

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290533** (13) **A2**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.05.31

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

(22) Дата подачи заявки
2010.04.06

(54) ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ АГЕНТЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ, СВЯЗАННЫХ С НЕЖЕЛАТЕЛЬНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ПРОЛИФЕРАЦИЕЙ

(31) P200900928

(32) 2009.04.03

(33) ES

(62) 201101450; 2010.04.06

(71) Заявитель:

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

(72) Изобретатель:

**Сеоане Суарес Хоан, Пеньюелас
Прието Сильвия, Басельга Торрес
Хосе (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 основано на наблюдении способности LIF активировать самообновление опухолевых стволовых клеток в злокачественных новообразованиях, в частности в глиомах, что указывает на то, что ингибирование LIF, и в целом цитокинов IL-6-типа, может быть применено в терапевтических композициях для лечения заболеваний, связанных с нежелательной пролиферацией. Изобретение также относится к способу идентификации соединений, способных блокировать/ингибировать пролиферацию стволовых клеток, и к способу in vitro диагностики заболеваний, связанных с нежелательной клеточной пролиферацией в объекте, или к способу определения склонности объекта к указанному заболеванию, связанному с нежелательной клеточной пролиферацией, или к способу прогноза средней продолжительности жизни объектов, страдающих от указанных опухолей.

A2

202290533

202290533

A2

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ АГЕНТЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ, СВЯЗАННЫХ С НЕЖЕЛАТЕЛЬНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ПРОЛИФЕРАЦИЕЙ

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение в целом относится к ингибиторам экспрессии и/или активности цитокина IL-6-типа для лечения заболеваний, связанных с нежелательной клеточной пролиферацией, более конкретно, для лечения злокачественных опухолевых и опухолевых стволовых клеток. Кроме того, также описан способ диагностики указанных заболеваний и прогноза средней продолжительности жизни пациентов.

Предшествующий уровень техники

Недавно в злокачественных новообразованиях была открыта субпопуляция опухолевых клеток со свойствами стволовых клеток. Считается, что эта клеточная популяция, которую называли злокачественные стволовые клетки, ответственна за возникновение, распространение и рецидив опухолей, что говорит о том, что наиболее эффективные терапии происходят их терапий, направленных на изоляцию опухолевых стволовых клеток. Относительно молекулярных характеристик и регулирующих механизмов, контролирующих биологию опухолевых стволовых клеток известно мало. Глиома является одним из типов опухолей, в которых важную роль играют опухолевые стволовые клетки, так называемые стволовые клетки глиомы или иницирующие клетки глиомы (glioma initiating cell, GIC).

GIC характеризуются высокоонкогенным потенциалом, способностью к самообновлению и способностью дифференцироваться во множество клеточных линий. Количество в опухоли клеток, подобных стволовым клеткам, регулируется их способностью к самовосстановлению. GIC и в целом стволовые клетки злокачественных опухолей претерпевают симметричные и ассиметричные деления, посредством которых стволовые клетки образуют две идентичные копии или копию стволовой клетки и копию более дифференцированной клетки (ассиметричное деление). Способность к самовосстановлению стволовой клетки злокачественной опухоли регулируется балансом между симметричными и ассиметричными делениями и дерегуляция механизмов, контролирующих указанное самообновление, скорее всего, участвует в возникновении опухоли. Глиома является наиболее распространенной первичной опухолью мозга и может быть классифицирована по четырем клиническим степеням в зависимости от гистологии и прогноза. Глиомы IV степени (мультиформная

глиобластома) являются чрезвычайно агрессивными и устойчивыми как к радиотерапии, так и к химиотерапии. Несмотря на прогресс понимания молекулярных механизмов, участвующих в генезе и прогрессии глиомы, прогноз и лечение данного типа опухолей остаются неэффективными. Предпочтительным лечением глиом является хирургическое вмешательство. Тем не менее, хирургическое лечение, как правило, сопровождается фармакологическим адъювантным лечением или лучевой терапией. Предпочтительные лекарственные средства для лечения глиомы включают комбинацию, которая называется PCV, включающую прокарбазин, CCNU (ломустин) и винкристин, темозоломид в комбинации с лучевой терапией.

Считается, что GIC ответственны за возникновение, распространение и рецидив опухолей, что говорит о том, что наиболее эффективные терапии будут получены на основе терапий, направленных на изоляцию стволовых клеток глиомы. Опухоль не будет ликвидирована до тех пор, пока не будут уничтожены GIC.

Следовательно, необходимо иметь альтернативные способы лечения, которые предотвратят недостатки известных в данной области способов лечения, и которые эффективно уничтожат GIC.

Сущность изобретения

В первом аспекте изобретение относится к агенту, ингибирующему экспрессию и/или активность цитокина IL-6-типа для лечения заболеваний, связанных с нежелательной клеточной пролиферацией.

В другом аспекте, изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество ингибирующего агента по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель для лечения заболеваний, связанных с нежелательной клеточной пролиферацией.

В другом аспекте, изобретение относится к *in vitro* способу для идентификации соединений, способных блокировать/ингибировать клеточную пролиферацию опухолевых клеток, индуцированную цитокином IL-6-типа или его функционально эквивалентным вариантом, включающему стадии:

(i) контакта клеток, экспрессирующих рецептор для цитокина IL-6-типа с цитокином IL-6-типа и соединением-кандидатом, и

(ii) идентификации этих соединений, блокирующих клеточную пролиферацию указанной клетки.

В другом аспекте изобретение относится к *in vitro* способу диагностики заболеваний, связанных с нежелательной клеточной пролиферацией в объекте или относится к способу определения склонности объекта к указанному заболеванию, связанному с нежелательной клеточной пролиферацией, или относится к способу определения стадии или тяжести указанного заболевания, связанного с нежелательной клеточной пролиферацией в объекте, или относится к способу мониторинга воздействия терапии, введенной субъекту с указанным заболеванием, связанным с нежелательной клеточной пролиферацией, в котором количественная оценка уровней экспрессии гена, кодирующего цитокин IL-6-типа, или белка, кодируемого указанным геном, или функционально эквивалентным вариантом указанного белка в биологическом образце из указанного объекта, в котором увеличение экспрессии гена, кодирующего цитокин IL-6-типа или белка, кодируемого указанным геном или функционально эквивалентного варианта указанного белка, относительно экспрессии гена, кодирующего цитокин IL-6-типа, или белка, кодируемого указанным геном, или функционально эквивалентного варианта указанного белка в контрольном образце, свидетельствует о заболевании, связанном с нежелательной клеточной пролиферацией, или о большей склонности указанного объекта к заболеванию, связанному с нежелательной клеточной пролиферацией или о нереспонсивности к терапии, введенной указанному объекту.

В другом аспекте, изобретение относится к применению набора, содержащего реактивы для количественной оценки уровней экспрессии гена, кодирующего цитокин IL-6-типа, или белка, кодируемого указанным геном, или функционально эквивалентного варианта указанного белка для диагностики злокачественного новообразования в объекте или для определения склонности объекта к указанному злокачественному новообразованию, или для определения стадии или тяжести указанного злокачественного новообразования в объекте, или для предсказания вероятности выживания и/или средней продолжительности жизни объекта, страдающего от указанного злокачественного новообразования, или для мониторинга воздействия терапии, введенной объекту с указанным злокачественным новообразованием, в котором реактивы детектируют увеличение экспрессии указанного гена или указанного белка или его функционально эквивалентного варианта относительно контрольного образца, в том случае, когда указанный объект может страдать от заболевания, связанного с нежелательной клеточной пролиферацией, или у него имеется большая предрасположенность к указанному заболеванию, связанному с нежелательной

клеточной пролиферацией, или он демонстрирует бóльшую тяжесть указанного заболевания, или вводимая терапия не является эффективной.

Краткое описание фигур

Фигура 1. Воздействие TGF β на самообновление GIC, полученных из пациентов. (А) Репрезентативные изображения РСТС и нейросфер GBM, полученных из образцов 3 различных пациентов с GBM (GBM1, GBM2, GBM3). (В) *Мусаси-1 (Msi-1)*, *Sox2*, *Нестин* и β -актин определяли с помощью ПЦР-ВР анализа РСТС и нейросфер 3 образцов человеческого GBM.

(С) 100000 нейросфер (*nsph.*) или клеток РСТС, полученных из образцов опухолей GBM1, GBM2 и GBM3 в каждом случае интракраниально инокулировали в трех мышей Balbc nu/nu. В каждой мыши на 30-40 день осуществляли исследования с магнитно-резонансной томографией (МРТ). Изображения представляют пример мышей инокулированных нейросферой или клетками РСТС, полученными из GBM1. Мышей взвешивали дважды в неделю. На графике представлены мыши, инокулированные клетками, полученными у GBM1. (D и E) Клетки нейросфер указанных GBM инкубировали в отсутствие факторов роста со 100 пМ TGF β 1 и/или 2 мкМ ингибитора T β RI в течение 7 дней и определяли количество вновь образованных нейросфер (D) и общее количество клеток (E). (F) Репрезентативные изображения нейросфер GBM1, обработанных как указано в D и E.

Фигура 2. Иммуногистохимия указанных маркеров в нейросферах, полученных из GBM1, и в нейросферах, дифференцированных в сыворотке, полученной из GBM1.

Фигура 3. TGF β индуцирует экспрессию LIF в нейросферах РСТС и GBM. (А) Клетки РСТС из 11 образцов указанных GBM (GBM1-11) обрабатывали 100 пМ TGF β 1 в течение 3 часов в среде без сыворотки или оставляли необработанными, и уровни экспрессии LIF определяли посредством количественной ПЦР-РВ. β -актин определили в качестве внутреннего контроля для нормализации. (В) Клетки нейросфер GBM обрабатывали как в А, а уровни экспрессии LIF определяли с помощью количественной ПЦР-РВ как в А. (С) Нейросферы GBM инкубировали с 100 пМ TGF β 1 и/или 2 мкМ ингибитором T β RI в течение 3 часов в среде без сыворотки и уровни мРНК LIF определяли с помощью количественной ПЦР-РВ как в А. (D) Нейросферы GBM1 инкубировали с 100 пМ TGF β 1, TGF β 2 и TGF β 3 в течение 3 часов в среде без сыворотки

и уровни мРНК LIF определяли с помощью количественной ПЦР-РВ, как в А. (Е) Уровни секретируемого белка LIF определяли посредством ИФА в нейросферах GBM1 после 48 часов обработки со 100 пМ TGF β 1.

Фигура 4. TGF β индуцирует транскрипцию LIF посредством активированного комплекса Smad. (А) Схемы индикаторных конструкторов люцифераза-LIF. (В) Клетки глиомы A172 трансфецировали индикаторным конструктором люцифераза-LIF (-534/+32), (-276/+32), (-275/+32) mutSBE или (-73/+32). Через 16 часов после трансфекции клетки обрабатывали 100 пМ TGF β 1 в течение 20 часов и анализировали активность люциферазы. (С) Клетки U373MG обрабатывали 100 пМ TGF β 1 в течение 3 часов, и осуществляли ChIP-анализы с указанными антителами и указанными праймерами ПЦР. (D, E) Уровни LIF определяли с помощью количественной ПЦР-РВ в U373MG (D) или нейросферах GBM (E), обработанных 100 пМ TGF β 1 в течение 3 часов после сайленсинга, опосредованного миРНК указанных представителей указанного семейства Smad. Вестерн-блоттинг осуществляли с помощью антител, специфичных для Smad или количественной ПЦР-РВ Smad4. β -актин определили в качестве внутреннего контроля для нормализации.

Фигура 5. TGF β индуцирует сигнальный путь LIF-JAK-STAT в нейросферах GBM, полученных из пациентов. (А) Уровни p-STAT3 и STAT3 определяли Вестерн-блоттингом нейросфер образца GBM1, обработанного 20 нг/мл LIF в течение указанных периодов времени. (В) Нейросферы образца GBM1 обрабатывали 20 нг/мл LIF и/или 0,5 мкМ Р6 в течение 15 минут и уровни общих p-STAT3 и STAT3 определяли с помощью Вестерн-блоттинга. (С) Нейросферы образца GBM1 обрабатывали 100 пМ TGF β 1 или 2 мкМ ингибитором T β RI в течение 4 часов в отсутствии EFG и FGF, а уровни p-STAT3, STAT3, p-Smad2, Smad2 и α -тубулина определяли Вестерн-блоттингом. (D) Нейросферы образца GBM1 обрабатывали 100 пМ TGF β 1 или 2 мкМ ингибитором T β RI или блокирующим антителом к LIF в течение 4 часов в отсутствии EFG и FGF, а уровни общих p-STAT3 и STAT3 определяли Вестерн-блоттингом.

Фигура 6. LIF опосредует увеличение самообновления GIC посредством TGF β . (А, В) Клетки нейросфер GBM1, GBM2 и GBM3 обрабатывали 100 пМ TGF β 1, 20 нг/мл LIF и/или нейтрализующим антителом к LIF и 0.5 мкМ Р6 в отсутствии EGF и FGF и определяли количество новообразованных нейросфер (А) или общее количество клеток (В). (С) Репрезентативные изображения нейросфер GBM1, обработанных как указано в А и В.

Фигура 7. TGF β и LIF предотвращают дифференцировку нейросфер GBM. (A) Иммуногистохимию указанных белков осуществляли в нейросферах полученных из GBM1, обработанных 100 пМ TGF β 1 или 20 нг/мл LIF в течение 7 дней в отсутствие факторов роста и в последние 3 дня на стеклах, покрытых поли-L-лизинном. (B) Уровни мРНК Мусаси-1 (Msi-D), Sox2 и Нестин определяли в нейросферах GBM1 через 7 дней после указанных обработок без факторов роста. В качестве внутреннего контроля для нормализации использовали уровни 18S РНК.

Фигура 8. Воздействие TGF β на способность самообновления нормальных человеческих нейропредшественников. (A) Иммуногистохимию указанных маркеров осуществляли в человеческих нефросферах-нейропредшественниках. (B) Нейросферы образца GBM1 и человеческие нейропредшественники инкубировали с указанными представителями 100 пМ семейства TGF β в течение 3 часов и определяли уровни мРНК LIF. (C, D) Клетки нейросфер нормальных человеческих нейропредшественников инкубировали в тех же условиях, которые были описаны выше в фигуре 1D в присутствии 100 пМ TGF β 1 или 20 нг/мл LIF в течение 7 дней и определяли количество новообразованных нейросфер (C) и общее количество клеток (D).

Фигура 9. Экспрессия LIF в опухолях-глиомах человека. (A) Транскрипты LIF, TGF β 2, Мусаси-1 (Msi-D), Sox2 и Нестин определяли анализом количественной ПЦР-РВ в 39 образцах, полученных из пациентов-людей с глиомой. (B) Корреляции между LIF и TGF β 2, Мусаси-1 (Msi-1), Sox2 или Нестин. Коэффициент ранговой корреляции Спирмена (Rho), двухсторонняя значимость. (C) TGF β способствует самообновлению GSC посредством индукции LIF, что приводит к увеличению количества в опухолевой массе группы клеток, подобных стволовым.

