молочной железы или карциному молочной железы.

В предпочтительном воплощении рак представляет собой одно из следующего: глиома, пре-В-клеточная острая лимфобластная лейкемия, острая миелоидная лейкемия, колоректальная карцинома, аденокарцинома легких, аденокарцинома

простаты, рак мочевого пузыря, рак протоков молочной железы или карцинома молочной железы. Еще более предпочтительно глиома представляет собой глиому IV стадии.

TGF β может индуцировать способность к самовоспроизведению раковых стволовых клеток через Smad-зависимую индукцию LIF. В свою очередь LIF участвует в активации пути JAK-STAT, тем самым индуцируя процесс пролиферации клеток и возрастание раковых стволовых клеток (Penuelas et al., Cancer Cell, 15:315-327, 2009). Активация таких представителей семейства STAT, как Stat 3, обычно происходит посредством фосфорилирования.

Как изложено в начале описания, авторы изобретения открыли новое терапевтическое окно в лечении заболеваний, связанных с нежелательной пролиферацией клеток, как-то рака, особенно для лечения рака, связанного с высоким уровнем LIF или его функционально эквивалентных вариантов, по настоящему изобретению. Не придерживаясь какой-либо теории, полагаем, что эффект LIF и его ингибиторов на пролиферацию опухолей заключается в способности LIF вызывать пролиферацию раковых стволовых клеток. Авторы показали, что обработка антителами против LIF, предпочтительно антителами против LIF по настоящему изобретению, снижает LIF-зависимое фосфорилирование Stat3 в культуре клеток (фиг. 2). Ингибиторные антитела против LIF способны ингибировать пролиферацию раковых стволовых клеток, так что их применение особенно полезно для лечения заболеваний, при которых будет полезно ингибирование пролиферации стволовых клеток. Как описано выше, антитела настоящего изобретения обладают свойством распознавания фрагмента LIF, не входящего в участок, содержащий аминокислоты 1-160 LIF человека, что означает, в свою очередь, что эти антитела связываются в C-концевом отрезке LIF. Авторы настоящего изобретения показали, вне ожидания, что антитела с таким свойством особенно полезны для лечения указанных заболеваний, в том числе рака (фиг. 2, фиг. 6).

Таким образом, в следующем аспекте изобретение касается ингибиторных антител для лечения заболеваний, связанных с нежелательной пролиферацией клеток, таких, к примеру, как рак, и особенно для лечений рака, связанного с высокой активностью LIF.

Термин “ингибиторное антитело” понимается в контексте настоящего изобретения как антитело, которое способно связываться с LIF и тем самым

препятствует выполнению LIF своих функций. Его синонимом является “нейтрализующее антитело”.

При раке молочной железы была описана связь между TGF β и клеточной популяцией, характеризующейся высоким уровнем маркера клеточной поверхности CD44 (популяцией CD44^{high}). Было показано, что TGF β увеличивает популяцию клеток CD44^{high}, обогащенную CICs, через индукцию превращения эпителий-мезенхима (EMT) (Gupta et al., Cell, 138, 645-659, 2009; Mani et al., Cell, 133:504-715, 2008). Однако при глиоме компартмент CD44^{high} не был хорошо изучен. В настоящем изобретении Id1 и CD44 идентифицированы как новые маркеры раковых стволовых клеток при глиоме, более конкретно при глиобластоме (фиг. 3). В частности, авторы показали, что клетки, инициирующие глиому, обогащены популяцией клеток CD44^{high}/CD44^{high} (GICs, фиг. 4).

В одном неограничивающем и просто наглядном примере мишенью для антител против LIF, предпочтительно антител против LIF по настоящему изобретению, является клеточная популяция, характеризующаяся экспрессией CD44 и Id1, которая обогащена клетками, инициирующими глиому (GICs). В частности, антитела против LIF, предпочтительно антитела против LIF по настоящему изобретению, воздействуют на GICs CD44^{high}/Id1^{high} через репрессию Id1 и Id3 (фиг. 5). Кроме того, эти антитела способны истощить популяцию CD44^{high}/Id1^{high} клеток GIC. Таким образом, авторы настоящего изобретения обнаружили, что антитела против LIF, предпочтительно антитела против LIF по настоящему изобретению, функционируют в качестве ингибиторов пути, который регулируется членами семейства трансформирующих факторов роста бета (TGF β). Поэтому в предпочтительном воплощении настоящее изобретение касается антител или их фрагментов либо фармацевтической композиции по изобретению, причем данные антитела или их фрагменты либо фармацевтическая композиция способны уменьшить популяцию клеток, характеризующихся высоким уровнем CD 44 и Id1. Наглядный пример этого представлен на фиг. 5. Нейросферы GBM являются предпочтительным примером популяции клеток, характеризующихся высоким уровнем CD 44 и Id1. Например, в клеточных линиях, полученных от больных глиобластомой, антитела против LIF, предпочтительно антитела против LIF по настоящему изобретению, снижают уровень экспрессии Id1 и CD44 (фиг. 6).

Кроме того, авторы показали, что обработка *in vivo* антителами против LIF, предпочтительно антителами против LIF по настоящему изобретению, уменьшает

клеточный компартмент CD44^{high}/Id1^{high} (фиг. 7). Таким образом, введение антител против LIF, предпочтительно антител против LIF по настоящему изобретению, может предотвратить возникновение опухолей и, как предполагается, предотвратить рецидивы рака.

В предпочтительном воплощении изобретения рак или клетки, образующие опухоли, возникающие при раке, характеризуются наличием высокого уровня LIF. В контексте настоящего изобретения под “высоким уровнем” LIF понимается то, что концентрация LIF превышает те, которые наблюдаются в контрольном образце, по меньшей мере на 5%, на 10%, на 15%, на 20%, на 25%, на 30%, на 35%, на 40%, на 45%, на 50%, на 55%, на 60%, на 65%, на 70%, на 75%, на 80%, на 85%, на 90%, на 95%, на 100%, на 110%, на 120%, на 130%, на 140%, на 150% или больше.

Контрольный образец понимается как образец с таким уровнем LIF, который используется в качестве стандарта при определении относительного уровня LIF в исследуемом образце. Контрольные образцы обычно получают от пациентов, которые хорошо документированы с клинической точки зрения и у которых не наблюдается заболевания. В данных образцах концентрация биомаркера может быть установлена, к примеру, путем определения средней концентрации в контрольной популяции. При определении контрольной концентрации для определенного маркера необходимо учитывать некоторые характеристики этого типа образца, как-то возраст, пол, физическое состояние пациентов и т.п. Например, контрольный образец может быть получен из одинаковых количеств от группы из по меньшей мере 2, по меньшей мере 10, по меньшей мере 100 или более чем 1000 индивидов с тем, чтобы популяция была статистически значимой.

Концентрацию LIF можно определять внутриклеточно, в интерстициальном пространстве или в экстрактах, в которых присутствует и внутриклеточный белок, и белок, находящийся в интерстициальном пространстве. Уровень LIF можно определять путем измерения количества белка иммунологическими методами.

В более предпочтительном воплощении иммунологический способ определения уровня LIF включает антитело против LIF, а в еще более предпочтительном воплощении он включает антитело по настоящему изобретению.

В следующем аспекте изобретение касается фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество ингибиторного агента по настоящему изобретению вместе с фармацевтически приемлемым носителем для

лечения заболеваний, связанных с нежелательной пролиферацией клеток. Примеры заболеваний, связанных с нежелательной пролиферацией клеток, были приведены выше в описании.

В контексте настоящего изобретения “терапевтически эффективное количество” понимается как такое количество агента, ингибирующего экспрессию и/или активность LIF, которое необходимо для достижения требуемого эффекта, которым, в данном конкретном случае, является лечение заболеваний, связанных с нежелательной пролиферацией клеток. В общем, терапевтически эффективное количество вводимого антитела по настоящему изобретению будет зависеть, среди других факторов, от индивида, подлежащего лечению, от тяжести заболевания, которым страдает данный индивид, от выбранной дозовой формы и др. По этой причине дозы, приведенные в настоящем изобретении, следует рассматривать только в качестве ориентира для специалистов в этой области, которые должны подбирать дозы в соответствии с указанными параметрами. Тем не менее, антитело по настоящему изобретению можно вводить один или несколько раз в день, к примеру, 1, 2, 3 или 4 раза в день.

В контексте настоящего описания термин “лечение” или “лечить” означает введение антитела по изобретению для профилактики, ослабления или устранения заболевания либо одного или нескольких симптомов, связанных с данным заболеванием, связанным с нежелательной пролиферацией клеток. “Лечение” также включает профилактику, ослабление или устранение физиологических осложнений заболевания. В контексте настоящего изобретения термин “ослабление” следует понимать как любое улучшение состояния проходящего лечение пациента – как субъективное (ощущения самого пациента или о пациенте), так и объективное (измеряемые параметры).

Термин “наполнитель, адъювант и/или носитель” относится к молекулярным единицам или субстанциям, вместе с которыми вводится активный ингредиент. Такие фармацевтические наполнители, адъюванты или носители могут представлять собой стерильные жидкости типа воды или масла, в том числе полученные из нефти или из животных, растений или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и др., эксципиенты, разрыхлители, увлажняющие вещества или разбавители. Подходящие фармацевтические носители описаны в “Remington’s Pharmaceutical Sciences” by E.W. Martin.

В контексте настоящего изобретения термин “фармацевтически приемлемый”

относится к таким молекулярным единицам и композициям, которые хорошо переносятся физиологически и обычно не вызывают аллергических реакций или других отрицательных реакций, таких как расстройство желудка, головокружение и т.п. при введении людям. Термин “фармацевтически приемлемый” предпочтительно означает утвержденный федеральным или местным органом регулирования или включенный в Фармакопею США или в другую общепризнанную фармакопею для применения на животных, более предпочтительно на людях.

Антитело, а также фармацевтические композиции, содержащие данное антитело, могут применяться вместе с другими дополнительными препаратами, применимыми для лечения заболеваний, связанных с нежелательной пролиферацией клеток. Такие дополнительные препараты могут входить в состав одной и той же фармацевтической композиции или же они могут быть представлены в виде отдельной композиции для их введения, которое может и не быть одновременным с введением фармацевтической композиции, содержащей данное антитело.

Примеры других дополнительных препаратов, применимых при лечении заболеваний, связанных с нежелательной пролиферацией клеток, включают, без ограничения, алкилирующие агенты, такие, к примеру, как циклофосфамид, кармустин, даунорубицин, мехлорэтамин, хлорамбуцил, нимустин, мелфалан и др.; антрациклины, такие, к примеру, как даунорубицин, доксорубицин, эпирубицин, идарубицин, митоксантрон, валрубицин и др.; таксановые соединения, такие, к примеру, как паклитаксель, доцетаксель и др.; ингибиторы топоизомеразы, такие, к примеру, как этопозид, тенипозид, тулипозид, иринотекан и др.; аналоги нуклеотидов, такие, к примеру, как азациитидин, азатиоприн, капецитабин, цитарабин, доксифлуридин, фторурацил, гемцитабин, меркаптопурин, метотрексат, тиогуанин, фторафур и др.; средства на основе платины, такие, к примеру, как карбоплатин, цисплатин, оксалиплатин и др.; противоопухолевые средства, такие, к примеру, как винкристин, лейковорин, ломустин, прокарбазин и др.; модуляторы гормонов, такие, к примеру, как тамоксифен, финастерид, ингибиторы 5- α -редуктазы и др.; алкалоиды барвинка, такие, к примеру, как винбластин, винкристин, виндезин, винорелбин и др. Подходящие средства химиотерапии описаны более подробно в литературе, как-то The Merck Index in CD-ROM, 13th edition.

Фармацевтические композиции по изобретению можно вводить любым способом, подходящим для введения содержащих антитела лекарственных форм, как-

то, к примеру, подкожно, внутривенно, внутримышечно и др.

Показательные примеры вводимых фармацевтических дозовых форм могут быть, к примеру, в виде стерильных растворов, суспензий или лиофилизированных препаратов в подходящей дозовой форме; при этом данные фармацевтические композиции должны включать подходящие эксципиенты, такие как буферы, реагенты и др. В любом случае, эксципиенты следует выбирать в соответствии с выбранной фармацевтической дозовой формой.

Специалистам в данной области известно, что мутации в нуклеотидной последовательности гена, кодирующего LIF, приводящие к консервативным заменам аминокислот в положениях, некритических для функционирования белка, являются эволюционно нейтральными мутациями и не влияют на его общую структуру или функциональность. Такие варианты входят в рамки настоящего изобретения.

“Функционально эквивалентный” или “функционально эквивалентный вариант” в настоящей заявке означает молекулу, имеющую функциональную связь с молекулой, из которой она происходит (т.е. производной которой она является). Чаще всего она имеет и функциональную, и структурную взаимосвязь с молекулой, из которой она происходит. Функциональную/структурную связь следует понимать следующим образом:

А. Функциональная связь: молекула с функциональной связью к LIF в данном изобретении производит эффект в пределах 50-200% по сравнению с эффектом LIF, более предпочтительно в пределах 80-120% по сравнению с эффектом LIF и наиболее предпочтительно в пределах 95-105%, как-то практически 100% от эффекта LIF при анализе активности LIF *in vitro*. Специалистам известны различные *in vitro* методы оценки активности LIF *in vitro*. Например, можно измерять дифференцировку меланоцитов при добавлении LIF или его функционального эквивалента, как показано в Hirobe, 2002, J. Cell. Phys., 192:315-326. В частности, можно определять содержание меланоцитов после добавления LIF, как показано на фиг. 2А у Hirobe, 2002, J. Cell. Phys., 192:315-326.

В. Структурная связь: (1) молекула может мигрировать при электрофорезе в стандартном полиакриламидном геле с трис/глицином и SDS, как это известно специалистам, практически идентично LIF, и/или это молекула с другим профилем гликозилирования, и/или это молекула, у которой аминокислотная последовательность происходит из LIF человека, т.е. у которой одна или несколько (т.е. от 1 до 5, от 1 до 10

или от 1 до 20) аминокислот LIF человека подверглись модификации, замене, вставке или делеции. Такие функционально эквивалентные варианты LIF, содержащие данные вставки, делеции или модификации одной или нескольких аминокислот относительно LIF, к тому же сохраняют те же функции, что и LIF, поэтому они также включены в рамки настоящего изобретения. В предпочтительном воплощении “функционально эквивалентный” или “функционально эквивалентный вариант” означает молекулу, способную выполнять практически те же функции, что и LIF. Поэтому термин “функционально эквивалентный” или “функционально эквивалентный вариант” в настоящем изобретении также охватывает любые функционально эквивалентные фрагменты LIF. То, что описано здесь в отношении функционально эквивалентных вариантов LIF, также применимо и к функционально эквивалентным вариантам других белков, как-то CD44, Id1 и Id3.

Термин “фрагмент” относится к пептиду, включающему часть белка. При этом функционально эквивалентным фрагментом LIF является пептид или белок, включающий часть LIF и имеющий практически те же функции, что и LIF. Функции эффектора, которые практически те же, что у LIF, можно определить, как описано выше в разделе “А. Функциональная связь”.

“Фрагмент антитела” представляет собой пептид или несколько пептидов (как-то обычно два, три или четыре пептида), включающих часть антитела. Эти пептиды необязательно содержат межмолекулярные или внутримолекулярные дисульфидные мостики. При этом фрагмент антитела может включать одну или две легкие цепи или их фрагменты и/или одну или две тяжелые цепи или их фрагменты, необязательно соединенные дисульфидными мостиками. Наиболее типичными являются комбинации с одной тяжелой и одной легкой цепью или их фрагментами либо с двумя тяжелыми и двумя легкими цепями или их фрагментами. Соответствующие фрагменты антител или, более конкретно, фрагменты легких цепей и тяжелых цепей предпочтительно являются фрагментами, содержащими переменные домены (V_H) антител/цепей, более предпочтительно они содержат антигенсвязывающий участок антитела/цепи.

Антитела против LIF, предпочтительно антитела против LIF по настоящему изобретению, также могут представлять интерес для лечения опухолей, устойчивых к химиотерапии, учитывая известную тенденцию раковых стволовых клеток к устойчивости к химиотерапии. Кроме того, авторы изобретения показали, что применение антител против LIF, предпочтительно антител против LIF по настоящему

изобретению, также подходит для профилактики возникновения рецидивов при заболеваниях, связанных с нежелательной пролиферацией клеток (фиг. 7).

Способы диагностики по изобретению

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что LIF индуцирует процесс пролиферации клеток и возрастание раковых стволовых клеток посредством своего участия в каскаде JAK/STAT. В частности, авторы получили доказательства того, что CD44 и Id1 являются новыми маркерами глиомы. Кроме того, авторы показали, что Id1 предпочтительно экспрессируется в клеточной субпопуляции, обогащенной клетками GICs и отличающейся высоким уровнем экспрессии CD44, а гены ID1 и ID3 входят в сигнатуру опосредованного антителами ингибирования LIF. Следовательно, LIF, CD44, Id1, Id3 или любые их комбинации можно использовать в способах диагностики заболеваний, связанных с нежелательной пролиферацией клеток. Способы диагностики основаны на определении уровня LIF или его функционально эквивалентного варианта либо CD44 или его функционально эквивалентного варианта либо Id1 или его функционально эквивалентного варианта либо Id3 или его функционально эквивалентного варианта или же любой комбинации этих молекул. Предпочтительно способы диагностики основаны на определении уровня LIF или его функционально эквивалентного варианта.

Так, в следующем аспекте изобретение касается способа диагностики *in vitro* заболеваний, связанных с нежелательной пролиферацией клеток у субъекта, или же определения предрасположенности субъекта к такому заболеванию, связанному с нежелательной пролиферацией клеток, или же определения стадии или тяжести заболевания у субъекта, связанного с нежелательной пролиферацией клеток, или же мониторинга эффекта терапии, применяемой к субъекту с таким заболеванием, связанным с нежелательной пролиферацией клеток, который включает количественное определение уровня экспрессии LIF или его функционально эквивалентного варианта либо CD44 или его функционально эквивалентного варианта либо Id1 или его функционально эквивалентного варианта либо Id3 или его функционально эквивалентного варианта или же любой комбинации этих молекул в биологическом образце от данного субъекта, причем увеличение экспрессии гена, кодирующего LIF или его функционально эквивалентный вариант либо CD44 или его функционально эквивалентный вариант либо Id1 или его функционально эквивалентный вариант либо Id3 или его функционально эквивалентный вариант, или же любой комбинации этих

молекул относительно уровня экспрессии гена, кодирующего LIF или его функционально эквивалентный вариант либо CD44 или его функционально эквивалентный вариант либо Id1 или его функционально эквивалентный вариант либо Id3 или его функционально эквивалентный вариант, или же любой комбинации этих молекул в контрольном образце указывает на заболевание, связанное с нежелательной пролиферацией клеток, или на большую предрасположенность данного субъекта к заболеванию, связанному с нежелательной пролиферацией клеток, или на невосприимчивость субъекта к проводимой терапии. В предпочтительном воплощении данный способ *in vitro* включает количественное определение уровня экспрессии гена, кодирующего LIF или его функционально эквивалентный вариант, относительно уровня экспрессии гена, кодирующего LIF или его функционально эквивалентный вариант, в контрольном образце.

Таким образом, в настоящем изобретении термин “функционально эквивалентный вариант” также охватывает любые функционально эквивалентные фрагменты данных маркерных белков. Термин “фрагмент” относится к пептиду, включающему часть данного маркерного белка. При этом функционально эквивалентным фрагментом является пептид или белок, включающий часть данного маркерного белка и имеющий практически те же функции, что и данный белок. “Маркерный белок” предпочтительно означает LIF, CD44, Id1 или Id3, не ограничиваясь этим.

Диагностика в настоящем изобретении означает оценку вероятности, с которой субъект страдает заболеванием. Как должно быть понятно специалистам, такая оценка в норме не может быть правильной для 100% диагностируемых пациентов, хотя это и предпочтительно. Тем не менее, нужно, чтобы термином определялась статистически значимая часть субъектов, как страдающих заболеванием или предрасположенных к нему. Специалисты смогут определить, является ли часть статистически значимой, просто с помощью одного или нескольких хорошо известных статистических методов оценки, к примеру, определения доверительных интервалов, определения значений p , t -критерия Стьюдента, теста Mann-Whitney и др. Подробно об этом в Dowdy and Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, New York, 1983. Предпочтительно доверительные интервалы составляют по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%. Значения p предпочтительно составляют 0,2, 0,1, 0,05.

Термин “предрасположенность” в настоящем изобретении означает, что у субъекта еще не возникло заболевание или какие-то симптомы заболевания, приведенного выше, или же другие диагностические критерии, но с определенной вероятностью заболевание возникнет в будущем. Такая вероятность будет значительно отличаться от статистической вероятности возникновения заболевания, связанного с нежелательной пролиферацией клеток. Предпочтительно диагноз предрасположенности означает, что вероятность возникновения заболевания, связанного с нежелательной пролиферацией клеток, составляет по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или 100%. Диагноз предрасположенности иногда именуется прогнозом или предсказанием вероятности возникновения заболевания у субъекта.

В контексте настоящего изобретения “контрольный образец” понимается как стандартный образец, который используется для определения изменчивости уровня экспрессии генов и белков, используемых в настоящем изобретении. В одном воплощении контрольное значение получают из сигнала, полученного при использовании образца ткани, взятого у здорового индивида. Предпочтительно берут образцы из одной и той же ткани от нескольких здоровых индивидов и объединяют с тем, чтобы содержание полипептидов в образце отражало среднее значение данных молекул в популяции.

Так, в предпочтительном воплощении изобретения количественно определяются уровни экспрессии LIF или CD44 или Id1 или Id3.