Фигура 10. Уровни мРНК LIF у пациентов с глиомой связаны со средней продолжительностью жизни. Кривые Каплана-Мейера демонстрируют, что общее выживание пациентов с глиомой с положительно регулируемыми уровнями мРНК LIF, ≥ 2 раза, значительно ниже, чем у остальной части пациентов ($p = 7,2E-8$) согласно логранговому критерию. Данные получены из программы репозитория молекулярных данных неоплазий мозга (англ. REpository for Molecular BRAin Neoplasia DaTa (REMBRANDT)) Национального института рака.

Фигура 11. Уровни мРНК LIF у пациентов с глиобластомой (GBM) связаны со средней продолжительностью жизни. Кривые Каплана-Мейера показывают, что общее выживание пациентов с GBM с положительно регулируемыми уровнями мРНК LIF, ≥ 9

раза, значительно ниже, чем у остальной части пациентов ($p = 6,9E-4$) согласно логранговому критерию. Данные получены из программы репозитория молекулярных данных неоплазий мозга (англ. REpository for Molecular BRAin Neoplasia DaTa (REMBRANDT)) Национального института рака.

Фигура 12. Некоторые пациенты с определенными типами опухолей имеют аббератно высокие уровни LIF. Уровни мРНК LIF в различных типах опухолей показали, что некоторые пациенты (кружки) имеют абберантно высокие уровни LIF. Данные получены у биоинформатической команды «GeneSapiens» (www.genesapiens.org). Обозначения номеров: 1) пре-B-клеточный острый лимфобластный лейкоз (В-АЛЛ); 2) пре-T-клеточный острый лимфобластный лейкоз (Т-АЛЛ); 3) В-клеточный хронический лимфолейкоз (В-ХЛЛ); 4) острый миелоидный лейкоз (ОМЛ); 5) плазмоклеточный лейкоз; 6) миелома; 7) В-клеточная лимфома; 8) лимфома Беркитта; 9) Т-клеточная лимфома; 10) хондросаркома; 11) остеосаркома; 12) саркома Юинга; 13) синовиальная саркома; 14) лейомиосаркома; 15) рабдомиосаркома; 16) липосаркома; 17) саркома, без дополнительных уточнений (БДУ); 18) кожная плоскоклеточная карцинома; 19) меланома; 20) глиома; 21) нейробластома; 22) злокачественная опухоль оболочек периферических нервов (ЗООПН); 23) хордома; 24) плоскоклеточная карцинома полости рта; 25) плоскоклеточная карцинома гортаноглотки; 26) карцинома околоушной железы; 27) аденокарцинома легкого; 28) крупноклеточный рак легкого; 29) мелкоклеточный рак легкого; 30) плоскоклеточная карцинома легкого; 31) карциноидная опухоль легкого; 32) мезотелиома; 33) аденокарцинома пищевода; 34) аденокарцинома желудка; 35) желудочно-кишечная стромальная опухоль (ЖКСО); 36) аденокарцинома тонкой кишки; 37) колоректальная карцинома; 38) рак печени; 39) рак поджелудочной железы; 40) опухоли надпочечников; 41) карцинома щитовидной железы; 42) онкоцитома почки; 43) рак почки; 44) нефробластома; 45) рак мочевого пузыря; 46) семинома яичка; 47) несеминома яичка; 48) аденокарцинома предстательной железы; 49) протоковый рак молочной железы; 50) лобулярный (дольковый) рак молочной железы; 51) медуллярный рак молочной железы; 52) другой рак молочной железы; 53) карцинома молочной железы, БДУ; 54) светлоклеточная карцинома яичников; 55) эндометриоидный рак яичников; 56) герминома яичников; 57) слизеобразующая карцинома яичника; 58) серозная карцинома яичников; 59) аденокарцинома яичников, без дополнительного уточнения (БДУ); 60) другая опухоль яичника; 61) аденокарцинома брюшины; 62) саркома матки; 63) аденокарцинома матки; 64) плоскоклеточная карцинома матки; 65)

мюллерова опухоль матки; 66) аденокарцинома шейки матки; 67) плоскоклеточная карцинома шейки матки; 68) карцинома вагины/вульвы.

Подробное описание изобретения

Терапевтические способы изобретения

К своему удивлению авторы настоящего изобретения обнаружили что, цитокин IL-6-типа, более конкретно LIF, вовлечен в активацию каскада JAK-STAT, опосредованного TGF β , что, таким образом, приводит к индукции процесса клеточной пролиферации и к увеличению количества опухолевых стволовых клеток (злокачественных опухолевых стволовых клеток). Основываясь на этом факте, авторы открыли новый терапевтический путь для лечения заболеваний, связанных с нежелательной клеточной пролиферацией, например, таких как злокачественные новообразования, а особенно для лечения злокачественных новообразований, вызванных высокой активностью сигнального пути JAK-STAT, где указанная терапия основана на применении ингибиторов цитокинов IL-6-типа. Идентификация LIF в качестве элемента, лежащего ниже TGF β , при активации JAK-STAT дополнительно делает возможным более эффективное ингибирование указанного каскада JAK-STAT, потому что предотвращает активацию не только при активации посредством TGF β , но также при активации посредством других стимулов, таких как интерлейкины, эритропоэтин, гормон роста пролактин и т.п.

Следовательно, в одном аспекте, изобретение относится к агенту, ингибирующему экспрессию и/или активность цитокинов IL-6-типа для лечения заболеваний, связанных с нежелательной клеточной пролиферацией.

Не желая быть связанными теорией, считаем, что эффект LIF и его ингибиторов на пролиферацию опухолей лежит в способности LIF промотировать пролиферацию опухолевых стволовых клеток. Обработка ингибиторами LIF будет, следовательно, особенно требоваться в тех опухолях, в которых есть высокая экспрессия цитокина IL-6-типа, а более конкретно LIF, а также будет представлять интерес обработка опухолей устойчивых к химиотерапии, учитывая известную способность опухолевых стволовых клеток быть устойчивыми к химиотерапии. И наконец, учитывая то, что опухолевые стволовые клетки, по всей видимости, ответственны за рецидивы, применение ингибиторов LIF для лечения заболеваний, связанных с нежелательной клеточной пролиферацией, будет особенно подходящим для предотвращения возникновения

рецидивов.

Следовательно, в первом аспекте изобретение относится к агенту, ингибирующему экспрессию и/или активность цитокинов IL-6-типа для лечения заболеваний, связанных с нежелательной клеточной пролиферацией.

В другом аспекте, изобретение относится к способу лечения заболеваний, связанных с нежелательной клеточной пролиферацией, включающему введение агента, ингибирующего экспрессию и/или активность цитокина IL-6-типа. В другом аспекте изобретение относится к агенту, ингибирующему экспрессию и/или активность цитокина IL-6-типа для производства фармацевтической композиции для лечения заболеваний, связанных с нежелательной клеточной пролиферацией. В контексте настоящего изобретения, «цитокин IL-6-типа» понимается как цитокин-представитель семейства IL-6, которое включает IL-6, IL-11, лейкемический ингибирующий фактор (LIF), онкостатин М (OSM), кардиотрофин-1 (CT-1), цилиарный нейротрофический фактор (CNTF), и кардиотрофин-подобный цитокин (CLC), активирующий сигнальный путь JAK-STAT. Эти цитокины участвуют в том же рецепторном комплексе, в котором обычным компонентом является субъединица рецептора гликопротеина 130 (gp130).

Следовательно, в конкретном воплощении изобретения, цитокин IL-6-типа выбирают из LIF, IL-6, IL-11, онкостатина М, кардиотрофина-1, CNTF и CLC. В еще одном конкретном воплощении, цитокином IL-6-типа является LIF.

В контексте настоящего изобретения «ингибирующий агент» понимается как любое вещество или соединение, которое способно предотвратить или блокировать транскрипцию и трансляцию гена, кодирующего цитокин IL-6-типа (т.е. предотвратить или блокировать экспрессию указанного гена), или которое способно предотвратить осуществление белком, кодируемым указанным геном, своей функции (активности), т.е. предотвратить способность цитокина IL-6-типа индуцировать активацию сигнального пути JAK-STAT. Анализы для определения является ли соединение агентом, ингибирующим цитокин IL-6-типа, хорошо известны в данной области. Например, Mezt S. et al. (J. Biol. Chem, 2007, vol. 282:1238-1248) описывают анализ, основанный на способности ингибитора блокировать экспрессию репортерного гена, который находится под контролем промотора, чувствительного к цитокину IL-6. В конкретном случае LIF, анализы для идентификации ингибирующих агентов включают ингибирование дифференцировки клеток М1 мышинового миелоидного лейкоза в отсутствии LIF (WO2005/30803), ингибирование стимуляции высвобождения кальция из

клеток Jurkatt (US5980894), измерение фосфорилирования STAT-3 цитокином IL-6-типа (см. например, Пример 2, раздел 2.4 примеров настоящего описания) и т.п.

В качестве иллюстрации, ингибирующими экспрессию LIF агентами, подходящими для применения в настоящем изобретении, являются, например, антисмысловыми олигонуклеотидами, интерферирующими РНК (миРНК), каталитические РНК или специфические рибозимы, РНК с активностью ловушки, т.е. со способностью специфически связывать фактор (как правило, белковый) важный для экспрессии гена, и т.п. Кроме того, ингибирующими агентами, способными предотвращать осуществление функции белком, кодируемым указанным геном, кодирующим цитокин IL-6-типа, являются, например, ингибиторные пептиды белка, антитела, направленных конкретно против тех эпитопов белка, которые необходимы для осуществления его функции, или антитела против рецепторов цитокина IL-6-типа, и т.п.

Следовательно, в конкретном воплощении изобретения, ингибирующий агент выбирают из группы, состоящей из миРНК, антисмысловых олигонуклеотидов, специфических рибозимов, антител, полипептидов и ингибиторов рецептора цитокина IL-6-типа.

миРНК

Малые интерферирующие РНК, или миРНК (англ. siRNA), являются агентами, которые способны ингибировать экспрессию гена-мишени посредством РНК-интерференции. миРНК могут быть синтезированы химически, могут быть получены посредством *in vitro* транскрипции или могут быть синтезированы *in vivo* клеткой-мишенью. миРНК, как правило, состоят из двухцепочечной РНК длиной от 15 до 40 нуклеотидов, которая может содержать выступающую область на 3' и/или 5' конце длиной от 1 до 6 нуклеотидов. Длина выступающей области не зависит от общей длины молекулы миРНК. миРНК действует посредством деградации или пострансляционного сайленсинга мессенджера-мишени.

миРНК может называться кшРНК (короткая шпилечная РНК, англ. shRNA), которая отличается тем, что антипараллельные цепи, образующие миРНК, соединены петлей или шпилечной областью. Эти миРНК являются соединениями короткой антисмысловой последовательности (от 19 до 25 нуклеотидов), за которой следует петля длиной от 5 до 9 нуклеотидов, за которой следует смысловая цепь. кшРНК могут кодироваться плазмидами или вирусами, особенно ретровирусами, а, более конкретно, ретровирусами и могут находиться под контролем промоторов, таких как промотор U6

РНК-полимеразы III.

миРНК изобретения по существу являются гомологичными мРНК гена, кодирующего цитокин IL-6-типа или геномной последовательности, кодирующей указанный белок. «По существу является гомологичным» понимается как обладание последовательностью, которая в достаточной степени комплементарна или похожа на целевую мРНК, так что миРНК способна вызвать деградацию последней посредством РНК-интерференции. миРНК, которые подходят для вызова указанной интерференции включают миРНК, образованные из РНК, а также миРНК содержащие различные химические модификации, такие как:

- миРНК, в которой связи между нуклеотидами отличаются от тех, которые обнаружены в природе, примером являются фосфоротиоатные связи.
- конъюгаты цепи РНК с функциональным реактивом, таким как флюорофор.
- Модификации концов РНК-цепей, особенно 3' конца, посредством модификации различными функциональными группами гидроксила в позиции 2'.
- Нуклеотиды с модифицированными сахарами, такие как О-алкилированные остатки в позиции 2', примером является 2'-О-метилрибоза- р 2'-О-фторрибоза.
- Нуклеотиды с модифицированными основаниями, такие как галогенированные основания (например, 5-бromoурацил и 5-йодурацил), алкилированные основания (например, 7-метилгуанозин).

миРНК и кшРНК изобретения могут быть получены с помощью множества методов, известных специалисту в данной области. Например, миРНК может быть химически синтезирована из рибонуклеозидов, защищенных фосфорамидитами в обычном ДНК/РНК-синтезаторе. В ином случае, миРНК может быть получена рекомбинантным способом из плазмиды и вирусного вектора, в случае которых область, кодирующая цепь или цепи, образующие миРНК, находится под функциональным контролем промоторов РНК-полимеразы III. В клетках РНаза Dicer процессирует кшРНК в функциональную миРНК.

Область нуклеотидной последовательности, которая берется за основу для разработки миРНК, не ограничена и может содержать область кодирующей последовательности (между старт-кодоном и последним кодоном) или может, в ином случае, содержать последовательности 5' или 3' нетранслируемой области, предпочтительно длиной от 25 до 50 нуклеотидов и в любой позиции в 3' направлении относительно старт-кодона. Один из способов разработки миРНК включает

идентификацию мотивов AA(N₁₉)TT в которых N может быть любым нуклеотидом в последовательности, кодирующей цитокин IL-6-типа, и отбор тех из них, которые имеют высокое содержание G/C. Если указанный мотив не найдет, возможно идентифицировать мотив NA(N₂₁), в котором N может быть любым нуклеотидом.

Антисмысловые олигонуклеотиды

В дополнительном аспекте изобретение относится к применению выделенных «антисмысловых» нуклеиновых кислот для ингибирования экспрессии, например, для ингибирования транскрипции и/или трансляции нуклеиновой кислоты, кодирующей цитокин IL-6-типа, активность которого ингибируется. Антисмысловые нуклеиновые кислоты могут связывать потенциальную лекарственную мишень посредством обычной комплементарности оснований, или, например, в случае связывания двухцепочечных ДНК, через специфические взаимодействия в большой борозде двойной спирали. Эти способы, в целом, относятся к диапазону методов используемых, как правило, в данной области, и включают любой способ, который основан на специфическом связывании с олигонуклеотидными последовательностями.

Антисмысловой конструкт настоящего изобретения может быть доставлен, например, экспрессирующей плазмидой, которая при транскрипции в клетке, продуцирует РНК комплементарную, по меньшей мере, одной части клеточной мРНК, кодирующей цитокин IL-6-типа. В ином случае, антисмысловой конструкт является олигонуклеотидным зондом, который получают *ex vivo* и который, если ввести его в клетку, ингибирует экспрессию посредством гибридизации с мРНК и/или геномными последовательностями целевой нуклеиновой кислоты. Такие олигонуклеотидные зонды предпочтительно являются модифицированными олигонуклеотидами, которые устойчивы к эндогенным нуклеазам, например, экзонуклеазам и/или эндонуклеазам, и которые, следовательно, стабильны *in vivo*. Примерными молекулами нуклеиновой кислоты для применения в качестве антисмысловых олигонуклеотидов являются фосфорамидатные, фосфотионатные и метилфосфонатные аналоги ДНК (также см. документы пат. США 5,176,996; 5,264,564; и 5,256,775). Общие подходы при конструировании олигомеров, полезных при антисмысловой терапии, дополнительно были рассмотрены, например, в Van der Krol et al, BioTechniques 6: 958-976, 1988; and Stein et al., Cancer Res 48: 2659-2668, 1988.

Что касается антисмысловой ДНК, то предпочтительными являются области олигодеоксирибонуклеотидов, полученные из сайта инициации трансляции, например,

между -10 и +10 гена-мишени. Антисмысловые подходы включают разработку олигонуклеотидов (либо ДНК, либо РНК), которые комплементарны мРНК, кодирующей полипептид-мишень. Антисмысловые олигонуклеотиды будут связывать транскрипты мРНК и предотвращать трансляцию. Полная комплементарность не требуется, хотя и является предпочтительной. В случае двухцепочечных антисмысловых нуклеиновых кислот, одиночная цепь двухцепочечных ДНК, или может быть проверено образование трехцепочечных ДНК. Емкость гибридизации будет зависеть от степени комплементарности и от длины антисмысловой нуклеиновой кислоты. Как правило, чем более длинная нуклеиновая кислота гибридизуется, тем больше ошибок спаривания с РНК она может содержать, при этом формируя стабильный дуплекс (или триплекс, который может быть образован в зависимости от обстоятельств). Специалист в данной области может определить допустимую степень ошибок спаривания посредством применения стандартных процессов для определения температуры плавления комплекса гибридизации. Олигонуклеотиды, которые комплементарны 5' концу мРНК, например, нетранслируемой 5' последовательности вплоть до и включая старт-кодон AUG, в целях ингибирования трансляции должны функционировать так эффективно, насколько это возможно. Однако недавно было показано, что последовательности комплементарные нетранслируемым 3' последовательностям мРНК также являются эффективными при ингибировании трансляции мРНК (Wagner, Nature 372: 333, 1994). Следовательно, олигонуклеотиды, комплементарные либо 5', либо 3' нетранслируемым, некодирующим областям гена могут быть использованы в антисмысловом подходе для ингибирования трансляции данной РНК. Олигонуклеотиды, комплементарные 5' нетранслируемой области мРНК должны включать фрагмент, комплементарный старт-кодону AUG. Олигонуклеотиды, комплементарные кодирующим областям мРНК, являются менее эффективными ингибиторами трансляции, но они также могут быть использованы в соответствии с изобретением. Если антисмысловые нуклеиновые кислоты сконструированы для гибридизации с 5', 3' или кодирующей областью мРНК, то они должны иметь длину, по меньшей мере, шесть олигонуклеотидов, а предпочтительно иметь не меньше чем около 100 или больше, предпочтительно иметь длину не меньше чем около 50, 25, 17 или 10 нуклеотидов.

Предпочтительно, если вначале проводятся *in vitro* исследования для количественной оценки способности антисмысловых олигонуклеотидов ингибировать генную экспрессию. Предпочтительно, если в этих исследованиях используют контроли,

различающие между антисмысловым ингибированием генов и неспецифическими биологическими эффектами олигонуклеотидов. Предпочтительно, если в этих исследованиях сравнивают уровни РНК или целевого белка с уровнями внутреннего РНК- или белкового контроля. Результаты, полученные с помощью антисмысловых олигонуклеотидов, могут быть сравнены с результатами, полученными с помощью контрольных олигонуклеотидов. Предпочтительно, если контрольный олигонуклеотид имеет ту же длину, что и анализируемый олигонуклеотид, и если олигонуклеотидная последовательность отличается от антисмысловой последовательности не больше, чем необходимо для предотвращения специфической гибридизации к последовательностью-мишенью.

Олигонуклеотидные последовательности могут быть ДНК или РНК или химерными смесями или модифицированными производными или их версиями, одноцепочечными или двухцепочечными. Олигонуклеотид может быть модифицирован в группе основания, в группе сахара, или в фосфатном каркасе, например, для улучшения стабильности молекулы, гибридизации и т.п. Олигонуклеотиды могут включать другие связывающие группы, такие как пептиды (например, для направления их на рецепторы клетки-хозяина), или агенты для создания более легкого транспорта через клеточную мембрану (см. например, Letsinger et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 6553-6556, 1989; Lemaitre et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 648-652, 1987; Публикация PCT No. WO88/09810) или через гематоэнцефалический барьер (см., например, публикацию PCT No. WO89/10134), расщепляющие агенты, переключаемые гибридизацией (см., например, Krol et al., BioTechniques 6: 958-976, 1988), интеркалирующие агенты (см., например, Zon, Pharm. Res. 5: 539-549, 1988). Для этой цели, олигонуклеотид может быть конъюгирован с другой молекулой, например, пептидом, переключаемым гибридизацией перекрестносшивающим агентом, агентом-переносчиком, расщепляющим агентом, переключаемым гибридизацией, и т.п.

Антисмысловые олигонуклеотиды могут содержать, по меньшей мере, одно модифицированное основание, которое выбирают из группы, включающей, без ограничения перечисленным, 5-фторурацил, 5-бром урацил, 5-хлорурацил, 5-йодурацил, гипоксантин, ксантин, 4-ацетилцитозин, 5-(карбоксигидроксиэтил)урацил, 5-карбоксиметиламинометил-2-тиоурдин, 5-карбоксиметиламинометилурацил, дигидроурацил, бета-D-галактозилквеозин, инозин, N6-изопентениладенин, 1-метилгуанин, 1-метилюридин, 2, 2-диметилгуанин, 2-метиладенин, 2-метилгуанин, 3-

метилцитозин, 5-метилцитозин, N6-аденин, 7-метилгуанин, 5-метиламинометилурацил, 5-метоксиаминометил-2-тиоурацил, бета-D-маннозилквеозин, 5'-метоксикарбоксиметилурацил, 5-метоксиурацил, 2-метилтио-N6-изопентениладенин, урацил-5-оксиуксусная кислота (v), вибутоксозин, всевдоурацил, квеозин, 2-тоцитозин, 5-метил-2-тиоурацил, 2-тиоурацил, 4-тиоурацил, 5-метилурацил, метиловый эфир урацил-5-оксиуксусной кислоты, урацил-5-оксиуксусной кислоты (v), 5-метил-2-тиоурацил, 3-(3-амино-3-N-2-карбоксипропил)урацил, (аср3)w, и 2,6-диаминопурин.

Антисмысловой олигонуклеотид также может содержать, по меньшей мере, одну модифицированную сахарную группу, выбранную из группы, включающей, без ограничения перечисленным, арабинозу, 2-фторарабинозу, ксилулозу и гексозу. Антисмысловой олигонуклеотид также может содержать каркас, подобный нейтральному пептиду. Такие молекулы относятся к олигомерам пептид-нуклеиновой кислоты (ПНК), описанные например, в Perry-O' Keefe et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 14670, 1996, и в Eglom et al., *Nature* 365: 565, 1993. Преимущество олигомеров ПНК заключается в их способности связывать комплементарную ДНК способом, фактически независимым от ионной силы среды из-за нейтрального каркаса ДНК. В еще одном воплощении, антисмысловой олигонуклеотид содержит, по меньшей мере, один модифицированный фосфатный каркас, выбранный из группы, состоящей из фосфоротиоата, фосфородитиоата, фосфорамидотиоата, фосфорамидата, фосфордиамидата, метилфосфоната, алкилфосфотриэфира и формацеталя или его аналога.

В еще одном воплощении, антисмысловой олигонуклеотид является альфа-аномерным олигонуклеотидом. Альфа-аномерный олигонуклеотид образует специфические двухцепочечные гибриды, с комплементарной РНК в которой, в противоположность типичной антипараллельной ориентации, цепи являются параллельными друг другу (Gautier et al., *Nucl. Acids Res.* 15: 6625-6641, 1987). Олигонуклеотид является 2'-О-метилрибонуклеотидом (Inoue et al., *Nucl. Acids Res.* 15: 6131-6148, 1987) или химерным аналогом РНК-ДНК (Inoue et al., *FEBS Lett.* 215: 327-330, 1987).

Хотя могут быть применены антисмысловые олигонуклеотиды, комплементарные кодирующей области последовательности целевой мРНК, также может быть использована комплементарность к нетранслируемой транскрибируемой области.

В некоторых случаях, может быть трудно достичь внутриклеточных концентраций антисмысловой молекулы, достаточных для супрессии трансляции эндогенной мРНК. Следовательно, предпочтительным подходом является применение рекомбинантных ДНК-конструктов, в которых антисмысловой олигонуклеотид размещен под контролем сильного промотора полимеразы III или полимеразы II. Применение такого конструкта для трансфекции клеток-мишеней приведет к транскрипции достаточных количеств одноцепочечных РНК, которые будут образовывать комплементарные пары оснований с потенциальными целевыми лекарственными эндогенными транскриптами и будут, следовательно, предотвращать трансляцию. Например, вектор может быть введен так, чтобы при захвате клеткой с него началась транскрипция антисмысловой РНК. Такой вектор может оставаться эпизомальными или может быть интегрирован в хромосому, при этом он может транскрибироваться для получения требуемой антисмысловой РНК. Такие векторы могут быть сконструированы с помощью стандартных в данной области способов технологии рекомбинантных ДНК. Векторы могут быть вирусными плазмидами, или другими плазмидами, известными в данной области, используемыми для репликации и экспрессии в клетках млекопитающих. Экспрессия последовательностей кодирующих антисмысловую РНК может быть опосредована любым промотором, известным в данной области, который действует на клетки млекопитающих, предпочтительно на человеческие клетки. Такие промоторы могут быть индуцибельными или конститутивными. Такие промоторы включают, без ограничения перечисленным: промотор ранней области SV40 (Bernoist and Chambon, *Nature* 290: 304-310, 1981), промотор, содержащийся в 3' части длинного концевой повтора вируса саркомы Рауса (Yamamoto et al., *Cell* 22: 787-797, 1980), промотор тимидинкиназы герпес-вируса (Wagner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78: 1441-1445, 1981), регуляторные последовательности гена металлотионеина (Brinster et al., *Nature* 296: 39-42, 1982), и т.п. Любой тип плазмиды, космиды, YAC и вирусного вектора может быть применен для приготовления конструкта рекомбинантной ДНК, которая может быть введена напрямую в участок ткани.

Экспрессия гена-мишени в ином случае может быть выражена направлением комплементарных дезоксирибонуклеотидных последовательностей к регуляторной области гена (т.е. промотору и энхансеру) для образования тройных спиральных структур, предотвращающих транскрипцию гена в клетках-мишенях в организме (см., в

общих чертах, Helene, *Anticancer Drug Des*, 6(6): 569-84, 1991; Helene et al., *Ann. N. E. Acad. Sci.*, 660: 27-36, 1992; и Maher, *Bioassays* 14(12): 807-15, 1992).

Молекулы нуклеиновой кислоты, которые будут использоваться при образовании тройных спиралей для ингибирования транскрипции, предпочтительно являются одноцепочечными и образованы деоксирибонуклеотидами. Композиция оснований этих олигонуклеотидов должна усиливать образование тройных спиралей по правилам Хугстина для спаривания оснований, которые, как правило, требуют присутствия в известной степени больших участков пуринов или пиримидинов в цепи дуплекса. Нуклеотидные последовательности могут быть основаны на пиримидинах, которые дадут TAT и CGC в трех связанных цепях полученной тройной спирали. Богатые пиримидинами молекулы обеспечивают комплементарность оснований области, богатой одноцепочечными пуринами дуплекса в ориентации, параллельной указанной цепи. Более того, могут быть выбраны молекулы нуклеиновой кислоты, которые обогащены пуринами, например, которые содержат участок из остатков G. Эти молекулы образуют тройную спираль с двухцепочечной ДНК, которая обогащена GC-парами, в которых большинство пуриновых остатков расположены в одной цепи дуплекса-мишени, что приводит к образованию триплетов CGC тремя цепями триплета.

Потенциальные последовательности-мишени, которые могут быть выбраны для образования тройных спиралей в ином случае могут быть увеличены, образованием молекулы нуклеиновой кислоты, которая называется «шпилька». Молекулы в виде шпильки синтезируют в переменной 5'-3', 3'-5' форме, так что они образуют первую пару оснований с цепью дуплекса, а затем с другой цепью, устраняя необходимость присутствия довольно большого участка пуринов или пиримидинов в цепи дуплекса.

В некоторых воплощениях, антисмысловые олигонуклеотиды являются антисмысловыми морфолинами. Морфолины являются синтетическими молекулами, которые являются продуктами перепланирования естественной структуры нуклеиновых кислот. Как правило, длиной в 25 оснований, они связывают комплементарные РНК-последовательности стандартным спариванием оснований нуклеиновых кислот. Конструктивно говоря, разница между морфолинами и ДНК заключается в том, что хотя морфолины имеют стандартные основания нуклеиновых кислот, эти основания связаны с морфолиновыми кольцами, а не с деоксирибозными кольцами, и они связаны фосфородиамидатными группами, а не фосфатными. Переключение с анионных фосфатов на нейтральные фосфородиамидатные группы устраняет ионизацию в

нормальном физиологическом диапазоне pH, так что морфолины в клетках или организмах являются незаряженными молекулами. Морфолины не являются химерными олигомерами; целый каркас морфолина сделан из таких модифицированных субъединиц. Морфолины более часто применяют в виде одноцепочечных олигомеров, хотя гетеродуплексы морфолиновой цепи и комплементарной цепи ДНК могут быть использованы в комбинации с катионными реактивами с цитозольным распределением.

В отличие от многих антисмысловых структурных типов (например, фосфоротиодатов), морфолины не деградируют молекулы своих целевых РНК. Наоборот, морфолины действуют посредством «стерического несоответствия» связывая целевую последовательность в РНК и просто размещаясь на пути молекул, которые в ином случае взаимодействовали бы с РНК. Морфолиновые олигомеры широко применяют при исследовании роли конкретного транскрипта РНК в эмбрионе, таком как яйца, или эмбрионы данио-рерио, африканской шпорцевой лягушки (*Xenopus*), в цыплятах и в морских ежах, для получения «морфантных» (англ. "morphant") эмбрионов. С помощью подходящей системы распространения в цитозоле, морфолины являются эффективными в клеточной культуре.

Морфолины были разработаны «AVI BioPharma Inc.» как лекарственные средства под названием «NeuGenes». Их применяли на млекопитающих, в диапазоне от мышей до человека, и некоторые в настоящее время проходят проверку в клинических исследованиях.