Специалистам в данной области известно, что уровень экспрессии белка можно количественно определить любым стандартным методом. В качестве неограничивающего примера уровень белка можно количественно определить, к примеру, с помощью антител, обладающих способностью к связыванию с данными белками (или их фрагментами, содержащими антигенную детерминанту), и последующего количественного определения образовавшихся комплексов. Антитела, которые используются в этих методах, могут быть мечеными или немечеными. Типичные примеры маркеров, которые можно использовать, включают радиоактивные изотопы, ферменты, флуорофоры, хемилюминесцентные реагенты, субстраты или кофакторы ферментов, ингибиторы ферментов, частицы, красители и др. Существует большое количество известных методов, которые можно использовать в настоящем

изобретении, в которых используются немеченые антитела (первичные антитела) и меченые антитела (вторичные антитела); эти методы включают вестерн-блот, ELISA (ферментный иммуносорбентный анализ), RIA (радиоиммуноанализ), конкурентный EIA (конкурентный иммуноферментный анализ), DAS-ELISA (сэндвич-ELISA с двойными антителами), иммуноцитохимические и иммуногистохимические методы, методы на основе использования биочипов или микроматриц белков, которые включают специфические антитела, или методы на основе коллоидной преципитации в таких форматах, как тест-полоски. В другом предпочтительном воплощении количественное определение уровня белка проводится таким методом иммуноанализа, как вестерн-блот, иммуногистохимия или ELISA. В еще более предпочтительном воплощении данный метод иммуноанализа включает в себя антитело, вырабатываемое линией клеток гибридомы с номером доступа DSM ACC3054 по настоящему изобретению.

Равным образом способ диагностики по изобретению может применяться к любым заболеваниям, связанным с нежелательной пролиферацией клеток, как определено выше. В предпочтительном воплощении заболеванием, связанным с нежелательной пролиферацией клеток, является рак, предпочтительно рак с высоким уровнем LIF или высоким уровнем любого из следующих: Id1, Id3, CD44.

Применение способа изобретения на практике включает получение биологического образца от исследуемого субъекта. Типичные неограничивающие примеры таких образцов включают различные типы биологических жидкостей, как-то кровь, сыворотка, плазма, спинномозговая жидкость, жидкость брюшной полости, кал, моча и слюна, а также образцы тканей. Образцы биологических жидкостей могут быть получены любым известным способом, как и образцы тканей; для примера такими образцами тканей могут служить биоптаты, полученные при хирургической резекции.

В другом аспекте изобретение касается набора, содержащего реагенты для количественного определения уровня экспрессии LIF или его функционально эквивалентного варианта либо CD44 или его функционально эквивалентного варианта либо Id1 или его функционально эквивалентного варианта либо Id3 или его функционально эквивалентного варианта или же любой комбинации этих молекул для диагностики рака у субъекта или для определения предрасположенности субъекта к заболеванию таким раком или для определения стадии или тяжести такого рака у субъекта или для мониторинга эффекта проводимой терапии у субъекта с таким раком,

при этом, если реагенты выявляют усиление экспрессии данного гена или данного белка или его функционально эквивалентного варианта относительно контрольного образца, то данный субъект может страдать заболеванием, связанным с нежелательной пролиферацией клеток, или проявляет большую предрасположенность к данному заболеванию, связанному с нежелательной пролиферацией клеток, или проявляет большую тяжесть такого заболевания, или же проводимая терапия не эффективна. В предпочтительном воплощении набор характеризуется тем, что он содержит реагенты для количественного определения уровня экспрессии LIF или его функционально эквивалентного варианта.

Изобретение также касается применения данного набора.

Все термины и выражения, используемые при определении применения набора, были описаны выше и разъяснены для других аспектов изобретения и предпочтительных воплощений настоящего изобретения и также относятся к применению описанного здесь набора.

Способы разработки индивидуализированной терапии и отбора пациентов, которые могут получить пользу от терапии на основе антитела против LIF

В следующем аспекте изобретение касается способа разработки *in vitro* индивидуализированной терапии для пациентов, страдающих заболеваниями, связанными с нежелательной пролиферацией клеток, который включает:

- (a) количественное определение уровня экспрессии LIF у данного пациента, и
- (b) сравнение данного уровня экспрессии с контрольным уровнем,

при этом, если уровень экспрессии LIF у данного пациента превышает контрольные значения, то данному пациенту назначается антитело, направленное против LIF.

В другом аспекте изобретение касается способа отбора *in vitro* пациентов, страдающих заболеваниями, связанными с нежелательной пролиферацией клеток, для лечения с помощью антитела, направленного против LIF, который включает:

- (a) количественное определение уровня экспрессии LIF у данного пациента, и
- (b) сравнение данного уровня экспрессии с контрольным уровнем,

при этом, если уровень экспрессии LIF у данного пациента превышает контрольные значения, то данный пациент отбирается для лечения с помощью антитела, направленного против LIF.

В обоих аспектах предпочтительным является то воплощение, в котором

заболевание, связанное с нежелательной пролиферацией клеток, связано с нежелательной пролиферацией стволовых клеток.

Заболевания, проявляющие нежелательную пролиферацию клеток, описаны выше. В предпочтительном воплощении таким заболеванием, проявляющим нежелательную пролиферацию клеток, является рак. Еще более предпочтительно такой рак вызван высокой активностью сигнального пути JAK-STAT.

В предпочтительном воплощении такой рак представляет собой одно из следующего: глиома, пре-B-клеточная острая лимфобластная лейкемия, острая миелоидная лейкемия, колоректальная карцинома, аденокарцинома легких, аденокарцинома простаты, рак мочевого пузыря, рак протоков молочной железы или карцинома молочной железы. Еще более предпочтительно глиома представляет собой глиому IV стадии.

Способы прогнозирования по изобретению

В следующем аспекте изобретение касается способа прогнозирования *in vitro* средней вероятной продолжительности жизни у пациентов, страдающих заболеваниями, связанными с нежелательной пролиферацией клеток. Этот способ основывается на том, что, напр., в случае глиомы средняя вероятная продолжительность жизни у пациентов, проявляющих более высокий уровень экспрессии LIF, снижается по сравнению с контрольными пациентами. Авторы приводят данные о том, что CD44 и Id1 являются маркерами клеток GICs. Эти маркеры дают плохой прогноз для пациентов с GBM. Вышеотмеченная связь между более высоким уровнем LIF и более высоким уровнем Id1 и CD44, соответственно, у субъектов, страдающих заболеваниями, связанными с нежелательной пролиферацией клеток, дает новые маркеры, на которых могут основываться способы прогнозирования.

Способ основывается на:

(a) количественном определении уровня экспрессии LIF или CD44 или Id1 или Id3 у данного пациента, и

(b) сравнении данного уровня экспрессии с контрольным уровнем,

при этом, если уровень экспрессии LIF или CD44 или Id1 или Id3 у данного пациента превышает значения у контрольных пациентов с тем же заболеванием, то этот пациент будет иметь меньшую вероятную продолжительность жизни, чем контрольная группа.

В более конкретном аспекте для целей прогнозирования, а именно – предсказания средней вероятной продолжительности жизни индивида, страдающего таким заболеванием, измеряется концентрация LIF или CD44 или Id1 или Id3 или функционально эквивалентного любого из этих маркеров. Предпочтительно измеряется концентрация LIF или его функционально эквивалентного варианта. Для этого концентрация LIF или его функционально эквивалентного варианта либо CD44 или его функционально эквивалентного варианта либо Id1 или его функционально эквивалентного варианта либо Id3 или его функционально эквивалентного варианта или же любой комбинации этих молекул у больного раком сравнивается со стандартной концентрацией того же самого маркера. В настоящем изобретении “маркерами” являются LIF, CD44, Id1 и Id3 или функциональные эквиваленты LIF, CD44, Id1 и Id3. Предпочтительно сравнивается концентрация LIF или его функционально эквивалентного варианта у больного раком со стандартной концентрацией LIF или его функционально эквивалентного варианта, т.е. маркером является LIF или его функционально эквивалентный вариант. Контрольный образец берется из контрольной группы пациентов. Группа контрольных пациентов обычно состоит из пациентов, которые хорошо документированы и страдают одним и тем же заболеванием. Например, контрольный образец может быть получен из одинаковых количеств от группы из по меньшей мере 2, по меньшей мере 10, по меньшей мере 100 или более чем 1000 индивидов с тем, чтобы популяция пациентов, страдающих данным заболеванием, была статистически значимой. Контрольная группа может состоять из одного или нескольких из следующего:

- a) всех пациентов, страдающих данным заболеванием,
- b) всех пациентов, страдающих данным заболеванием, у которых не отмечено значительного повышения уровня LIF,
- c) всех пациентов, страдающих данным заболеванием, у которых не отмечено значительного понижения уровня LIF.

Концентрацию LIF можно определять внутриклеточно, в интерстициальном пространстве или в экстрактах, в которых присутствует и внутриклеточный белок, и белок, находящийся в интерстициальном пространстве.

В этом аспекте предпочтительное воплощение представлено заболеваниями, связанными с нежелательной пролиферацией клеток. В более предпочтительном воплощении заболеванием, связанным с нежелательной пролиферацией клеток,

является рак. Еще более предпочтительно тип рака связан с аномально высоким уровнем LIF в подгруппе больных данным раком. В более предпочтительном воплощении рак представляет собой одно из следующего: лейкемия, глиома, колоректальная карцинома, рак мочевого пузыря, рак молочной железы. В более предпочтительном воплощении лейкемия представляет собой пре-B-клеточную острую лимфобластную лейкемию или острую миелоидную лейкемию, а рак молочной железы – это рак протоков молочной железы или карцинома молочной железы.

Статистические методы позволяют предсказать среднюю вероятную продолжительность жизни пациентов, исходя из уровня данного белка или его функционально эквивалентного варианта. Данным белком предпочтительно является LIF.

В настоящем изобретении термин “функционально эквивалентный вариант” также включает функционально эквивалентные фрагменты данного маркерного белка LIF. Термин “фрагмент” относится к пептиду, включающему часть данного маркерного белка. При этом функционально эквивалентным фрагментом является пептид или белок, включающий часть данного маркерного белка и имеющий практически те же функции, что и данный белок.

В предпочтительном воплощении количественное определение уровня белка проводится таким методом иммуноанализа, как вестерн-блот, иммуногистохимия или ELISA. В еще более предпочтительном воплощении данный метод иммуноанализа включает в себя антитело, вырабатываемое линией клеток гибридомы с номером доступа DSM ACC3054.

Примеры

Далее изобретение будет описано на следующих примерах, которые следует рассматривать просто как иллюстративные и не ограничивающие примеры изобретения.

Материалы и методы

Клеточные линии и первичные культуры клеток

Клетки PCTCs и нейросферы GBM получали, как описано ранее (Bruna et al., *Cancer Cell*, 11:147-160, 2007; Gunther et al., *Oncogene*, 2007). Вкратце, образцы опухолей обрабатывали в пределах 30 мин после хирургической резекции. Измельченные кусочки образцов GBM человека расщепляли с помощью 200 ед./мл коллагеназы I (Sigma) и 500 ед./мл ДНКазы I (Sigma) в PBS в течение 2 ч при 37°C с

постоянным интенсивным перемешиванием. Одноклеточную суспензию фильтровали через клеточное сито на 70 мкм (BD Falcon) и промывали PBS. Наконец, клетки ресуспендировали, а затем культивировали в DMEM с 10% FBS (для культуры PCTC) или в нейросферной среде (для нейросфер GBM). Нейросферная среда состояла из нейробазальной среды (GIBCO) с добавлением B27 (GIBCO), L-глутамина (GIBCO), пенициллина/стрептомицина и факторов роста (20 нг/мл EGF и 20 нг/мл FGF-2 [PeproTech]). Образцы GBM человека получали из больницы Vall d'Hebron.

Клинический протокол был одобрен наблюдательным советом Института Vall d'Hebron (CEIC), и у всех субъектов получали информированное согласие.

Анализ внутричерепных опухолей

Все эксперименты на мышах были одобрены и выполнялись в соответствии с рекомендациями Комитета по работе с животными Исследовательского института Vall d'Hebron в соответствии с директивами Европейского Союза и национальными директивами. Клетки инокулировали стереотаксически в полосатое тело правого полушария головного мозга (на 1 мм впереди и 1,8 мм латерально от брегмы; на 2,5 мм интрапаренхимально) 9-недельных мышей NOD/SCID (Charles River Laboratories). Мышей подвергали эвтаназии, когда у них проявлялись неврологические симптомы или значительная потеря веса. Анализ методом магнитно-резонансной томографии (MRI) проводили на мышах, которым внутрибрюшинно вводили гадолиниевую соль диэтилентриаминпентауксусной кислоты в дозе 0,25 ммоль гадолия/кг веса тела. Изображения T1W магнитного резонанса целого мозга получали в магните с вертикальным каналом на 9,4 Т, подсоединенном к установке AVANCE 400 (Bruker), с использованием эффекта спин-эха, как описано ранее (Penuelas et al., Cancer Cell, 15:315-327, 2009). Объем опухолей вычисляли путем измерения количества пикселей, соответствующих опухолевой ткани в каждом изображении, используя программное обеспечение, предоставленное производителем (Bruker).

Статистический анализ

Для статистического анализа использовали t-критерий Стьюдента. На графиках данные представлены в виде среднего значения \pm SD.

Плазмиды и реагенты

TGF β 1 (R&D), ингибитор T β RI LY2109761 (Eli Lilly) и SB431542 (Tocris) использовали в указанных концентрациях. Для иммуноблоттинга использовали специфические антитела против p-Smad2, Smad2 (Cell Signaling); α -тубулина (Sigma) и

Id1 (C20, Santa Cruz Biotechnology). Lentивиральные конструкции получали и паковали, как описано ранее (Zufferey et al., Nat. Biotechnol., 15:871-875, 1997). Нейросферы подвергали диссоциации в среде роста, смешивали с вирусом и высевали на чашки. Полибрен (Sigma) добавляли в концентрации 8 мкг/мл. Клетки инкубировали с вирусом в течение 12 часов, промывали PBS и инкубировали в свежей среде, как описано ранее (Zufferey et al., Nat. Biotechnol., 15:871-875, 1997).

Анализ CD44-положительной популяции методом проточной цитометрии

Нейросферы подвергали диссоциации, и индивидуальные клетки инкубировали в течение 15 мин в блокирующем растворе, содержащем 10 мкг/мл IgG человека, а затем с антителом против CD44 или контрольного изотипа IgG2b, оба конъюгированы с FITC (BD Pharmingen). Клетки инкубировали в течение 20 мин на льду, предохраняя их от света, промывали в PBS и окрашивали с помощью пропидия йодида (Sigma), чтобы отличить отмирающие клетки. Затем клетки анализировали методом проточной цитометрии (FACSCalibur; Beckton Dickinson) или сортирования (MoFlo; DAKO) после окрашивания с помощью CD44-FITC.

Выделение клеток человека из ортотопических ксенотрансплантатов в мозге мышей

Головной мозг мышей, инокулированных нейросферами, подвергали диссоциации и окрашивали с помощью специфического к МНС класса I mAb HP-1F7 (Santa Cruz Biotechnology), а затем вторичного mAb, конъюгированного с PE (Dako Cytomation), для последующей сортировки МНС-I-положительных клеток человека (MoFlo-DAKO). Полученные клетки промывали и сразу же использовали в последующих экспериментах.

Анализ формирования нейросфер

Равное число клеток высевали при низкой плотности клеток (4 клетки/мкл) в лунки 96-луночного планшета. Клетки обрабатывали указанными соединениями и подсчитывали общее число новообразованных нейросфер после 7 дней культивирования (Lee et al., Cancer Cell, 13:69-80, 2008; Reynolds and Weiss, Dev. Biol. 175:1-13, 1996).

Анализ самовоспроизведения

Клетки из указанных нейросфер GBM, посеянных при 100 клеток/мкл, обрабатывали указанными соединениями в течение 7 дней. Затем нейросферы подвергали диссоциации, пересеивали без обработки и инкубировали еще в течение 7

дней. Подсчитывали общее число новообразованных нейрофер.

Количественный метод ПЦР в реальном времени

Количественный ПЦР в реальном времени (qRT-ПЦР) проводили, используя зонды Taqman фирмы Applied Biosystems, согласно рекомендациям производителя. Реакции проводили в секвенаторе ABI 7900 (Perkin Elmer), а результаты выражали в виде изменения в разгах при расчете методом $\Delta\Delta C_t$ относительно контрольного образца. В качестве внутреннего контроля для нормализации использовали GAPDH.

Иммуногистохимия, иммуноцитохимия

Для получения тканевых микроматриц из отдельных участков брали три керна по 0,6 мм и каждый из них вставляли в блоки-реципиенты в виде решетки с шагом в 1 мм. Для детектирования белков использовали следующие антитела: против Id1 (BioCheck), против CD44 (Ab-4, Neomarkers), против CD31 (клон JC70A, DAKO). Для количественного анализа Id1 определяли процент окрашенных раковых клеток и интенсивность окрашивания в репрезентативных полях большого увеличения ($\times 400$) на срезах ткани под световым микроскопом. Результаты выражали в виде H-показателя или процента положительных клеток.

Иммуноцитохимию нейрофер на Id1 (Santa Cruz Biotechnology) проводили, как описано ранее (Geschwind et al., Neuron, 29:325-329, 2001). Ядра контрастировали с помощью 4',6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI).

Микропрепарирование

На окрашенных гематоксилином/эозином срезах на 10 мкм из замороженных образцов идентифицировали зоны, представляющие опухоли, подальше от некротических очагов. Опухолевые клетки микропрепарировали с помощью микродиссектора Leica LMD6000 и обрабатывали для получения РНК с помощью набора RNaseasy Micro Kit (Qiagen) согласно рекомендациям производителя.

Определение люциферазы

Клетки нейрофер GBM краткосрочно трансфецировали различными несущими ID1 промоторно-репортерными конструкциями и несущей люциферазу морской фиалки Renilla плазмидой pRL-TK (Promega) в качестве контроля для нормализации, используя Lipofectamine 2000 (Invitrogen).

Пример 1. Клеточная линия гибридомы, вырабатывающая антитела против LIF человека

С целью получения антител, направленных против LIF человека, создавали

линии клеток гибридомы способами, хорошо известными специалистам в этой области. Из этих клеточных линий гибридомы была выбрана одна линия клеток и депонирована 1 апреля 2010 г. Институтом онкологии Vall d'Hebron в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. Она получила номер доступа DSM ACC3054. Соответственно, также была выбрана однородная популяция антител, вырабатываемых этой линией клеток. Специфичность связывания моноклональных антител против LIF человека (α -LIF), вырабатываемых линией клеток гибридомы DSM ACC3054, депонированной 1 апреля 2010 г. Институтом онкологии Vall d'Hebron в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, впоследствии определяли методом иммунопреципитации. Для этого клетки 293Т, которые были трансфицированы вариантами белка LIF человека с С-концевым тегом EGFP (фиг. 1А), лизировали и подвергали иммунопреципитации с помощью моноклонального антитела против LIF, а затем в лизаты добавляли белок A/G и элюировали иммунопреципитаты. Фрагменты LIF детектировали методом иммуноблота с помощью антитела против EGFP. Такой анализ показал, что данное антитело распознает LIF и его варианты при условии, что присутствует С-концевой домен белка LIF человека, состоящий из аминокислот 160-202. Моноклональное антитело распознавало меченный EGFP полноразмерный LIF, но не меченные EGFP фрагменты LIF, соответствующие аминокислотам 1-72, 1-127 или 1-160 (фиг. 1В). Таким образом, для распознавания антителом против LIF необходим С-концевой домен белка LIF человека, состоящий из аминокислот 160-202 (фиг. 1С).

Пример 2. Моноклональное антитело против LIF блокирует индукцию фосфо-Stat3 под действием LIF в культуре клеток и в нейросферах глиобластомы, полученных от пациентов

Для тестирования эффекта моноклонального антитела против LIF, вырабатываемого линией клеток гибридомы DSM ACC3054, депонированной 1 апреля 2010 г. Институтом онкологии Vall d'Hebron в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, на предмет его эффективности в блокировании нижележащих эффектов LIF, клетки U373 обрабатывали с рекомбинантным LIF человека или без него в присутствии или в отсутствие данного моноклонального антитела либо в присутствии подобранного по изотипу IgG в качестве контроля. Последующее определение уровня фосфо-Stat3 методом вестерн-блота показало, что опосредованная LIF индукция фосфо-Stat3 эффективно блокируется при введении моноклонального антитела против LIF

(фиг. 2А).

Для тестирования эффекта указанного антитела на полученные от пациентов раковые клетки, полученные от пациентов нейросферы GBM, дезагрегировали и необязательно инкубировали в присутствии данного антитела или подобранного по изотипу контрольного IgG. Последующее определение уровня фосфо-Stat3 методом вестерн-блота показало, что опосредованная LIF индукция фосфо-Stat3 в клетках, полученных от пациентов, эффективно блокируется при введении моноклонального антитела против LIF (фиг. 2В).

Пример 3. Полученные от пациента нейросферы GBM содержат клеточный компартмент CD44^{high}/Id1^{high}

CD44 представляет собой белок, который, как описано, сильно экспрессируется в клетках CICs некоторых опухолей (Visvader and Lindeman, Nat. Rev. Cancer, 8:755-768, 2008). Соответственно, авторы настоящего изобретения отмечали, что в нейросферах GBM присутствуют две дискретные популяции, экспрессирующие различные уровни CD44 (фиг. 3А). Однако компартмент CD44^{high} до сих пор не был хорошо изучен в глиоме. Для того чтобы проверить, как экспрессия CD44 коррелирует с экспрессией Id1 в клетках, полученных из нейросфер пациентов, популяцию CD44^{high} из нейросфер от 4 разных пациентов подвергали сортировке методом проточной цитометрии после окрашивания клеток, как описано в “Материалах и методах”. После этого определяли уровень экспрессии Id1 в популяциях CD44^{high} и CD44^{low}, соответственно. Интересно, что белок и РНК Id1 обнаруживались на гораздо более высоком уровне в компартменте CD44^{high}, чем в CD44^{low} (фиг. 3В и 3С). Интересно, что Id3 также присутствовал на более высоком уровне в популяции CD44^{high}, однако этого не отмечалось в случае Id2, другого члена семейства Id факторов транскрипции (фиг. 3В). Таким образом, высокий уровень CD44 коррелирует с высоким уровнем Id1 и Id3.