Связываясь с 5'-нетранслируемой областью матричной РНК (мРНК), морфолины могут препятствовать прогрессии комплекса инициации рибосомы от 5' -кэпа до стартового кодона. Это предотвращает трансляцию кодирующей области транскрипта-мишени (так называемый «сайленсинг» генной экспрессии). Морфолины обеспечивают подходящую среду для сайленсинга экспрессии белка и информацию о том, как данное снижение изменяет клетки или организмы. Некоторые морфолины сайленсируют экспрессию настолько эффективно, что после деградации ранее существовавших белков, белки-мишени становятся неопределяемыми вестерн-блоттингом.

Морфолины также могут препятствовать стадиям процессирования пре-мРНК, как правило, препятствуя комплексам RNPnp, которые направляют сплайсинг от связывания с их мишенями в границах интронов в преРНК спирали. Предотвращение U1 связывания (на донорной стороне) или U2/U5 связывания (в полипуримидиновой группе и акцепторном сайте) может вызвать модифицированный сплайсинг, как правило,

приводящий к исключению зрелых экзонов мРНК. Управление некоторыми мишенями сплайсирования вызывает включение интронов, тогда как активация криптических сайтов сплайсинга может привести к частичному включению или исключению. U11/U12 RNP-мишени также могут быть заблокированы. Модификация сплайсинга может быть подходящим образом проанализирована с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) и она выглядит как миграция полосы после гель-электрофореза продуктов ОТ-ПЦР.

Морфолины также применяют для блокировки активности микроРНК, активности рибозимов, сайленсеров сплайсинга интронов и энхансеров сплайсинга. Функции U2 и U12 RNP ингибируются морфолинами. Морфолины направленные против «скользких» последовательностей РНК в пределах кодирующих областей белков могут индуцировать изменения в рамке считывания при трансляции. Активности морфолинов против данного множества мишеней предполагают, что морфолины могут быть использованы как основной многоцелевой инструмент для блокирования взаимодействий белков и нуклеиновых кислот с мРНК.

Примеры LIF-специфичных антисмысловых олигонуклеотидов описаны в Kamohara et al. (Int J Oncol, 2007, 30:977-983) и Cheng et al. (Biol Reprod, 2004, 70:1270-1276).

ДНК-ферменты

Другой аспект изобретения относится к применению ДНК-ферментов для ингибирования экспрессии генов, кодирующих цитокин IL-6-типа по изобретению. ДНК-ферменты включают некоторые из механистических характеристик как антисмысловой, так и рибозимной технологий. ДНК-ферменты разработаны так, чтобы они распознавали определенную целевую последовательность нуклеиновой кислоты, подобно антисмысловому олигонуклеотиду, однако, так же как и рибозимы, они являются каталитическими и специфически расщепляют целевую нуклеиновую кислоту.

В настоящее время существует два типа ДНК-ферментов, и оба они обнаружены Santoro и Joyce (см., например, пат. США 6,110,462). ДНК-фермент 10-23 содержит петлевую структуру, соединяющую два плеча. Два плеча обеспечивают специфичность путем распознавания определенной целевой последовательности нуклеиновой кислоты, тогда как петлевая структура обеспечивает каталитическую функцию в физиологических условиях.

Вкратце, для разработки идеального ДНК-фермента, который специфически

распознает и расщепляет целевую нуклеиновую кислоту, специалист в данной области должен, во-первых, найти уникальную целевую последовательность. Это можно сделать таким же образом, как описано для антисмысловых олигонуклеотидов. Предпочтительно, если уникальная или фактически уникальная последовательность является G/C-богатой последовательностью примерно 18-22 нуклеотида в длину. Высокое содержание G/C помогает при обеспечении более сильного взаимодействия между ДНК-ферментом и целевой последовательностью. Когда синтезируется ДНК-фермент, специфичная антисмысловая распознающая последовательность, которая направляет фермент на мессенджер, разделяется так, что она содержалась в обоих плечах ДНК-фермента, а петля ДНК-фермента располагается между двумя специфическими плечами. Способы изготовления и введения ДНК-ферментов можно найти, например, в пат. США 6,110,462. Подобным образом, способы для доставки ДНК-рибозимов *in vitro* или *in vivo* включают способы для доставки РНК-рибозимов, как подробно объяснено выше. В ином случае, специалист в данной области поймёт, что подобно антисмысловому нуклеотиду, ДНК-ферменты необязательно могут быть модифицированы для улучшения стабильности и для улучшения устойчивости к деградации.

Антисмысловые РНК и ДНК, рибозимы, иРНК и молекулы тройных спиралей по изобретению могут быть получены любым известным в данной области способом синтеза молекул ДНК и РНК. Они включают хорошо известные в данной области способы химического синтеза олигонуклеотидов и олигорибонуклеотидов, такие как, например, химический синтез фосфорамидита в твердой фазе. В ином случае, молекулы РНК могут быть образованы с помощью *in vitro* и *in vivo* транскрипции последовательностей ДНК, кодирующих антисмысловые молекулы РНК. Такие последовательности могут быть включены во множество векторов, несущих подходящие промоторы РНК-полимеразы, такие как промоторы полимераз Т7 или SP6. В ином случае антисмысловые кДНК конструкторы конститутивно или индуцибельно синтезирующие антисмысловую РНК, в зависимости от используемого промотора, могут быть стабильно интродуцированы в клеточные линии. Более того, в молекулы нуклеиновой кислоты могут быть введены несколько известных модификаций как средство увеличения внутриклеточной стабильности и периода полужизни. Возможные модификации включают, без ограничения перечисленным, добавление фланкирующих рибонуклеотидных или деоксирибонуклеотидных последовательностей на 5'- и/или 3'-

концах молекулы или применение фосфоротиоата или 2'-О-метильных связей, а не фосфодиэстеразы в каркасе олигодеоксирибонуклеотида.

Рибозимы

Молекулы рибозимов, разработанных для каталитического расщепления мРНК-мишени также могут быть использованы для предотвращения трансляции мРНК, кодирующей цитокин IL-6-типа, активность которого ингибируется. Рибозимы являются ферментативными молекулами РНК, способными катализировать специфическое расщепление РНК. (Для обзора см., Rossi, Current Biology 4: 469-471, 1994). Механизм действия рибозима включает специфичную по последовательности гибридизацию молекулы рибозима с комплементарной РНК-мишенью, с последующим событием эндонуклеолитического расщепления. Композиция молекул рибозимов предпочтительно включает одну или несколько последовательностей комплементарных мРНК-мишени, и хорошо известной последовательности ответственной за расщепление мРНК или функционально эквивалентной последовательности (см., например, пат. США 5,093,246, включённый в данный документ ссылкой во всей полноте).

Хотя рибозимы, расщепляющие мРНК в распознаваемых сайт-специфически последовательностях, могут быть использованы для разрушения мРНК-мишеней, предпочтительным является применение молоточковых рибозимов. Расщепление мРНК молоточковыми рибозимами направляется фланкирующими областями, образующими комплементарные пары с основаниями мРНК-мишени. Предпочтительно, если мРНК-мишень имеет следующую последовательность из двух остатков: 5'-UG-3'. Конструирование и получение молоточковых рибозимов хорошо известно в данной области и полностью описано Haseloff and Gerlach, Nature 334: 585-591, 1988; и см. заявку РСТ WO89/05852, содержание которой включено в данный документ ссылкой. Последовательности молоточкового рибозима могут быть вставлены в стабильную РНК, такую как транспортная РНК (тРНК) для увеличения эффективности расщепления *in vivo* (Perriman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 6175-79, 1995; Feyter, and Gaudron, Methods in Molecular Biology, Vol. 74, Chapter 43, "Expressing Ribozymes in Plants", Edited by Turner, P. C, Humana Press Inc., Totowa, N.J.). Особенно широко известна в данной области экспрессия химерных рибозимов с тРНК, опосредуемая РНК-полимеразой III (см., Kawasaki et al., Nature 393: 284-9, 1998; Kuwabara et al., Nature Biotechnol. 16: 961-5, 1998; и Kuwabara et al., Mol. Cell. 2: 617-27, 1998; Koseki et al., J Virol 73: 1868-77, 1999; Kuwabara et al., Proc Natl Acad Sci USA 96: 1886-91, 1999; Tanabe et al., Nature 406: 473-

4, 2000). Как правило, существует несколько потенциальных участков расщепления молоточковых рибозимов в последовательности кДНК-мишени. Рибозим предпочтительно делают так, чтобы сайт распознавания расщепления располагался ближе к 5'-концу целевой мРНК - для увеличения эффективности и минимизации внутриклеточного накопления нефункциональных мРНК-транскриптов. Более того, применение любого сайта распознавания расщепления, расположенного в целевой последовательности, кодирующей различные С-концевые аминокислотные домены, например, короткой и длинной формы мишени, позволит избирательное получение любой формы мишени, и таким образом, позволит достичь избирательного эффекта по отношению к форме целевого генного продукта.

Рибозимы к генам обязательно содержат область гибридизации, комплементарную двух областям, каждая, по меньшей мере, длиной 5, а предпочтительно каждая из которых длиной 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов мРНК-мишени, такой как мРНК последовательности, представленная в любом из человеческих белков RAP80. Более того, рибозимы имеют очень специфичную эндонуклеазную активность, которая автокаталитически расщепляет кодируемую мРНК-мишень. Настоящее изобретение распространяется на рибозимы, гибридизующиеся с кодирующей мРНК, кодируемой целевым геном, таким как целевой ген-кандидат терапевтического лекарственного средства, следовательно, рибозимы, гибридизующиеся с кодирующей мРНК и расщепляющей ее так, чтобы она больше не была способна транслироваться для синтеза функционального полипептидного продукта.

Рибозимы, используемые в композициях настоящего изобретения, также включают РНК-эндорибонуклеазы (здесь и далее «рибозимы Чеха») такие как те, что обнаружены в природе в *Tetrahymena thermophila* (известные как IVS, или L-19 IVS RNA), которые подробно описаны Thomas Cech et al. (Zaug et al., Science 224:574-578, 1984; Zaug et al., Science 231: 470-475, 1986; Zaug et al., Nature 324: 429-433, 1986; опубликованная международная патентная заявка WO88/04300 University Patents Inc.; Been, et al., Cell 47: 207-216, 1986). Рибозимы Чеха имеют активный сайт с восемью парами оснований, которые гибридизуются с целевой последовательностью РНК, где позже происходит расщепление целевой РНК. Изобретение включает те рибозимы Чеха, которые в качестве целевых последовательностей имеют активный сайт с восемью парами оснований, которые представлены в целевом гене или в целевой нуклеотидной

последовательности.

Рибозимы могут быть созданы из модифицированных олигонуклеотидов (например, для улучшения стабильности, ориентации и т.п.) и они должны быть доставлены в клетку, экспрессирующую целевой ген *in vivo*. Предпочтительный способ доставки включает применение ДНК-конструкта «кодирующего» рибозим под контролем строго конститутивного промотора *pol* II или *pol* III, так чтобы трансфицированные клетки продуцировали достаточные количества рибозима для разрушения эндогенных мессенджеров-мишеней и ингибирования трансляции. Поскольку рибозимы являются каталитическими, в отличие от других антисмысловых молекул, для того чтобы быть эффективными им необходима более низкая внутриклеточная концентрация.

В некоторых воплощениях рибозим может быть разработан после определения участка последовательности достаточного, чтобы вызвать снижение эффективности посредством иРНК. Такая же часть последовательности позже может быть вставлена в рибозим. В этом аспекте изобретения, части рибозима или иРНК, которые направлены против генов, по существу являются одной и той же последовательностью длиной, по меньшей мере, 5, а предпочтительно, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 или больше смежных нуклеотидов целевой нуклеиновой кислоты, такой как нуклеиновая кислота любой из человеческих последовательностей RAP80. В длинной цепи целевой РНК для рибозимов не доступно значительно количество сайтов-мишеней, потому что они скрыты вторичной и третичной структурами (Birikh et al., Eur J Biochem 245: 1-16, 1997). Для преодоления проблемы доступности целевой РНК, компьютерные прогнозы вторичной структуры, как правило, используют для идентификации мишеней, которые наиболее вероятно будут одноцепочечными или будут иметь «открытую» конфигурацию (см. Jaeger et al., Methods Enzymol 183: 281-306, 1989). В других подходах применяют системный подход прогнозирования вторичной структуры, который включает большое число гибридизуемых молекул олигонуклеотидов-кандидатов (см. Milner et al., Nat Biotechnol 15: 537-41, 1997; and Patzel and Sczakiel, Mat Biotechnol 16: 64-8, 1998). Кроме того, в пат. США 6,251,588, содержащее которого включено в данный документ ссылкой, описаны способы для оценки последовательностей олигонуклеотидных зондов для прогнозирования потенциала гибридизации целевой последовательности нуклеиновой кислоты. Способ изобретения обеспечивает применение таких способов для отбора предпочтительных сегментов последовательности целевой мРНК, которая

спрогнозирована одноцепочечной, и более того, для гибкого применения ее или фактически идентичной целевой последовательности мРНК, предпочтительно содержащей около 10-20 последовательных нуклеотидов целевой мРНК, в дизайне как олигонуклеотидов иРНК, так и рибозимов по изобретению.

Ингибирующие пептиды

При использовании в данном документе термин «ингибирующий пептид» относится к тем пептидам, которые способны связывать цитокин IL-6-типа и ингибировать его активность как объяснялось выше, т.е. предотвращать способность цитокина IL-6-типа индуцировать активацию сигнального пути JAK-STAT.

Примером ингибирующего пептида являются ПЭГилированные варианты LIF, описанные White et al. (J.Biol.Chem., 2007, Proc.Natl. Acad. Sci. USA, 104:19357-19362).

Ингибиторы связывания цитокинов с рецепторами

При использовании в данном документе, выражение «ингибиторы связывания с цитокиновым рецептором» указывает на любое соединение, которое демонстрирует аффинность по отношению к цитокину IL-6-типа и, следовательно, способно секвестрировать цитокин и предотвращать его связывание с его физиологическими рецепторами. Ингибирующий полипептид предпочтительно является растворимой формой рецептора цитокина IL-6-типа (которая также называется рецептором-ловушкой). В конкретном случае LIF, возможно применение растворимого варианта рецептора LIF или LIF-связывающего белка (LBP), растворимая форма альфа рецептора LIF обнаружена в природе и было обнаружено, что она способна эффективно предотвращать воздействие LIF на метаболизм протеогликанов в эксплантах суставного хряща (Bell et al., 1997, J. Rheumatol. 24:2394).