Пример 4. Популяция CD44^{high}/Id1^{high} в нейросферах GBM обогащена клетками, иницирующими глиому

Авторы отмечали, что при индукции дифференцировки полученных от пациентов нейросфер посредством обработки сывороткой компартмент CD44^{high} исчезал (фиг. 4А). Далее клетки CD44^{high} и CD44^{low} подвергали сортировке и высевали при низкой плотности. Клетки CD44^{high} давали больше нейросфер, чем компартмент CD44^{low} (фиг. 4В), указывая на то, что клетки CD44^{high} обладают большей способностью к образованию нейросфер, чем клетки CD44^{low}. Затем анализировали

способность CD44^{high} к инициации опухолей по сравнению с компартментом CD44^{low}. Клетки опухолей подвергали сортировке на основе экспрессии CD44 и делали предельные разведения *in vivo*, имплантируя понижающиеся количества клеток в правый стриатум мышей NOD-SCID. Прогрессирование опухолей отслеживали методом магнитной резонансной томографии (MRI). Клетки, экспрессирующие CD44 на высоком уровне, оказались гораздо более онкогенными, чем клетки, слабо экспрессирующие CD44. Только у 1 из 7 мышей, инокулированных 100 000 клеток CD44^{low}, развивались опухоли, тогда как опухоли возникали у 9 из 9 мышей, когда им инокулировали такое же количество клеток CD44^{high} (фиг. 4C и 4D). Более того, у мышей, которым инокулировали 10 000 или 1000 клеток CD44^{high}, возникали опухоли, тогда как такое же количество CD44^{low} никогда не приводило к образованию опухолей. Близкий результат получили с клетками от другого пациента, GBM2 (фиг. 4D). Опухоли, образованные компартментом CD44^{high}, воспроизводили гистопатологические характеристики опухоли пациента, включая такую же неоднородность клеток (фиг. 4E). Например, опухоли, возникшие у мышей, содержали такой же процент (около 70%) Sox2-положительных и отрицательных клеток, как и опухоль у пациента (фиг. 4E). Все эти результаты свидетельствуют, что компартмент CD44^{high} обогащен клетками GICs, как это было показано в других типах опухолей.

Пример 5. Антитело против LIF снижает уровень популяции CD44^{high}/Id1^{high} в нейросферах GBM

Нейросферы GBM подвергали диссоциации и культивировали в присутствии моноклонального антитела против LIF из линии клеток DSM ACC3054 или подобранного по изотипу контрольного IgG в течение 7 дней в присутствии (A) или в отсутствие (B) EGF и FGF. Примечательно, что нейросферы, обработанные антителом против LIF, давали меньше компартмента CD44^{high}. Следовательно, TGFβ регулирует компартмент CD44^{high}, который экспрессирует Id1 на высоком уровне и обогащен клетками GICs.

Пример 6. Антитело против LIF снижает уровни CD44 и Id1 в нейросферах GBM, полученных от пациентов

Нейросферы GBM подвергали диссоциации и культивировали в присутствии моноклонального антитела против LIF из линии клеток DSM ACC3054 или подобранного по изотипу контрольного IgG в течение 7 дней в отсутствие EGF и FGF и определяли уровни мРНК указанных генов методом qRT-ПЦР. По сравнению с

подобраным по изотипу контрольным IgG в нейросферах GBM, полученных от пациентов, уровень мРНК Id1, а также уровень мРНК CD44 значительно снижался при введении антитела против LIF.

Пример 7. Обработка антителом против LIF in vivo уменьшает клеточный компартмент CD44^{high}/Id1^{high}

Для того чтобы оценить, влияет ли уменьшение популяции GIC в опухолях в ответ на введение моноклонального антитела против LIF на рецидивы опухолей, авторы настоящего изобретения сначала вырабатывали опухоли у мышей путем инокулирования нейросфер GBM1. Через 1 месяц после инокулирования клеток выявляли мышей, несущих опухоли, при помощи MRI. При этом мышей обрабатывали моноклональным антителом против LIF или подобранным по изотипу IgG в течение 10 дней и забивали. Опухолевые клетки человека выделяли из головного мозга мыши методом сортировки МНС-I-положительных клеток человека (фиг. 7A).

Клетки, полученные от мышей, обработанных ингибитором TβRI, проявляли более низкий уровень транскриптов ID1, ID3 и CD44 при измерении методом qRT-ПЦР (фиг. 7B).

Пример 8. Больные глиомой или глиобластомой, проявляющие повышение уровня LIF, имеют меньшую вероятную продолжительность жизни

В одной подгруппе больных глиомой уровень LIF повышался в ≥ 2 раз. В течение определенного периода времени вероятность выживания этих больных значительно снижается по сравнению с контрольными пациентами. Например, вероятность выживания через 1000 дней снижается примерно на 50% по сравнению со всеми больными глиомой и примерно на 35% по сравнению с теми больными глиомой, у которых уровень LIF не был повышен в ≥ 2 раз (фиг. 8). Данные получены по программе Банка молекулярных данных по неоплазии мозга (REMBRANDT) из Национального института рака.

В одной подгруппе больных глиобластомой уровень LIF повышался в ≥ 9 раз. В течение определенного периода времени вероятность выживания этих больных значительно снижается по сравнению с контрольными пациентами. Например, вероятность выживания через 500 дней снижается примерно на 50% по сравнению со всеми больными глиобластомой (фиг. 9). Данные получены по программе Банка молекулярных данных по неоплазии мозга (REMBRANDT) из Национального института рака.

Предпочтительные воплощения изобретения

Далее приведены предпочтительные воплощения настоящего изобретения. Однако следует иметь в виду, что изобретение не ограничивается этими предпочтительными воплощениями.

1. Моноклональное антитело или его фрагмент, которое распознает полноразмерный LIF человека, но не распознает фрагмент LIF, соответствующий аминокислотам 1-72, более предпочтительно не распознает фрагмент, соответствующий аминокислотам 1-127, и еще более предпочтительно не распознает фрагмент, соответствующий аминокислотам 1-160.

2. Моноклональное антитело из воплощения 1, причем данное антитело распознает эпитоп LIF человека, содержащийся на участке, соответствующем аминокислотам 160-202 LIF человека.

3. Моноклональное антитело из воплощения 1, причем данное антитело распознает эпитоп LIF человека, содержащийся на участке, выбранном из следующего: участка, соответствующего аминокислотам 160-180, участка, соответствующего аминокислотам 170-190, участка, соответствующего аминокислотам 180-200, участка, соответствующего аминокислотам 182-202 LIF человека.

4. Моноклональное антитело по любому из предыдущих воплощений, причем антитело конкурентно ингибируется по связыванию с LIF человека моноклональным антителом, вырабатываемым гибридомой, депонированной 1 апреля 2010 г. Институтом онкологии Vall d'Hebron в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.

5. Моноклональное антитело по любому из предыдущих воплощений, которое относится к изотипу IgG1.

6. Моноклональное антитело по любому из предыдущих воплощений, которое вырабатывается линией клеток гибридомы с номером доступа DSM ACC3054, депонированной 1 апреля 2010 г. Институтом онкологии Vall d'Hebron в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.

7. Гибридома, депонированная 1 апреля 2010 г. Институтом онкологии Vall d'Hebron в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.

8. Иммуноаналитический реагент, применяемый при измерении LIF человека, который содержит моноклональное антитело или его фрагмент по любому из воплощений 1-6.

9. Моноклональное антитело или его фрагмент по любому из воплощений 1-6, причем данное антитело или его фрагмент действует через ингибирование самовоспроизведения раковых стволовых клеток.

10. Антитело или его фрагмент, направленные против LIF человека, для лечения заболевания, связанного с нежелательной пролиферацией клеток.

11. Антитело или его фрагмент по любому из воплощений 1-6 или 9, для лечения заболевания, связанного с нежелательной пролиферацией клеток.

12. Фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество антитела или его фрагмента по любому из воплощений 1-6 или 9-11 вместе с фармацевтически приемлемым носителем.

13. Способ диагностики *in vitro* заболеваний, связанных с нежелательной пролиферацией клеток у субъекта, или же определения предрасположенности субъекта к такому заболеванию, связанному с нежелательной пролиферацией клеток, или же определения стадии или тяжести заболевания у субъекта, связанного с нежелательной пролиферацией клеток, или же мониторинга эффекта терапии, применяемой к субъекту с таким заболеванием, связанным с нежелательной пролиферацией клеток, который включает количественное определение уровня экспрессии LIF или его функционально эквивалентного варианта либо CD44 или его функционально эквивалентного варианта либо Id1 или его функционально эквивалентного варианта либо Id3 или его функционально эквивалентного варианта или же любой комбинации этих молекул в биологическом образце от данного субъекта, причем увеличение экспрессии гена, кодирующего LIF или его функционально эквивалентный вариант либо CD44 или его функционально эквивалентный вариант либо Id1 или его функционально эквивалентный вариант либо Id3 или его функционально эквивалентный вариант, или же любой комбинации этих молекул относительно уровня экспрессии гена, кодирующего LIF или его функционально эквивалентный вариант либо CD44 или его функционально эквивалентный вариант либо Id1 или его функционально эквивалентный вариант либо Id3 или его функционально эквивалентный вариант, или же любой комбинации этих молекул в контрольном образце указывает на заболевание, связанное с нежелательной пролиферацией клеток, или на большую предрасположенность данного субъекта к заболеванию, связанному с нежелательной пролиферацией клеток, или на невосприимчивость данного субъекта к проводимой терапии.

14. Применение набора, содержащего реагенты для количественного определения уровня экспрессии LIF или его функционально эквивалентного варианта либо CD44 или его функционально эквивалентного варианта либо Id1 или его функционально эквивалентного варианта либо Id3 или его функционально эквивалентного варианта или же любой комбинации этих молекул для диагностики заболевания, связанного с нежелательной пролиферацией клеток у субъекта, или для определения предрасположенности субъекта к такому заболеванию или для определения стадии или тяжести такого заболевания у субъекта или для мониторинга эффекта проводимой терапии у субъекта с таким заболеванием, при этом, если реагенты выявляют усиление экспрессии данного гена или данного белка или его функционально эквивалентного варианта относительно контрольного образца, то данный субъект может страдать таким заболеванием или проявляет большую предрасположенность к такому заболеванию или проявляет большую тяжесть такого заболевания или же проводимая терапия не эффективна.

15. Способ разработки *in vitro* индивидуализированной терапии для пациентов, страдающих заболеваниями, связанными с повышением уровня LIF, который включает:

- (a) количественное определение уровня экспрессии LIF у данного пациента, и
- (b) сравнение данного уровня экспрессии с контрольным уровнем,

при этом, если уровень экспрессии LIF у данного пациента превышает контрольные значения, то данному пациенту назначается антитело против LIF.

16. Способ отбора *in vitro* пациентов, страдающих заболеваниями, связанными с нежелательной пролиферацией клеток, для лечения с помощью антитела, направленного против LIF, который включает:

- (a) количественное определение уровня экспрессии LIF у данного пациента, и
- (b) сравнение данного уровня экспрессии с контрольным уровнем,

при этом, если уровень экспрессии LIF у данного пациента превышает контрольные значения, то данный пациент отбирается для лечения с помощью антитела по воплощениям 1-6 или 9-12 или его фрагмента.