Ингибирующие антитела

В контексте настоящего изобретения «ингибирующее антитело» понимается как любое антитело, которое способно связывать цитокин IL-6-типа или рецепторы указанных цитокинов IL-6-типа, предотвращая тем самым индукцию указанным цитокином IL-6-типа сигнального пути JAK-STAT. Антитела могут быть получены с помощью любых способов, которые известны специалисту в данной области. Таким образом, поликлональные антитела получают посредством иммунизации животного ингибируемым белком. Моноклональные антитела получают способами описанными Kohler, Milstein et al. (Nature, 1975, 256: 495). Поскольку антитела со способностью связывать цитокин IL-6-типа или со способностью связывать рецепторы указанных

цитокинов идентифицированы, те из них, которые способны ингибировать активность данного белка будут отобраны с помощью анализа идентификации ингибирующих агентов, описанного выше (Metz, 2007 упомянуто выше).

Следовательно, в более конкретном воплощении, антитела являются ингибирующими антителами, специфичными к указанному цитокину IL-6-типа или антителами, блокирующими рецепторы цитокина IL-6-типа.

Антитела, специфичные к LIF описаны в US 5,654,157A, 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, and D62. 3. 2).

В настоящем изобретении термин «антитело» должен интерпретироваться широко и включать поликлональные, моноклональные мультиспецифичные антитела и их фрагменты (F(ab')₂, Fab), и т.п. при условии, что они способны специфически распознавать представляющий интерес антиген, который в контексте настоящего изобретения является цитокином IL-6-типа или рецепторами указанных цитокинов IL-6-типа. Примерами антител, которые могут быть применены в контексте настоящего изобретения, являются, в качестве неограничивающих примеров, поликлональные антитела, моноклональные антитела, рекомбинантные антитела, химерные антитела, гуманизированные антитела, полностью человеческие антитела и т.п.

Поликлональные антитела являются изначально гетерогенными смесями молекул антител, полученными из сыворотки животного, которое было иммунизировано антигеном. Они включают моноспецифичные поликлональные антитела, полученные из гетерогенных смесей, например, посредством колоночной хроматографии с пептидами одиночного эпитопа представляющего интерес антигена. Моноклональное антитело является гомогенной популяцией антител, специфичных к одиночному эпитопу антигена. Эти моноклональные антитела могут быть получены посредством обычных методов, уже описанных, например, Kohler и Milstein [Nature, 1975; 256:495-397] или Harlow и Lane ["Using Antibodies. A Laboratory Manual" of E. Harlow and D. Lane, Editor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; 1998 (ISBN 978-0879695439)].

Химерное антитело является моноклональным антителом, сконструированным клонированием или рекомбинацией антител из различных видов животных. В типичной, но не ограничивающей, конфигурации изобретения, химерное антитело включает часть

моноклонального антитела, как правило, вариабельный фрагмент (Fv), включая участки для распознавания антигена и связывания, и другую часть, соответствующую человеческому антителу, как правило часть, включающую константную область и область, прилегающую к константной.

Полностью человеческое антитело является антителом или антителами, которые были получены в трансгенных мышах с человеческой иммунной системой или *in vitro* иммунизацией человеческих иммунных клеток (включая как генетическую, так и традиционную иммунизацию с или без адъювантов и с очищенным или неочищенным антигеном; или посредством способа экспонирования антигена иммунной системе) или из естественных/синтетических библиотек, полученных из человеческих иммунных клеток. Данные антитела могут быть получены и отобраны из трансгенных животных (например, из мышей), в которых были клонированы человеческие иммуноглобулиновые гены и которые были иммунизированы целевым антигеном (в настоящем изобретении указанным антигеном является цитокин IL-6-типа или рецепторы указанных цитокинов IL-6-типа). Данные антитела могут быть получены отбором человеческих одноцепочечных вариабельных фрагментов (scFv) или антигенсвязывающих фрагментов (Fab), представленных в фаговых дисплеях с последующим клонированием и прививанием в человеческое антитело или любым другим способом производства и выявления, который известен специалисту в данной области, библиотеки, полученной клонированием вариабельных фрагментов обеих цепей с последующей их комбинацией/мутацией для получения библиотек антител.

Гуманизированное антитело является моноклональным антителом, которое сконструировано путем клонирования и пересадки гипервариабельных участков (CDR) мышино-моноклонального антитела в человеческое антитело вместо его собственных гипервариабельных участков.

Кроме того, в контексте настоящего изобретения, термин «антитело» также включает варианты с измененным паттерном гликозилирования, а также гликозилированные и негликозилированные фрагменты антител, полученные из белка или с помощью рекомбинантной технологии, которые могут состоять из (i) вариабельных зон антитела, связанных друг с другом связывающим пептидом (scFv), (ii) вариабельной зоны вместе с константной CH1 тяжелой цепи (Fd) связанной с легкой цепью с помощью цистеинов или с помощью связывающих пептидов и дисульфидной связи (scFab), (iii) новых вариантов, таких как отдельные тяжелые цепи, или (iv) любые

модификации, произведенные с фрагментами антитела с целью сделать его более похожим, менее иммуногенным (гуманизированным) или более стабильным в биологических жидкостях и которое в контексте настоящего изобретения, обладает способностью предотвращать осуществление цитокинами IL-6-типа их функций (активности), т.е. предотвращать активацию сигнального пути JAK-STAT.

Как будет понятно специалисту в данной области, антитела могут быть получены обычными методами генетической инженерии и рекомбинантными методами, методами получения антител, методами экстракции и очистки из биологических жидкостей и тканей, или любым другим обычным методом для получения белков и антител, который широко известен специалистам в данной области. Наглядными неограничивающими примерами методов получения антител являются: методы иммунизации животных, включая животных, трансгенных по человеческим иммуноглобулиновым генам, получение моноклональных антител с помощью гибридом, получение библиотек антител, которые могут быть естественными, синтетическими или полученными из организмов, иммунизированных представляющим интерес антигеном и которые могут быть отобраны различными способами дифференциального дисплея (фаговый дисплей, рибосомальный дисплей и т.п.) и затем посредством методов генетической инженерии могут быть реконструированы и экспрессированы в векторах, разработанных для продуцирования рекомбинантных антител различных размеров, композиции и структуры. Обзор основных способов получения и очистки антител может быть найден, например, в:

- "Handbook of Therapeutic Antibodies", by S. D?bel. Editor: Wiley-VCH, 2007, Vol: I to III (ISBN 978- 3527314539);
- "Antibodies: Volume 1: Production and Purification" by G. Subramanian Ed., Editor: Springer, 1st Ed, 2004 (ISBN 978-0306482458);
- "Antibodies: Volume 2: Novel Technologies and Therapeutic Use", by G. Subramanian Ed., Editor: Springer, first edition, 2004 (ISBN 978-0306483158); | "Molecular Cloning: a Laboratory manual", by J. Sambrook and D. W. Russel Eds., Publisher: Cold Spring Harbor Laboratory Press, third edition, 2001 (ISBN 978- 0879695774).

Другие соединения ингибирующие активность цитокина IL-6-типа

Другие соединения со способностью ингибировать экспрессию цитокина IL-6-типа включают аптамеры и шпигельмеры, которые являются одно- или двухцепочечными D- или L-нуклеиновыми кислотами, которые специфически

связывают белок, что приводит к модификации его биологической активности. Аптамеры и шпигельмеры имеют длину от 15 до 80 нуклеотидов, и предпочтительно от 20 до 50 нуклеотидов.

Полипептиды с активностью, ингибирующей цитокины IL-6-типа

В частности, антагонисты LIF (цитокина IL-6-типа) которые могут быть полезны в контексте настоящего изобретения:

- Варианты LIF, имеющие мутации в участках связывания с рецептором, которые демонстрируют сниженную аффинность к нему, или которые способны связываться только с одной из цепей рецептора. Примеры указанных мутантов включают:

- мутанты описанные Hudson et al. (J.Biol. Chem., 1996, 271:11971-11978),
- варианты LIF описанные в WO05030803, которые имеют одну или несколько мутаций выбранных из группы Q29A, G124R и N128A и которые демонстрируют сниженную аффинность к рецептору LIF и к gp130. Вариант высокоэффективного антагониста LIF, содержащий MH35-BD/Q29A+G124R, описан Fairlie, W. D. et al. (J. Biol. Chem., 2004, 279:2125-2134).

- Мутант, описанный в WO9601319, характеризуется одной или несколькими заменами в областях связывания с рецептором и, в частности, в позициях 25-38, 150-160 или 161-180 в соответствии с нумерацией человеческого LIF.

- Растворимые варианты рецептора LIF, основанные на первичной структуре и способные связываться с LIF и предотвращать взаимодействие с его естественным рецептором на клеточной поверхности, такие как химерные белки, содержащие часть внеклеточной области рецептора LIF и лиганд-связывающий домен gp130, как описано, Metz; S. et al. (J.Biol.Chem., 2008, 283 :5985-5995).

Как отмечалось в начале описания, авторы открыли новый терапевтический путь лечения заболеваний, связанных с нежелательной клеточной пролиферацией, таких как злокачественные новообразования, особенно лечения злокачественных новообразований, вызванных активностью сигнального пути JAK-STAT, с помощью описанного в данном документе изобретения.

В контексте настоящего изобретения «заболевание, связанное с нежелательной клеточной пролиферацией» включает рост, прогрессию и метастазирование злокачественных новообразований и опухолей.

Примеры заболеваний, связанных с нежелательной клеточной пролиферацией, которые могут быть обработаны в соответствии со способами, описанными в настоящем

изобретении, являются злокачественные новообразования, рестеноз, артериосклероз, ангиогенные заболевания, фиброз, дерматологические заболевания и воспалительные заболевания.

В конкретном воплощении изобретения заболевание, связанное с нежелательной клеточной пролиферацией, является злокачественным новообразованием.

Термины «злокачественное новообразование» и «опухоль» относятся к физиологическому состоянию в млекопитающих, которое характеризуется дерегулированным клеточным ростом. Соединения настоящего изобретения полезны при лечении опухолей молочной железы, сердца, легкого, тонкого кишечника, прямой кишки, селезенки, почки, мочевого пузыря, головы, шеи, яичников, предстательной железы, мозга, поджелудочной железы, кожи, кости, костного мозга, крови, тимуса, матки, яичка и печени.

Конкретно, опухоли, которые могут быть обработаны соединениями изобретения, включают аденому, ангиосаркому, астроцитому, эпителиальную карциному, герминому, глиобластому, глиому, гемангиоэндотелиому, гемангиосаркому, гематому, гепатобластому, лейкоз, лимфому, медуллобластому, меланому, нейробластому, остеосаркому, ретинобластому, рабдомиосаркому, саркому и тератому. Конкретно, опухоль/злокачественную опухоль выбирают из группы акральной лентигинозной меланомы, актинического кератоза, аденокарциномы, аденокистозной карциномы, аденом, аденосаркомы, аденоквамозной карциномы, астроцитарных опухолей, карциномы бартолиновой железы, базально-клеточной карциномы, карциномы бронхиальных желез, капиллярного карциноида, карциномы, карциносаркомы, холангиокарциномы, хондросаркомы цистоаденомы, эндодермальной опухоли, гиперплазии эндометрия, эндометриальной стромальной саркомы, эндометриоидной аденокарциномы, эпендимальной саркомы, саркомы Юинга, фокальной нодулярной гиперплазии, гастриномы, герминогенных опухолей, глиобластомы, глюкагономы, гемангиобластомы, гемангиоэндотелиомы, гемангиомы, аденомы печени, аденоматоза печени, гепатоцеллюлярной карциномы, инсулинита, интраэпителиальной неоплазии, интраэпителиальной плоскоклеточной неоплазии, инвазивной плоскоклеточной карциномы, крупноклеточной карциномы, липосаркомы, лимфобластного лейкоза, лимфоцитарного лейкоза, лейомиосаркомы, меланомы, злокачественной меланомы, злокачественной мезотелиальной опухоли, опухоли оболочки нервов, медуллобластомы, медуллоэпителиомы, мезотелиомы, слизеобразующей плоскоклеточной карциномы,

миелолейкоза, нейробластомы, нейроэпителиальной аденокарциномы, узловой меланомы, остеосаркомы, карциномы яичников, папиллярной серозной аденокарциномы, опухоли гипофиза, плазмоцитомы, псевдосаркомы, бластомы легких, почечно-клеточной карциномы, ретинобластомы, рабдомиосаркомы, саркомы, серозной карциномы, плоскоклеточной карциномы, мелкоклеточной карциномы, карциномы мягких тканей, опухоли секретирующей соматостатин, сквамозной карциномы, плоскоклеточной карциномы, недифференцированной карциномы, увеальной меланомы, бородавчатой карциномы, карциномы влагалища/вульвы, ВИПомы, опухоли Вильмса. Еще более предпочтительно опухоли/злокачественные опухоли, которые будут подвергаться обработке соединениями изобретения, включают, рак мозга, рак головы и шеи, колоректальную карциному, острый миелоидный лейкоз, пре-В-клеточный острый лимфобластный лейкоз, рак мочевого пузыря, астроцитому, предпочтительно астроцитому II, III или IV степени злокачественности, глиобластому, предпочтительно мультиформную глиобластому, мелкоклеточный рак, и немелкоклеточный рак, предпочтительно немелкоклеточный рак легкого, метастатическую меланому, андроген-независимый метастатический рак предстательной железы, андроген-зависимый метастатический рак предстательной железы и рак молочной железы, предпочтительно протоковый рак или карцинома молочной железы.

В конкретном воплощении изобретения, злокачественное новообразование или клетки, образующие опухоли, возникающие при онкологических заболеваниях, характеризуются наличием высоких уровней цитокина IL-6-типа. В контексте настоящего изобретения, под «высокими уровнями» цитокина IL-6-типа, следует понимать, что концентрации цитокина больше чем в контрольном образце, по меньшей мере, на 5%, по меньшей мере, на 10%, по меньшей мере, на 15%, по меньшей мере, на 20%, по меньшей мере, на 25%, по меньшей мере, на 30%, по меньшей мере, на 35%, по меньшей мере, на 40%, по меньшей мере, на 45%, по меньшей мере, на 50%, по меньшей мере, на 55%, по меньшей мере, на 60%, по меньшей мере, на 65%, по меньшей мере, на 70%, по меньшей мере, на 75%, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90%, по меньшей мере, на 95%, по меньшей мере, на 100%, по меньшей мере, на 110%, по меньшей мере, на 120%, по меньшей мере, на 130%, по меньшей мере, на 140%, по меньшей мере, на 150%, или больше. Контрольный образец понимается как образец, в котором уровни цитокина IL-6-типа полезны в качестве эталона для определения относительных уровней указанного цитокина в тестовом образце.

Эталонные образцы, как правило, получают из пациентов, которые являются хорошо задокументированными с клинической точки зрения, и у которых нет заболевания. В указанных примерах концентрация биомаркера может быть определена, например, посредством определения средней концентрации в эталонной популяции. При определении эталонной популяции для определенного маркера, необходимо принять во внимание некоторые характеристики типа образца, такие как возраст, пол, физическое состояние и т.п. пациента. Например, эталонный образец может быть получен из идентичных количеств группы, по меньшей мере, от 2, по меньшей мере, от 10, по меньшей мере, от 100 до больше чем 1000 индивидуумов, так чтобы популяция являлась статистически значимой.