17. Способ прогнозирования *in vitro* вероятной продолжительности жизни или вероятности выживания у субъектов, страдающих заболеваниями, связанными с нежелательной пролиферацией клеток, который включает количественное определение уровня экспрессии LIF или его функционально эквивалентного варианта в биологическом образце от данного субъекта, при этом усиление экспрессии LIF или его

функционально эквивалентного варианта относительно экспрессии LIF или его функционально эквивалентного варианта в контрольном образце указывает на снижение вероятной продолжительности жизни.

18. Антитело или его фрагмент либо фармацевтическая композиция или способ либо набор по любому из воплощений 10-14, в котором заболевание, представляющее нежелательную пролиферацию клеток, характеризуется наличием высокого уровня LIF.

19. Антитело или его фрагмент либо фармацевтическая композиция или способ либо набор по любому из воплощений 10-17, в котором заболевание, представляющее нежелательную пролиферацию клеток, характеризуется популяцией клеток, экспрессирующих высокие уровни CD44 и Id1.

20. Антитело или его фрагмент либо фармацевтическая композиция или способ либо набор по любому из воплощений 10-19, в котором заболеванием, представляющим нежелательную пролиферацию клеток, является рак.

21. Антитело или его фрагмент либо фармацевтическая композиция или способ либо набор по любому из воплощений 18-20, в котором рак представляет собой глиому, пре-B-клеточную острую лимфобластную лейкемию, острую миелоидную лейкемию, аденокарциному легких, аденокарциному простаты, колоректальную карциному, рак мочевого пузыря, рак протоков молочной железы или рак молочной железы.

22. Антитело или его фрагмент либо фармацевтическая композиция или способ либо набор по воплощению 21, в котором глиома представляет собой глиому IV стадии.

23. Способ или набор по любому из воплощений 13-22, в котором количественное определение уровня LIF проводится методом вестерн-блота, иммуногистохимии или ELISA.

24. Способ или набор по любому из воплощений 13-23, в котором способ или набор для измерения уровня экспрессии LIF включает моноклональное антитело по воплощениям 1-6 или 9 или его фрагмент.

25. Антитело или его фрагмент либо фармацевтическая композиция по любому из воплощений 1-6 или 9-12 или 20-22, в котором данное антитело или его фрагмент способны уменьшить популяцию клеток, характеризующихся высокими уровнями CD 44 и Id1.

26. Антитело или его фрагмент либо фармацевтическая композиция по любому из воплощений 1-6 или 9-12 или 20-22, в котором данное антитело действует через

ингибирование самовоспроизведения раковых стволовых клеток.

27. Антитело или его фрагмент либо фармацевтическая композиция или набор либо способ по любому из предыдущих воплощений, в котором термин “LIF или его функционально эквивалентный вариант либо CD44 или его функционально эквивалентный вариант либо Id1 или его функционально эквивалентный вариант либо Id3 или его функционально эквивалентный вариант“ ограничивается LIF или его функционально эквивалентным вариантом.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Моноклональное антитело или его фрагмент, которое распознает полноразмерный Лейкемический ингибиторный фактор (LIF) человека, но не распознает фрагмент LIF, соответствующий аминокислотам 1-72, где полноразмерный LIF человека является предшественником изоформы 1 человеческого LIF.

2. Моноклональное антитело по п. 1, которое не распознает фрагмент, соответствующий аминокислотам 1-160.

3. Моноклональное антитело по п. 1, которое распознает эпитоп LIF человека, содержащийся на участке, соответствующем аминокислотам 160-202 LIF человека.

4. Моноклональное антитело по п. 1, которое распознает эпитоп LIF человека, содержащийся на участке, выбранном из следующего: участка, соответствующего аминокислотам 160-180, участка, соответствующего аминокислотам 170-190, участка, соответствующего аминокислотам 180-200, участка, соответствующего аминокислотам 182-202 LIF человека.

5. Моноклональное антитело по п.1, которое конкурентно ингибируется по связыванию с LIF человека моноклональным антителом, вырабатываемым линией клеток гибридомы, депонированной 1 апреля 2010 г. Институтом онкологии Vall d'Hebron в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (с номером доступа DSMACC3054).

6. Моноклональное антитело по п.1, которое относится к изотипу IgG1.

7. Моноклональное антитело по п.1, которое является гуманизированным.

8. Моноклональное антитело по п.1, которое вырабатывается линией клеток гибридомы DSM ACC3054, депонированной 1 апреля 2010 г. Институтом онкологии Vall d'Hebron в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.

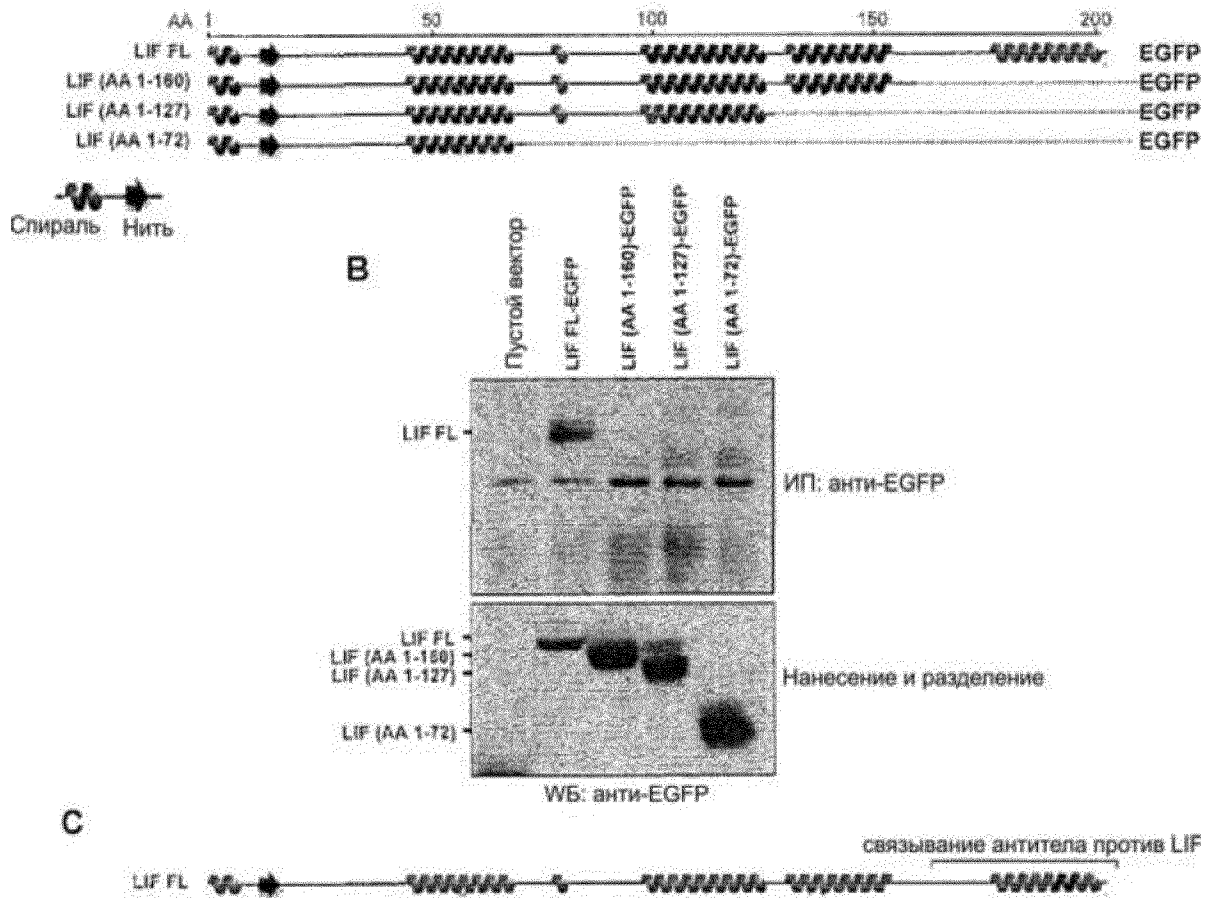
9. Фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество антитела или его фрагмента по п.1 вместе с фармацевтически приемлемым носителем.

10. Иммуноаналитический реагент, применяемый при измерении LIF человека, который содержит моноклональное антитело или его фрагмент по п.1.

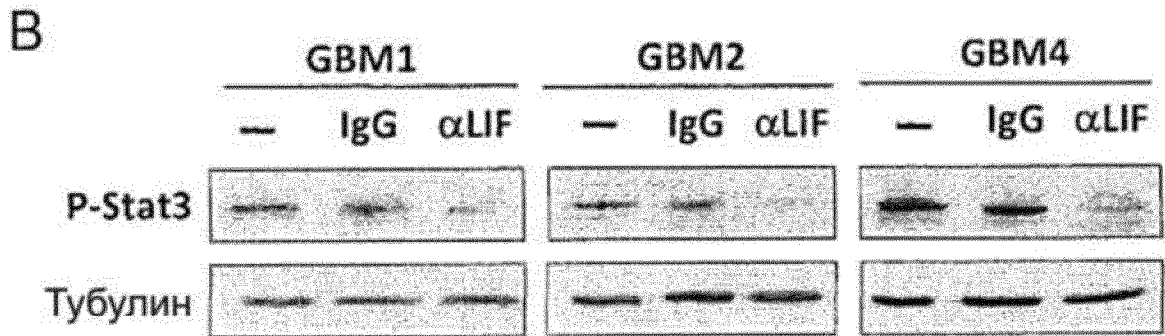
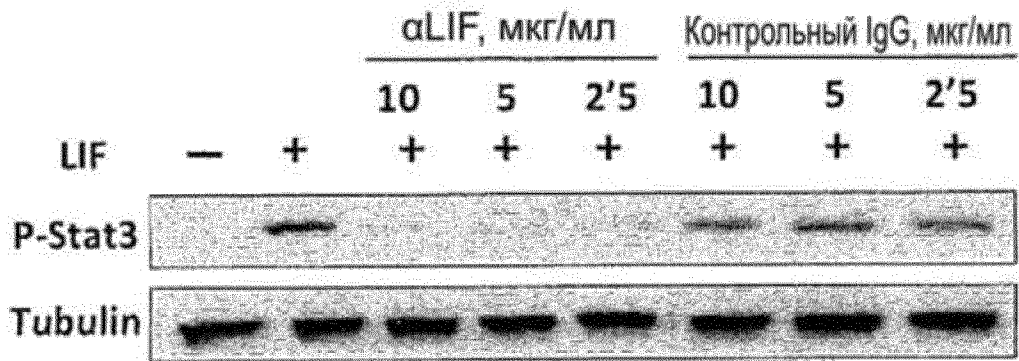
11. Линия клеток гибридомы, депонированная 1 апреля 2010 г. Институтом онкологии Vall d'Hebron в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.