Концентрация цитокина IL-6-типа может быть определена внутриклеточно, в интерстициальном промежутке или в экстрактах, в которых есть как внутриклеточный белок, так и белок обнаруженный в интерстициальном промежутке. Уровни цитокина IL-6 могут быть определены посредством измерения активности указанного цитокина с помощью анализов, подходящих для этой цели, или посредством измерения количества белка с помощью иммунологических способов или посредством измерения мРНК, соответствующей цитокину IL-6-типа. В другом конкретном воплощении, злокачественное новообразование вызывается высокой активностью сигнального пути JAK-STAT, который в другом, еще более конкретном воплощении, является глиомой, предпочтительно глиомой IV степени злокачественности.

Как упомянуто ранее, ингибирующий агент по изобретению способен ингибировать пролиферацию опухолевых стволовых клеток, так что его применение особенно полезно для лечения заболеваний, при которых можно получить пользу при ингибировании пролиферации стволовых клеток. Таким образом, в предпочтительном воплощении ингибирующие агенты действуют на самообновление опухолевых стволовых клеток.

Термин «артериосклероз» относится к утолщению и упрочнению или артериальной стенки. Частным типом артериосклероза является атеросклероз, который вызывает большинство заболеваний коронарных артерий, аневризму аорты и артериальное заболевание нижних конечностей, и, более того, вносит вклад в цереброваскулярное заболевание. Нормальная артерия, как правило, имеет внутреннюю часть (интиму), образованную одним слоем эндотелиальных клеток. Под этим слоем лежит так называемый средний слой, содержащий только гладкомышечные клетки.

Внешним слоем, в свою очередь, является адвентициальная оболочка. С возрастом, ширина интимы непрерывно увеличивается, частично, как результат миграции и пролиферации гладкомышечных клеток. Похожее увеличение также происходит с шириной интимы в результате нескольких травматических эпизодов или вмешательств, таких как те, которые происходят, когда процесс дилатации вызывает разрушение стенки сосуда. Соединения, используемые в настоящем изобретении, потенциально полезны при ингибировании пролиферации эндотелиальных клеток, гладкомышечных клеток и фибробластов. Соответственно, дитерпеноидные соединения лабданового типа описанные в изобретении также могут быть полезны при лечении артериосклеротических состояний. «Артериосклеротические состояния» понимаются как классический атеросклероз, ускоренный атеросклероз и другое артериосклеротическое состояние, характеризующееся нежелательной пролиферацией эндотелиальных и/или сосудистых гладкомышечных клеток, включая сосудистые осложнения диабета и диабетического гломерулосклероза.

Термин «рестеноз» понимается как заболевание, демонстрирующее избыточную пролиферацию и миграцию клеток как результат высвобождения факторов роста, вызванный механическим нарушением эндотелиальных клеток, образующих коронарные артерии.

«Ангиогенное заболевание» понимается как заболевание или медицинское состояние демонстрирующее аномальную неоваскуляризацию. Такие заболевания или состояния включают диабетическую ретинопатию, неоваскулярную глаукому, ревматоидный артрит и некоторые злокачественные новообразования, такие как гемангиоэндотелиомы, гемангиомы, и саркома Капоши. Проплиферация эндотелиальных клеток и сосудистых гладкомышечных клеток является основной характеристикой неоваскуляризации. Соединения, описанные в настоящем изобретении, полезны при ингибировании указанной пролиферации и соответственно при ингибировании прогрессии ангиогенного состояния, которое зависит полностью или частично от указанной неоваскуляризации.

Термин «фиброз» относится к образованию или избыточному развитию фиброзной соединительной ткани в органе или ткани. Фиброз включает, например, эндомиокардиальный фиброз, идиопатический пульмонарный фиброз, эмфизему, пульмонарный фиброз (приводящий к хроническому обструктивному заболеванию легких), болезнь Пейрони, склеродермию, диффузные паренхиматозные заболевания

легкого, келоиды, фиброз средостения, прогрессивный массивный фиброз, пролиферативный фиброз, неопластический фиброз, интерстициальный фиброз почек, фиброз печени, хирургические шрамы и ожоги.

Термин «дерматологические заболевания» понимается как заболевания кожи, демонстрирующие клеточную пролиферацию, связанную с любой пролиферативной дисфункцией. Эти дисфункции включают, например, келоиды, гипертрофированные ожоговые шрамы, себорейный кератоз, инфекцию вирусом папилломы, актинический кератоз и экзема.

Термин «воспалительные заболевания» понимается как заболевания, вызванные воспалением, как результат клеточной пролиферации, ассоциированной с любой пролиферативной дисфункцией. Они включают, например, пролиферативный гломерулонефрит, красную волчанку, склеродермию, временный артрит, тромбангиит и слизисто-кожный лимфоузловый синдром.

В другом аспекте, изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество ингибирующего агента по настоящему изобретению вместе с фармацевтически приемлемым носителем для лечения заболеваний, связанных с нежелательной клеточной пролиферацией. Примеры заболеваний, связанных с нежелательной клеточной пролиферацией были упомянуты выше в описании.

В контексте настоящего изобретения «терапевтически эффективное количество» понимается как количество агента, ингибирующего экспрессию и/или активность цитокина IL-6-типа, которое необходимо для достижения требуемого эффекта, который, в данном конкретном случае, является лечением заболевания, связанного с нежелательной клеточной пролиферацией. В целом, терапевтически эффективное количество вводимого ингибирующего агента по настоящему изобретению будет зависеть среди других факторов, от подвергаемого лечению индивидуума, от тяжести заболевания, которым страдает указанный индивидуум, от выбранной лекарственной формы и т.п. По этой причине, дозы, упомянутые в этом изобретении, должны рассматриваться только как руководство для специалиста в данной области, и последний должен корректировать дозы в соответствии с ранее упомянутыми переменными. Тем не менее, ингибирующий агент по настоящему изобретению может быть введен один или несколько раз в день, например, 1, 2, 3 или 4 раза в день, в типичном общем ежедневном количестве, содержащем от 0,1 до 1000 мг/кг массы тела/день, предпочтительно 10 мг/кг

массы тела/день.

В контексте данного описания, термин «лечение» или «лечить» означает введение ингибирующего агента по изобретению для предотвращения, облегчения или устранения заболевания или одного или нескольких симптомов связанных с указанным заболеванием, связанным с нежелательной клеточной пролиферацией. «Лечение» также включает предупреждение, ослабление или устранение физиологических осложнений заболевания. В контексте данного изобретения, термин «облегчать» понимается как любое улучшение ситуации подвергаемого лечению пациента - как субъективно (ощущения пациента или о пациенте), так и объективно (измеряемые параметры).

Термины «носитель, адъювант и/или переносчик» относятся к молекулярным сущностям или субстанциям с которыми вводится активный ингредиент. Такие фармацевтические носители, адъюванты или переносчики могут быть стерильными жидкостями, такими как вода или масло, включая масла нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п., наполнители, вещества для улучшения распадаемости, смачивающие агенты или растворители. Подходящие фармацевтические переносчики описаны в "Remington's Pharmaceutical Sciences" by E. W. Martin.

В контексте настоящего изобретения, термин «фармацевтически приемлемый» относится к молекулярным сущностям и композициям, которые физиологически переносимы и, как правило, не вызывают аллергическую реакцию или подобную побочную реакцию, такую как расстройство желудка, головокружение и т.п. когда их вводят человеку. Термин «фармацевтически приемлемый» предпочтительно означает одобренный федеральным и региональным регулирующим агентством, или включенный в Фармакопею США или другую широко признанную фармакопею для применения на животных, а более конкретно на людях. Агент, ингибирующий экспрессию и/или активность цитокина IL-6-типа, а также фармацевтические композиции содержащие его, могут быть применены вместе с другими дополнительными лекарственными средствами, полезными при лечении заболеваний связанный с нежелательной клеточной пролиферацией. Указанные дополнительные лекарственные средства могут формировать часть той же фармацевтической композиции или, в ином случае, они могут быть представлены в виде отдельной композиции для их введения, которое может быть одновременным или не одновременным с введением фармацевтической композиции,

содержащей указанный агент, ингибирующий экспрессию и/или активность цитокина IL-6-типа.

Примеры других дополнительных лекарственных средств полезных при лечении заболеваний, связанных с нежелательной пролиферации клеток включают, без ограничения перечисленным, алкилирующие агенты, такие как, например, циклофосфамид, кармустин, даунорубицин, мехлорэтамин, хлорамбуцил, нимустин, мелфалан и т.п.; антрациклины, такие как, например, даунорубицин, доксорубицин, эпирубицин, идарубицин, митоксантрон, валрубицин и т.п.; соединения таксана, такие как, например, паклитаксел, доцетаксел и т.п.; ингибиторы топоизомеразы, такие как, например, этопозид, тенипозид, тулипозид, иринотекан и т.п.; нуклеотидные аналоги, такие как, например, азациитидин, азатиоприн, капецитабин, цитарабин, доксифлуридин, фторурацил, гемцитабин, меркаптопурин, метотрексат, тиогуанин, фторафур и т.п.; агенты на основе платины, такие как, например, карбоплатин, цисплатин, оксалиплатин и т.п.; противоопухолевые агенты, таких как, например, винкристин, лейковорин, ломустин, прокарбазин и т.п.; модуляторы гормонов, такие как, например, тамоксифен, финастерид, ингибиторы 5- α -редуктазы и т.п.; алкалоиды барвинка такие как, например, винбластин, винкристин, виндезин, винорелбин и т.п. Подходящие химиотерапевтические агенты описаны более подробно в литературе, такой как указатель Merck на CD-ROM, 13-е издание.

Фармацевтическая композиция изобретения может быть введена любым подходящим для введения путем, например, перорально, парентерально (например, подкожно, внутрибрюшинно, внутривенно, внутримышечно и т.п.), ректально, и т.п. как правило, пероральным путем из-за хронической природы подвергаемого лечению заболевания.

Наглядные примеры фармацевтических лекарственных форм, вводимых пероральным путем, включают таблетки, капсулы, гранулы, растворы, суспензии и т.п., и они могут содержать обычные наполнители, такие как связующие, разбавители, вещества для улучшения распадаемости, смазывающие вещества, смачивающие вещества и т.п., и могут быть приготовлены обычными способами. Фармацевтические композиции также могут подходить для парентерального введения, в форме, например, стерильных растворов, суспензий или лиофилизированных продуктов, в подходящей лекарственной форме; в данном случае указанные фармацевтические композиции будут включать подходящие наполнители, такие как буферы, реактивы и т.п. В любом случае,

наполнители выбирают в соответствии с выбранной фармацевтической лекарственной формой.

Обзор различных фармацевтических лекарственных форм лекарственных препаратов и их приготовление можно найти в книге "Tratado de Farmacia, Galenica", by C. Fauli i Trillo, 10th Edition, 1993, Luzan 5, S.A. de Ediciones.

Как понятно специалисту, если агент, ингибирующий экспрессию и/или активность цитокина IL-6-типа, в соответствии с изобретением содержит нуклеотидную последовательность, такую как, например, антисмысловые олигонуклеотиды, интерферирующие РНК (миРНК), каталитические РНК или специфические рибозимы, РНК с активностью ловушки, и т.п., фармацевтическая композиция изобретения может быть составлена в виде композиции, предназначенной для применения в генной терапии; в качестве неограничивающей иллюстрации, в данном случае, фармацевтическая композиция изобретения может содержать вирусный или невирусный вектор, включающий указанную нуклеотидную последовательность или генный конструкт, содержащий упомянутую последовательность. В качестве неограничивающей иллюстрации, указанные вектора могут быть вирусными векторами, например, основанными на ретровирусах, аденовирусах и т.п., или невирусными, такими как комплексы ДНК-липосома, ДНК-полимер, ДНК-полимер-липосома и т.п. [see "Nonviral Vectors for Gene Therapy", edited by Huang, Hung and Wagner, Academic Press (1999)]. Указанные вектора могут быть введены напрямую в организм человека или животного обычными способами и в ином случае они могут быть применены для трансформации, трансфекции или инфекции клеток, например клеток млекопитающих, включая человеческие клетки, *ex vivo*, с последующей имплантацией их в организм человека или животного для получения требуемого терапевтического эффекта. Для их введения в организм человека или животного, указанные клетки будут составлены в подходящей среде, которая не сказывается негативно на жизнеспособности указанных клеток.

Способы скрининга по изобретению

Открытие, сделанное авторами настоящего изобретения и изложенное в настоящем описании, относится не только к лечению заболеваний, связанных с нежелательной клеточной пролиферацией или к диагностике указанных заболеваний, но также относится к вовлечению LIF в активацию каскада JAK/STAT, которое также может быть использовано при разработке метода скрининга для идентификации соединений, способных блокировать/ингибировать клеточную пролиферацию опухолевых клеток,

индуцированную цитокином IL-6-типа или его функционально эквивалентным вариантом.

Следовательно, в другом аспекте, изобретение относится к *in vitro* способу идентификации соединений, способных блокировать/ингибировать клеточную пролиферацию опухолевых клеток, индуцированную цитокином IL-6-типа или его функционально эквивалентным вариантом, включающему стадии:

- (i) контакта клетки, экспрессирующей рецептор цитокина IL-6-типа с цитокином IL-6-типа и соединением-кандидатом, и
- (ii) идентификацию соединений, блокирующих клеточную пролиферацию указанных клеток.

В первой стадии, способ изобретения включает контакт клетки, экспрессирующей рецептор цитокина IL-6-типа, с цитокином IL-6-типа в присутствии соединения-кандидата любой степени чистоты.

В контексте настоящего изобретения, «клетка» понимается как любая клетка, экспрессирующая рецептор цитокина IL-6-типа. Клетки, в которых рецептор для цитокинов IL-6-типа экспрессируется, и которые могут быть использованы в способах настоящего изобретения включают клетки, полученные из солидных опухолей, таких как клетки рака молочной железы, клетки рака мочевого пузыря, клетки меланомы, клетки рака яичника, клетки рака поджелудочной железы, клетки рака предстательной железы, клетки рака толстой кишки, клетки рака легкого и т.п., а также клетки, полученные из жидких опухолей, таких как клетки лейкоза и лимфомы. В конкретном воплощении клетка экспрессирующая рецептор для цитокина IL-6-типа является клеткой глиомы, предпочтительно иницирующей клеткой глиомы (GIC). Примеры рецепторов для цитокинов IL-6-типа могут быть найдены у Auernhammer and Melmed, 2000 (Endocrine reviews, vol. 21(3): 313-345), такие как рецептор LIF (LIFR), рецептор Онкостатина М (OMSR) и т.п. Таким образом, клетки объект изучения включают высшие эукариотические клетки, предпочтительно клетки млекопитающих. Предпочтительно, если клетки, которые используются в настоящем изобретении являются те, в которых рецепторы для цитокинов IL-6-типа конститутивно экспрессируются. В ином случае, обычные клеточные линии также могут быть использованы либо напрямую, если обнаружено, что они подходяще экспрессируют рецепторы цитокинов IL-6-типа или после предварительной трансфекции конструктами ДНК, которые позволяют экспрессировать указанные рецепторы. Подходящие клетки для этой цели включают

клетки линий CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK 293, 3T3, WI38 и т.п. В предпочтительном воплощении, клетки, которые используют в способе изобретения, являются клетками глиомы, предпочтительно, клетками глиомы IV степени злокачественности.

Специалист в данной области отметит что, в зависимости от типа рецепторов, который экспрессируется клеткой, используемой в методе скрининга изобретения, будет необходимо использовать соответствующий цитокин. Цитокин предпочтительно выбирают из группы LIF, IL-6, IL-11, онкостатина М, кардиотрофина-1, CNTF и CLC.

Контакт клетки с соединением-кандидатом может быть осуществлен любым способом, известным специалисту в данной области, включая прямой контакт клетки, экспрессирующей рецептор для цитокина IL-6-типа, где указанная клетка находится в культуре, с цитокином IL-6-типа и соединением-кандидатом в растворителе, подходящем для их взаимодействия, таком как ДМСО и т.п.

В соответствии с настоящим изобретением, «контакт» клетки с соединением-кандидатом включает любой возможный путь приведения соединения-кандидата в непосредственную близость к клетке-мишени, либо на поверхности клетки, либо внутри нее. Таким образом, в случае если соединение-кандидат является низкомолекулярной молекулой, достаточно добавить указанную молекулу к культуральной среде. В случае если соединение-кандидат является высокомолекулярной молекулой (например, биологическим полимером, таким как нуклеиновая кислота или белок, антитела или полипептиды), необходимо предоставить средства для доступа этой молекулы внутрь клетки. В случае если молекула-кандидат является нуклеиновой кислотой (например, антисмысловыми олигонуклеотидами, интерферирующими РНК (миРНК), каталитическими РНК или специфическими рибозимами, РНК с активностью ловушки), для введения конструкта ДНК могут быть использованы обычные способы трансфекции. В случае если соединение-кандидат является белком, клетка может контактировать как напрямую с белком, так и с нуклеиновой кислотой, кодирующей его, соединенной с элементами, которые позволяют ее транскрипцию/трансляцию как только она окажется внутри клетки. С этой целью любой из ранее упомянутых способов может быть использован для того, чтобы позволить ему войти внутрь клетки. В ином случае, возможен контакт клетки с вариантом исследуемого белка, который был модифицирован пептидом, который способен промотировать транслокацию белка внутрь клетки, например, Tat-пептидом, полученным из белка ТАТ HIV-1, третьей спиралью

гомеодомена белка Antennapedia из *D. melanogaster*, белком VP22 вируса простого герпеса и олигомерами аргинина (Lindgren, A. et al., 2000, Trends Pharmacol. Sci, 21:99-103, Schwarze, S. R. et al., 2000, Trends Pharmacol. Sci., 21:45-48, Lundberg, M et al., 2003, Mol. Therapy 8:143-150 and Snyder, E. L. and Dowdy, S. F., 2004, Pharm. Res. 21:389-393).

Предпочтительно, если соединение-кандидат не выделено, а скорее образует часть более или менее комплексной смеси, полученной из естественного источника, или образует часть библиотеки соединений. Примеры библиотек соединений, которые могут быть проверены в соответствии со способом настоящего изобретения включают, без ограничения перечисленным, библиотеки пептидов, включая как пептиды, так и аналоги пептидов, содержащие D-аминокислоты или пептиды, содержащие непептидные связи, библиотеки нуклеиновых кислот, включая нуклеиновые кислоты с нефосфодиэфирными связями фосфоротиоатного типа или типа пептид-нуклеиновая кислота, библиотеки антител, углеводов, или низкомолекулярных соединений, предпочтительно органических молекул, пептидомиметиков и т.п. В случае если используется библиотека низкомолекулярных органических соединений, библиотека должна быть предварительно отобрана так, чтобы она содержала соединения, которые могут более легко проникать внутрь клетки. Таким образом, соединения могут быть отобраны на основе определенных параметров, таких как размер, липофильность, гидрофильность, способность формировать водородные связи.

В ином случае, соединения-кандидаты могут образовывать часть экстракта полученного из естественного источника. Естественный источник может быть животным, растением, полученным из любой окружающей среды, включая, без ограничения перечисленным, экстракты наземных, воздушных, морских организмов и т.п.

Во второй стадии изобретение содержит идентификацию тех соединений, которые блокируют клеточную пролиферацию клетки, экспрессирующей рецептор для цитокина IL-6-типа. Примеры способов, подходящих для детекции блокировки клеточной пролиферации, включают без ограничения перечисленным:

- определение теломеразной активности

Ферментная активность теломеразы может быть определена известным в данной области способом. Например, активность теломеразы может быть определена посредством определения скорости элонгации конкретной повторяющейся последовательности, содержащей 2, 3 или большее количество повторов унитарной

теломерной последовательности (Yegorov, E. E. et al., 1997, *Mol. Biol.*, 31:130-136). Для измерения указанной активности могут быть использованы цитоплазматические экстракты, ядерные экстракты, клеточные лизаты или целые клетки. «Повышение» теломеразной активности следует понимать как повышение абсолютного уровня теломеразной активности в конкретной клетке по сравнению с нормальными клетками в том же индивидууме или по сравнению с нормальными клетками в объектах, которые не страдают от данного состояния.

- определение длины теломер

Способы определения длины теломер хорошо описаны в данной области Harley, C. B., et al. (*Nature*, 1990, 345:458-460); Levy, M. Z. et al., (*J. Mol. Biol.*, 1992, 225:951-960); Lindsey, J. et al., (*Mutat. Res.*, 1991, 256:45-48) и Allsopp, R. C. et al., (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89:10114-10118), в числе прочих. Эндонуклеазы рестрикции, которые не фрагментируют теломерную ДНК, как правило, используются для того, чтобы позже отделить полученные по молекулярной массе фрагменты и детектировать теломеры гибридизацией с помощью зондов, специфичных для последовательности теломер.

- Определение клеточной пролиферации

Клеточная пролиферация может быть определена способами, которые широко известны специалистам в данной области, включая определение времени удвоения клеток, как описано Harley et al., (*Nature*, 1990, 345:458-460). Скорость клеточной пролиферации может быть определена путем определения включения содержащего тритий уридина в клетку или колориметрическими анализами с помощью BrdU.

В настоящем изобретении, «функционально эквивалентный вариант цитокина IL-6-типа» понимается как белок, аминокислотная последовательность которого (i) является фактически гомологичной аминокислотной последовательности цитокина IL-6-типа и (ii) осуществляет те же функции, что и указанный цитокин IL-6-типа. Функциональная схожесть белка с другим конкретным белком может быть определена анализами интерференции экспрессии гена, кодирующего конкретный белок, когда при снижении экспрессии снижается активность данного белка, и последующее восстановление активности осуществляется экспрессией последовательности другого белка. Эти эксперименты осуществляются с помощью последовательностей интерферирующих РНК специфичных и комплементарных последовательности конкретного белка, и с помощью экспрессирующих векторов, включающих последовательность, специфичную для другого белка, регулируемого или

нерегулируемого индуцируемым промотором.

Аминокислотная последовательность является фактически гомологичной определенной аминокислотной последовательности, когда она имеет степень идентичности, по меньшей мере, 70/%, преимущественно, по меньшей мере, 75%, как правило, по меньшей мере, 80%, предпочтительно, по меньшей мере, 85%, более предпочтительно, по меньшей мере, 90%, еще более предпочтительно, по меньшей мере, 95%, 97%, 98% или 99%, относительно указанной определенной аминокислотной последовательности. Степень идентичности между двумя аминокислотными последовательностями может быть определена обычными способами, например, с помощью стандартных алгоритмов выравнивания последовательности, известных в данной области, таких как, например, BLAST [Altschul S. F. et al. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990 Oct 5; 215 (3): 403-10].

Специалисту в данной области понятно, что мутации в нуклеотидной последовательности гена, кодирующего цитокин IL-6-типа, дающие консервативные мутации аминокислот в некритических для функциональности белка позициях, являются эволюционно нейтральными мутациями, которые не воздействуют на общую структуру или функциональность. Указанные варианты подпадают под объем притязаний настоящего изобретения. Эти функционально эквивалентные варианты цитокина IL-6-типа имеющие вставки, делеции или модификации одной или нескольких аминокислот относительно указанного цитокина IL-6-типа, и, более того, сохраняющие те же функции что и у указанного цитокина, также включены в объем притязаний данного изобретения.

Следовательно, при использовании в данном документе термин «функционально эквивалентный вариант» также включает любой функциональный фрагмент цитокина IL-6-типа. Термин «фрагмент» относится к пептиду, содержащему часть белка. В данном случае фрагмент функционального эквивалента цитокина IL-6-типа является пептидом или белком, содержащим часть цитокина IL-6-типа и имеющим такие же функции, как и у указанного цитокина.

Диагностические способы изобретения

К своему удивлению авторы настоящего изобретения обнаружили что, цитокин IL-6-типа, более конкретно LIF, вовлечен в активацию каскада JAK-STAT, опосредованного TGF β , и, таким образом, индуцирует процесс клеточной пролиферации и увеличение количества опухолевых стволовых клеток (злокачественных опухолевых стволовых клеток). Это открытие позволяет разработать диагностические методы для

диагностики заболеваний, связанных с нежелательной клеточной пролиферацией, основанные на определении уровней цитокина IL-6-типа. Таким образом, в другом аспекте изобретение относится к *in vitro* способу диагностики в объекте заболеваний, связанных с нежелательной клеточной пролиферацией или к способу определения склонности объекта к указанному заболеванию, связанному с нежелательной клеточной пролиферацией, или к способу определения в объекте стадии или тяжести указанного заболевания связанного с нежелательной клеточной пролиферацией, или к способу мониторинга воздействия терапии, введенной объекту с указанным заболеванием, связанным с нежелательной клеточной пролиферацией, который включает количественную оценку уровней экспрессии гена, кодирующего цитокин IL-6-типа или белка, кодируемого указанным геном, или функционально эквивалентного варианта указанного белка в биологическом образце из указанного объекта, где увеличение экспрессии гена, кодирующего цитокин IL-6-типа или белка, кодируемого указанным геном, или функционально эквивалентного варианта указанного белка, относительно экспрессии гена, кодирующего цитокин IL-6-типа или белка, кодируемого указанным геном, или функционально эквивалентного варианта указанного белка в контрольном образце, свидетельствует о заболевании, связанном с нежелательной клеточной пролиферацией, или о большей склонности указанного объекта к заболеванию, связанному с нежелательной клеточной пролиферацией или о нереспонсивности терапии, введенной указанному объекту.

При использовании в данном документе, диагностика относится к оценке вероятности, согласно которой объект страдает от заболевания. Как будет понятно специалистам в данной области, такая оценка обычно не корректна для 100% объектов, которые подвергаются диагностике, хотя является предпочтительной. Тем не менее, термин подразумевает способность идентифицировать статистически значимую часть объектов, страдающих от заболевания или имеющих предрасположенность к нему. Специалист в данной области может определить является ли некоторая часть статистически значимой посредством простого использования нескольких хорошо известных инструментов статистической оценки, например, определения доверительной области, определение р-значения, критерия Стьюдента, критерия Манна-Уитни и т.п. Подробности в Dowdy and Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, New York 1983. Предпочтительными доверительными областями являются, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере,

90%, по меньшей мере, 95%. Р-значения предпочтительно равны 0,2, 0,1, 0,05.

При использовании в данном документе «предрасположенность» означает, что у объекта не развилось заболевание или любой симптом упомянутого выше заболевания, или другие диагностические критерии, но, однако, заболевание разовьется в будущем с определенной вероятностью. Указанная вероятность будет значимо отличаться от статистической вероятности возникновения заболевания, связанного с нежелательной клеточной пролиферацией. Предпочтительно, если при диагностике вероятность развития заболевания, связанного с нежелательной клеточной пролиферацией 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% предрасположенности. Диагностика предрасположенности иногда может называться прогнозом или предсказанием вероятности развития заболевания у объекта.

В контексте настоящего изобретения «контрольный образец» понимается как эталонный образец, который применяют для определения изменчивости уровней экспрессии генов и белков, используемых в настоящем изобретении. В воплощении, эталонное значение получают из имеющегося сигнала с помощью образца ткани, полученного от здорового индивидуума. Предпочтительно, если образцы взяты из одной и той же ткани нескольких здоровых индивидуумов и объединены, так чтобы количество мРНК или полипептидов в образце отражало среднее значение указанных молекул в популяции.

Количественная оценка уровней экспрессии гена, кодирующего цитокин IL-6-типа может быть осуществлена на РНК, возникающей вследствие транскрипции указанного гена (мРНК), или в ином случае, транскрипции комплементарной ДНК (кДНК) указанного гена. Кроме того, способ изобретения может включать осуществление стадии экстракции для получения общей РНК, которая может быть осуществлена с помощью обычных методов (Chomczynski et al., Anal. Biochem., 1987, 162:156; Chomczynski P., Biotechniques, 1993, 15:532).

Для обнаружения и количественной оценки уровней мРНК, кодируемой геном, кодирующим цитокин IL-6-типа или ее соответствующей кДНК в пределах контекста изобретения может быть применен практически любой обычный способ. В качестве неограничивающей иллюстрации уровни мРНК, кодируемой указанным геном, могут быть количественно оценены с помощью обычных способов, например, способов, включающих амплификацию мРНК и количественную оценку продукта амплификации

указанной мРНК, например, с помощью электрофореза и окрашивания, или в ином случае, помощью нозерн-блоттинга и зондов, специфичных к мРНК, представляющего интерес гена, или ее соответствующей кДНК, картирование с S1-нуклеазой, ОТ-ЛЦР, гибридизацию, микроэрреи и т.п. предпочтительно могут быть количественно оценены количественной ПЦР в реальном времени с помощью подходящих наборов зондов и праймеров. Подобным образом уровни кДНК, соответствующие указанной мРНК кодируемой геном, кодирующим цитокин IL-6-типа, также могут быть количественно оценены с помощью обычных методов; в данном случае, способ изобретения включает стадию синтеза соответствующей кДНК с помощью обратной транскрипции (ОТ) соответствующих мРНК с последующей амплификацией и количественной оценкой продукта амплификации указанной кДНК. Обычные способы для количественной оценки уровней экспрессии могут быть найдены, например, в Sambrook et al., 2001. "Molecular cloning: a Laboratory Manual", 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. E., Vol. 1-3.

Таким образом, в конкретном воплощении способа изобретения количественный анализ уровней экспрессии гена, кодирующего цитокин IL-6-типа, включает количественный анализ матричной РНК (мРНК) указанного гена, фрагмента указанной мРНК, комплементарной ДНК (кДНК) указанного гена, фрагмента указанной кДНК или их смеси.