АНТИТЕЛО, РАСПОЗНАЮЩЕЕ
ЛЕЙКЕМИЧЕСКИЙ ИНГИБИТОРНЫЙ
ФАКТОР (LIF) ЧЕЛОВЕКА,
И ПРИМЕНЕНИЕ АНТИТЕЛ ПРОТИВ
LIF ПРИ ЛЕЧЕНИИ ЗАБОЛЕВАНИЙ,
СВЯЗАННЫХ С НЕЖЕЛАТЕЛЬНОЙ ПРОЛИФЕРАЦИЕЙ КЛЕТОК

Фиг. 1

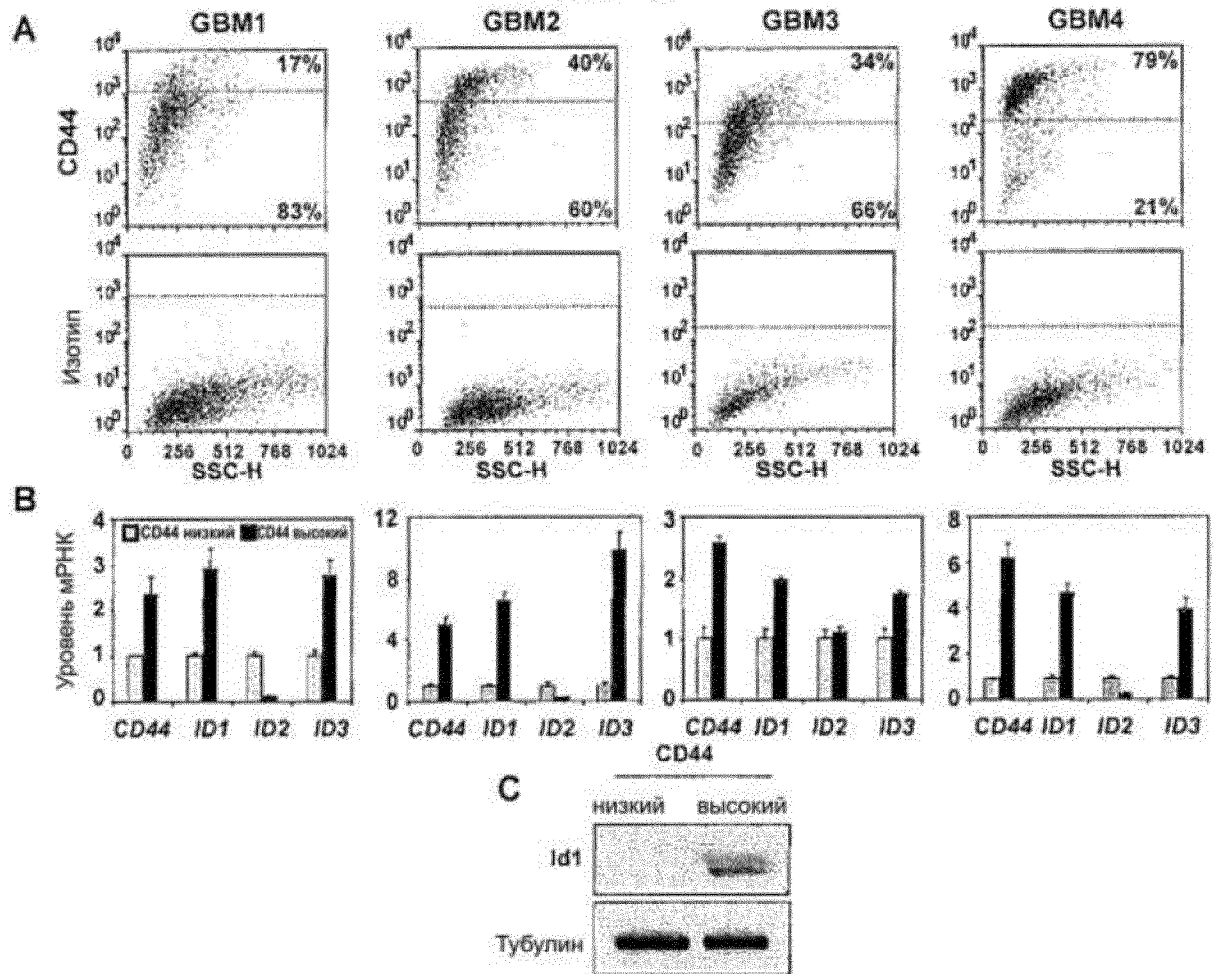


A **Фиг. 2**



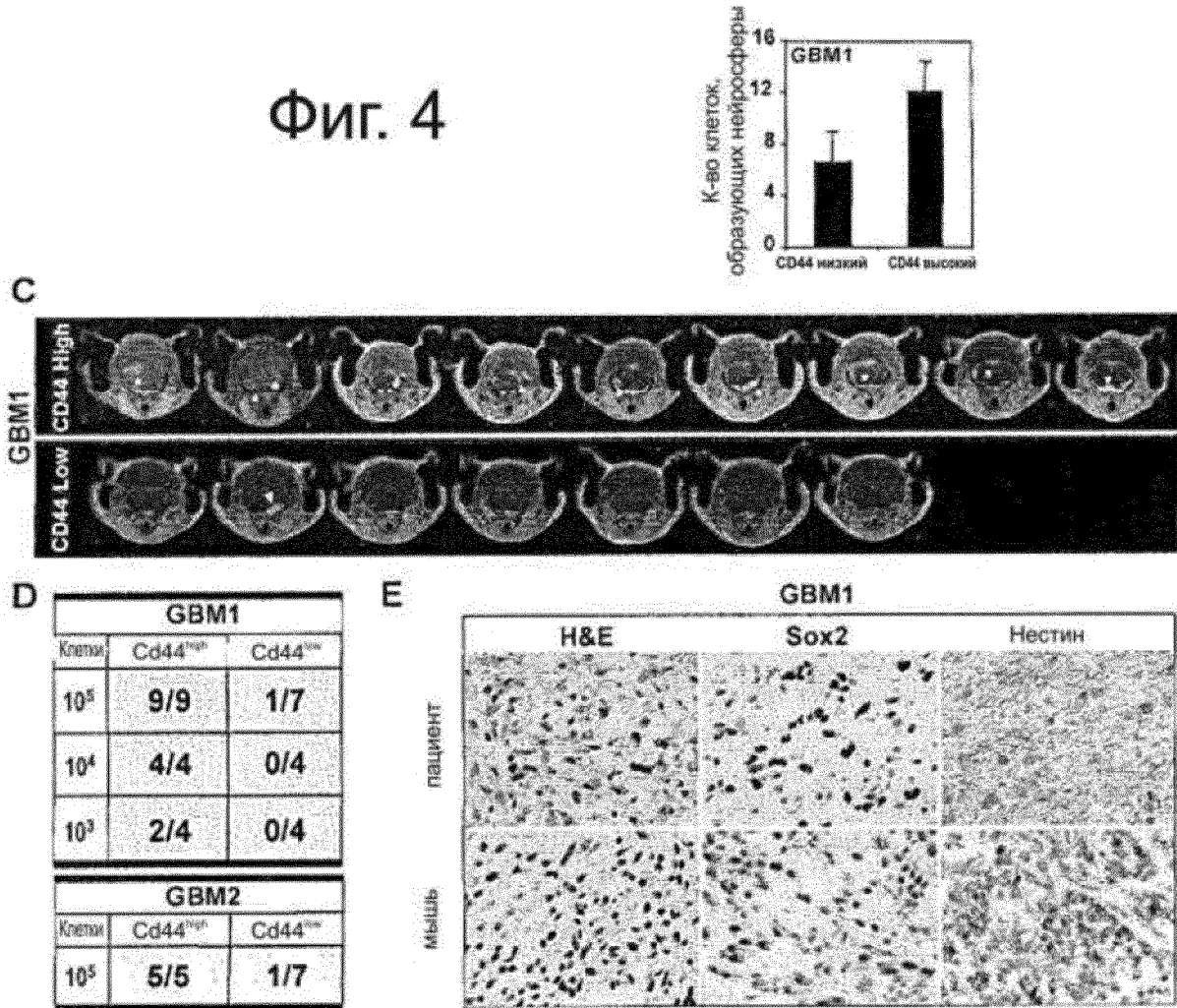
АНТИТЕЛО, РАСПОЗНАЮЩЕЕ
ЛЕЙКЕМИЧЕСКИЙ ИНГИБИТОРНЫЙ
ФАКТОР (LIF) ЧЕЛОВЕКА,
И ПРИМЕНЕНИЕ АНТИТЕЛ ПРОТИВ
LIF ПРИ ЛЕЧЕНИИ ЗАБОЛЕВАНИЙ,
СВЯЗАННЫХ С НЕЖЕЛАТЕЛЬНОЙ ПРОЛИФЕРАЦИЕЙ КЛЕТОК

ФИГ. 3

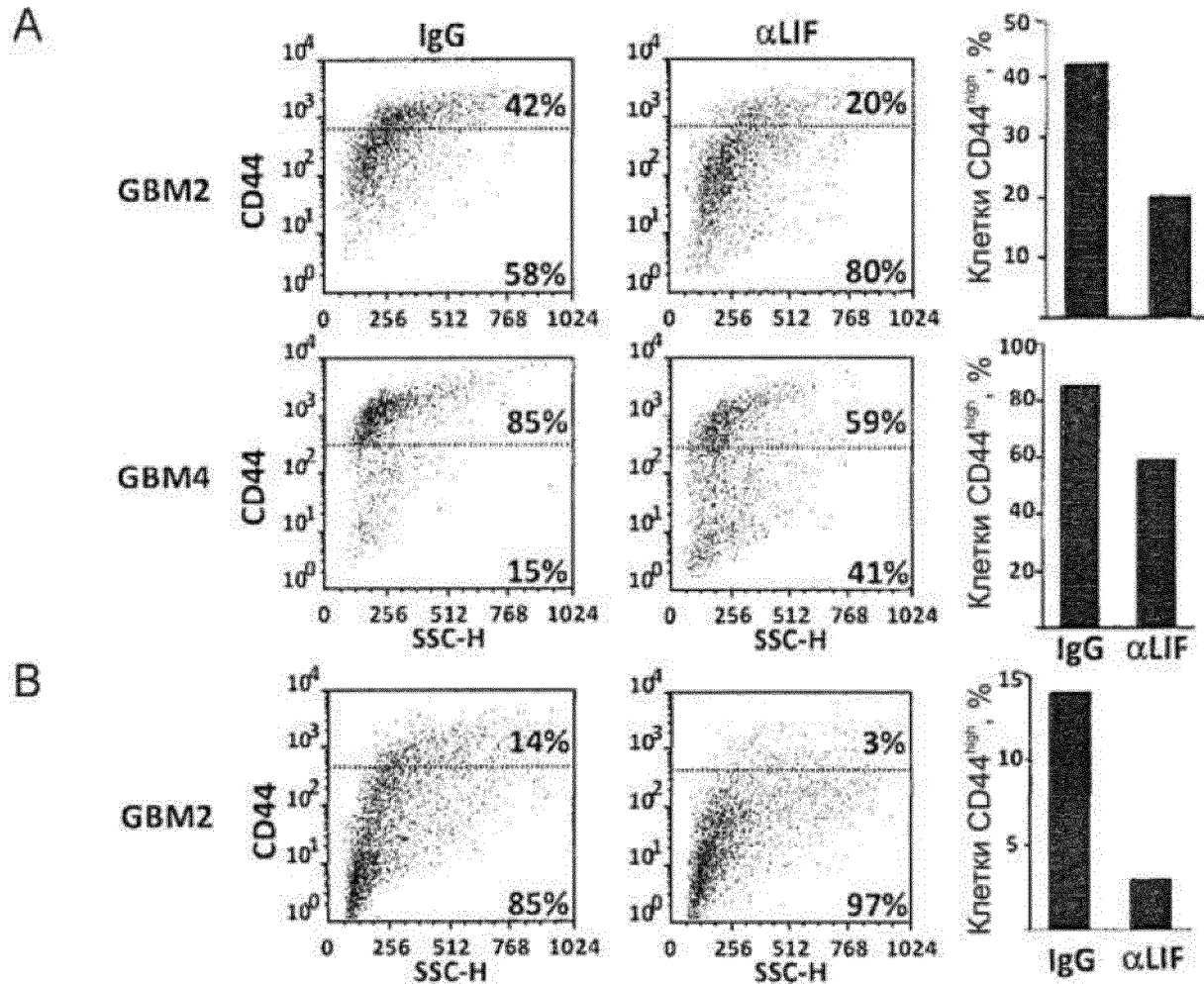


АНТИТЕЛО, РАСПОЗНАЮЩЕЕ
ЛЕЙКЕМИЧЕСКИЙ ИНГИБИТОРНЫЙ
ФАКТОР (LIF) ЧЕЛОВЕКА,
И ПРИМЕНЕНИЕ АНТИТЕЛ ПРОТИВ
LIF ПРИ ЛЕЧЕНИИ ЗАБОЛЕВАНИЙ,
СВЯЗАННЫХ С НЕЖЕЛАТЕЛЬНОЙ ПРОЛИФЕРАЦИЕЙ КЛЕТОК

Фиг. 4

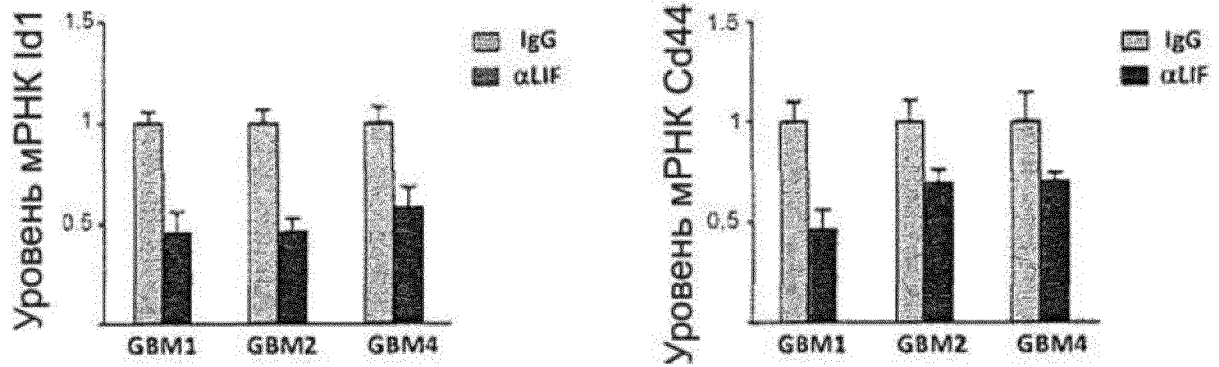


Фиг. 5

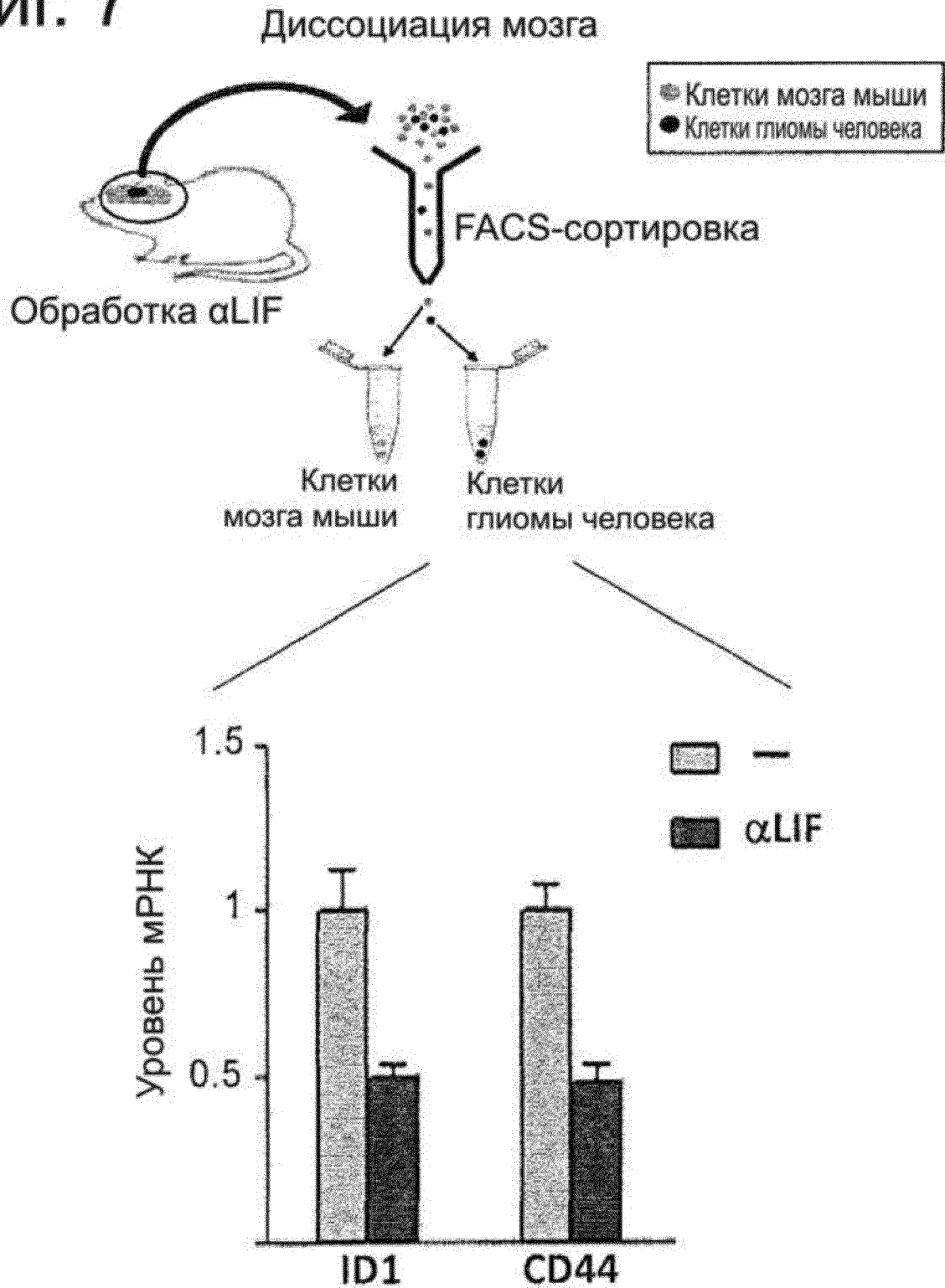


АНТИТЕЛО, РАСПОЗНАЮЩЕЕ
ЛЕЙКЕМИЧЕСКИЙ ИНГИБИТОРНЫЙ
ФАКТОР (LIF) ЧЕЛОВЕКА,
И ПРИМЕНЕНИЕ АНТИТЕЛ ПРОТИВ
LIF ПРИ ЛЕЧЕНИИ ЗАБОЛЕВАНИЙ,
СВЯЗАННЫХ С НЕЖЕЛАТЕЛЬНОЙ ПРОЛИФЕРАЦИЕЙ КЛЕТОК

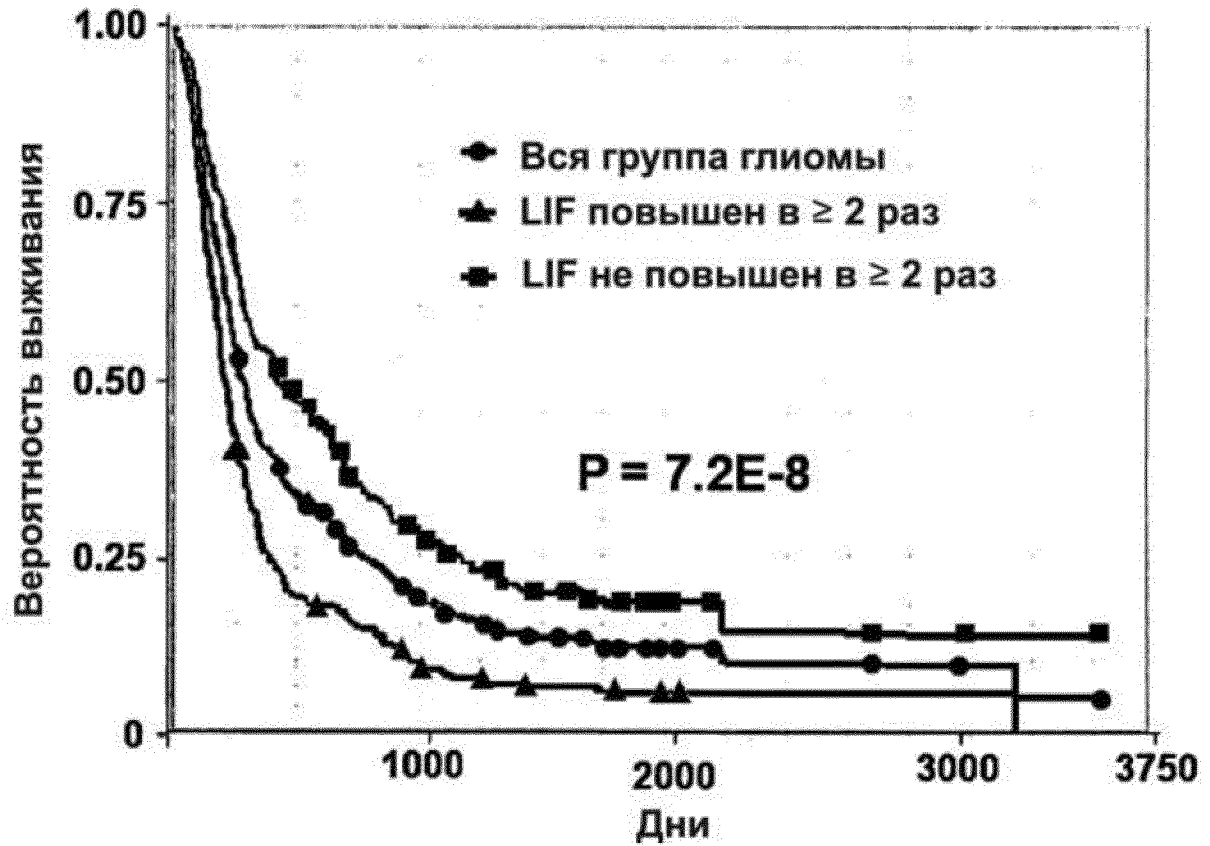
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9