В другом конкретном воплощении количественный анализ уровней экспрессии гена, кодирующего цитокин IL-6-типа, осуществляют количественной полимеразной цепной реакцией.

Кроме того, при осуществлении способа изобретения на практике, уровни экспрессии белка, кодируемого указанным геном, кодирующим цитокин IL-6-типа, т.е. геном, кодирующим IL-6, IL-11, фактор ингибирующий лейкоз (LIF), онкостатин М (OSM), кардиотрофин-1 (СТ-I), цилиарный нейротрофический фактор (CNTF) или кардиотрофин-подобный цитокин (CLC) также могут быть количественно оценены. Как понятно специалисту в этой области, уровень экспрессии белка может быть определен количественно с помощью любого обычного способа. В качестве неограничивающей иллюстрации уровни белка могут быть определены количественно, например, путем применения антител со способностью связывать указанные белки (или их фрагменты, содержащие антигенную детерминанту) с последующей количественной оценкой образованных комплексов. Антитела, которые применяют в этих анализах, могут быть

меченными или немеченными. Наглядные примеры маркеров, которые могут быть использованы, включают радиоактивные изотопы, ферменты, флюорофоры, хемилюминисцентные реактивы, ферментные субстраты или кофакторы, ферментные ингибиторы, частицы, краски и т.п. Существует множество известных типов анализов, применимых в настоящем изобретении, которые используют немеченные антитела (первичные антитела) и меченные антитела (вторичные антитела); эти методы включают вестерн-блоттинг, ИФА (иммуноферментный анализ), РИА (радиоиммунный анализ), конкурентный ферментный иммуноанализ, двухантительный «сэндвич»-ИФА, иммуноцитохимические и иммуногистохимические методы, методы основанные на применении белковых биочипов или микроэррев, которые включают специфические антитела или анализы, основанные на коллоидальной преципитации в форматах, подобных индикаторным полоскам. Другие пути обнаружения и определения количества белка, включают методы аффинной хроматографии, анализы связывания лигандов, и т.п. В другом конкретном воплощении, количественную оценку уровней белка осуществляют с помощью вестерн-блоттинга, иммуногистохимии или ИФА.

В другом предпочтительном воплощении, определение уровней экспрессии цитокина IL-6-типа может быть проведено определением активности указанного белка, поскольку высокие уровни экспрессии дают в результате более высокую удельную активность указанного белка в образце. Анализы для определения активности цитокинов IL-6-типа ранее были описаны в контексте терапевтических способов изобретения.

Цитокины IL-6-типа, уровни, которых могут быть использованы в качестве маркеров нежелательной клеточной пролиферации, ранее были описаны в настоящем описании и являются применимыми к способам изобретения. Аналогично, диагностический способ изобретения может быть применен к любому заболеванию, связанному с нежелательной клеточной пролиферацией, определенной выше. В предпочтительном воплощении, заболевание, связанное с нежелательно клеточной пролиферацией является злокачественным новообразованием, предпочтительно злокачественным новообразованием, имеющим высокие уровни цитокина IL-6-типа или высокую активность сигнального пути JAK-STAT.

Осуществление способа изобретения на практике включает получение биологического образца из подвергаемого лечению объекта. Наглядные, не ограничивающие примеры указанных образцов включают различные типы биологических жидкостей, таких как кровь, сыворотка, плазма, спинномозговая

жидкость, перитонеальная жидкость, кал, моча и слюна, а также образцы тканей. Образцы биологических жидкостей могут быть получены любым обычным способом, подходящим для образцов тканей; для иллюстрации указанные образцы тканей могут быть образцами биопсий, полученных хирургической резекцией.

В другом аспекте, изобретение относится к применению набора, содержащего реактивы для количественной оценки уровней экспрессии гена, кодирующего цитокин IL-6-типа или белка, кодируемого указанным геном или функционально эквивалентного варианта указанного белка для диагностики злокачественного образования в объекте или для определения склонности объекта к указанному злокачественному новообразованию, или для определения в объекте стадии или тяжести указанного злокачественного новообразования, или для мониторинга воздействия терапии, введенной объекту с указанным злокачественным новообразованием, при котором реактивы детектируют увеличение экспрессии указанного гена или указанного белка или его функционально эквивалентного варианта, относительно контрольного образца, где указанный объект может страдать от заболевания, связанного с нежелательной клеточной пролиферацией, или у него имеется большая предрасположенность к указанному заболеванию, связанному с нежелательной клеточной пролиферацией, или у него имеется большая тяжесть указанного заболевания, или вводимая терапия не является эффективной.

Все термины и выражения, использованные для определения применения набора, ранее были описаны и объяснены для других оригинальных аспектов и определенных воплощений настоящего изобретения, и также являются пригодными для применения набора, описанного в данном документе.

Способы конструирования специализированных терапий и отбора пациентов, которые могут получить пользу от терапии, основанной на ингибиторах IL-6

Авторы настоящего изобретения показали, что ингибиторы цитокинов, принадлежащих к семейству IL-6, а более конкретно LIF, вызывают ингибирование пролиферации опухолевых клеток. Авторы также отметили, что существуют опухоли, имеющие очень высокие уровни указанных цитокинов, поэтому авторы предполагают, что терапия, основанная на использовании ингибиторов IL-6, может быть особенно полезной при лечении пациентов с высокими уровнями цитокинов IL-6-типа.

Таким образом, в другом аспекте, изобретение относится к *in vitro* способу разработки специализированной терапии для пациента, страдающего от заболевания, связанного с нежелательной клеточной пролиферацией, включающему:

(a) количественное определение уровней экспрессии цитокина IL-6-типа в указанном пациенте, и

(b) сравнение указанных уровней экспрессии с контрольными уровнями, где если уровни экспрессии цитокина IL-6-типа в указанном пациенте выше, чем контрольные значения, то указанному пациенту вводят агент, ингибирующий цитокин IL-6-типа.

В другом аспекте изобретение относится к *in vitro* способу отбора пациентов, страдающих от заболевания, связанного с нежелательной клеточной пролиферацией, которые будут получать агент, ингибирующий цитокин IL-6-типа, включающему

a) количественную оценку уровней экспрессии цитокина IL-6-типа в указанном пациенте, и

b) сравнение указанных уровней экспрессии с контрольными уровнями, где если уровни экспрессии цитокина IL-6-типа в указанном пациенте выше, чем контрольные значения, то указанного пациента выбирают для получения лечения агентом, ингибирующим цитокин IL-6-типа.

В обоих аспектах предпочтительным воплощением является то, в котором заболевание, связанное с нежелательной клеточной пролиферацией, ассоциировано с нежелательной пролиферацией стволовых клеток.

В предпочтительном воплощении, агент, ингибирующий цитокин IL-6-типа, выбирают из группы, состоящей из миРНК, антисмысловых олигонуклеотидов, специфических рибозимов, антител и полипептидов. Ингибирующие агенты предпочтительно являются антителами, а более предпочтительно ингибирующими антителами, специфичными к указанному цитокину IL-6-типа или антителами, блокирующими рецепторы цитокина IL-6-типа.

Цитокины IL-6-типа, которые могут быть использованы в качестве маркера для отбора пациентов или для разработки специализированных терапий, подробно были описаны выше и выбираются из LIF, IL-6, IL-11, онкостатина М, кардиотрофина-1, CNTF и CLC. Заболеваниями, вызванными нежелательной клеточной пролиферацией, являются те, что описаны выше. В предпочтительном воплощении указанным заболеванием, вызванным нежелательной клеточной пролиферацией, является злокачественное новообразование. Еще более предпочтительно, если указанное злокачественное новообразование вызвано высокой активностью сигнального пути JAK-STAT. В предпочтительном воплощении указанное злокачественное новообразование является любым из представленных: глиомой, пре-В-лимфобластным лейкозом, острым

миелоидным лейкозом, колоректальной карциномой, раком мочевого пузыря, протоковым раком молочной железы или карциномой молочной железы. Еще более предпочтительно, если указанной глиомой является глиома IV степени злокачественности.

Прогностические способы изобретения

В другом аспекте изобретение относится к прогностическому *in vitro* способу прогнозирования средней продолжительности жизни у пациентов, страдающих от заболевания, связанного с нежелательной клеточной пролиферацией. Данный способ основан на наблюдении того, что например, в случае глиомы, средняя продолжительность жизни снижена у пациентов, демонстрирующих более высокие уровни экспрессии LIF по сравнению с контрольными пациентами (фигура 12).

Способ основан на

а) количественном определении уровней экспрессии цитокина IL-6-типа в указанном пациенте, и

б) сравнении указанных уровней экспрессии с контрольными уровнями,

где если уровни экспрессии цитокина IL-6-типа в указанном пациенте больше чем значения у контрольных пациентов с тем же заболеванием, то в таком случае указанный пациент вероятно имеет более низкую продолжительность жизни, чем в контрольной группе.

В более конкретном аспекте, концентрация цитокина IL-6-типа может быть измерена для прогностических целей, а именно для прогнозирования средней продолжительности жизни у индивидуума страдающего от указанного заболевания. Для этой цели, концентрация цитокина IL-6-типа у пациента с опухолью сравнивают с эталонной концентрацией того же самого цитокина IL-6-типа. Группа эталонных пациентов, как правило, состоит из пациентов, которые хорошо документированы и которые страдают от того же заболевания. Например, эталонный образец может быть получен из идентичных количеств группы, по меньшей мере, от 2, по меньшей мере, от 10, по меньшей мере, от 100 до больше чем 1000 индивидуумов, так чтобы популяция пациентов, страдающих от указанного заболевания являлась статистически значимой. Эталонная группа может состоять из одного или большего количества из перечисленного ниже:

а) все пациенты, страдающие от указанного заболевания,

б) все пациенты, страдающие от указанного заболевания, в которых не показан

значимо положительно регулированные уровни цитокина IL-6-типа

с) все пациенты, страдающие от указанного заболевания, которые демонстрируют значимо отрицательно регулированные уровни цитокина IL-6-типа.

Концентрация цитокина IL-6-типа может быть определена внутриклеточно, в интерстициальном промежутке или в экстрактах в которых находится как внутриклеточный белок, так и белок, обнаруженный в интерстициальном промежутке. Уровни цитокина IL-6 могут быть определены посредством измерения активности указанного цитокина с помощью анализов, подходящих для этой цели, или посредством измерения количества белка с помощью иммунологических способов или посредством измерения мРНК, соответствующей цитокину IL-6-типа.

В данном аспекте, предпочтительное воплощение является заболеванием, связанным с нежелательной клеточной пролиферацией. В более конкретном воплощении, заболевание, связанное с нежелательной клеточной пролиферацией является злокачественным новообразованием. Еще более предпочтительно, если тип злокачественного новообразования связан с аномально высокими уровнями цитокина IL-6-типа в подгруппе пациентов с указанным злокачественным новообразованием. В более конкретном воплощении, злокачественное новообразование является одним из следующих: лейкоз, глиома, колоректальная карцинома, рак мочевого пузыря, рак молочной железы. В более конкретном воплощении, лейкоз является пре-В клеточным острым лимфобластным лейкозом или острым миелоидным лейкозом, а рак молочной железы является протоковым раком молочной железы или карциномой молочной железы.

Цитокины IL-6-типа, которые могут быть использованы в качестве маркера для проверки пациентов в прогностических целях, подробно были описаны выше и выбираются из LIF, IL-6, IL-11, онкостатина М, кардиотрофина-1, CNTF и CLC.

Статистические способы позволят прогнозировать значение средней продолжительности жизни пациентов, основанное на уровнях цитокина IL-6-типа.

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

Ниже изобретение описывается с помощью примеров, которые должны рассматриваться как всего лишь наглядные и не ограничивающие.

1. Материалы и методы

1.1. Клеточные линии и первичные клеточные культуры.

Клетки U373MG и A172 являлись щедрым подарком от J. Rich и D. Bigner, их культивировали в DMEM с 10% фетальной бычьей сывороткой (PBS). Первичная культура опухолевых клеток (англ. primary culture of tumor cells, PCTC) и нейросферы GBM были образованы как описано (Bruna et al., (2007) Cancer Cell 11, 147-160; Gunther et al., (2008) Oncogene. May 1; 27 (20): 2897-909). Вкратце, образцы опухолей обрабатывали в течение 30 минут после хирургической резекции. Растертые куски образцов человеческих глиом расщепляли 200 Ед./мл коллагеназы I (Sigma) и 500 Ед./мл ДНазы I (Sigma) в PBS в течение 2 часов при 37°C и постоянным интенсивным перемешиванием. Суспензию индивидуальных клеток фильтровали через 70 мкм клеточный фильтр (BD Falcon) и отмывали PBS. И наконец, клетки ресуспендировали и затем культивировали в DMEM с 10% FBS для культуры PCTC, или в среде для нейросфер в случае нейросфер GBM. Нейросферы нормальных человеческих нейропредшественников получали из ткани эмбриональной коры мозга человека (12-16 недель после зачатия), собранной после добровольных аборт. Образцы обрабатывали и культивировали как описано (Poltavtseva et al. (2002) Brain Res Dev Brain Res 134, 149-154). Среда для нейросфер состоит из нейробазальной среды (Gibco), дополненной B27 (Gibco), глутамином (Gibco), пенициллином/стрептомицином, и факторами роста (20 нг/мл EGF и 20 нг/мл FGF-2 (Peprotech)).

Образцы человеческих глиом и человеческих эмбриональных тканей получили из госпиталя Vall d'Hebron. Клинические протоколы были одобрены этическим комитетом (CEIC) Vall d'Hebron с информированным согласием, полученным от всех объектов.

1.2. Плазмиды и реактивы

Геномную ДНК U373MG использовали для амплификации области -634/+32 человеческого промотора LIF, который был клонирован в люциферазный вектор pGL2-basic. Делеционные конструкторы (-267/+32) и (-73/+32) получали расщеплением конструктора (-634/+32). Две точечные мутации вводили в позиции -83 п.о. и -184 п.о. в конструктор (-267/+32) для нарушения Smad-связывающих элементов (англ. Smad binding element, SBE) и получения конструктора (-267/4-32) mutSBE. TGFβ1, TGFβ2, TGFβ3 (R&D Systems), ингибитор TβRI (SB431542, Tocris), LIF (Chemicon), нейтрализующие антитела к LIF {R&D}, ингибитор JAK (тетрациклический пиридон 6 (P6) Calbiochem), система «SMART» миРНК к Smad2, Smad3 и Smad4 (Dharmacon), и контрольная миРНК «siGlo» (Dharmacon) применяли в указанных концентрациях. Антитела, специфичные к p-Smad2, Smad2, p-STAT3 (p-Tyr705) и общему STAT3 (Cell Signalling) и к Smad2, Smad3 и Smad4

(Hata et al., (2000) Cell 200, 229-240) использовали для вестерн-блоттинга.

1.3. Иммуногистохимия, ИФА и иммунопреципитация хроматина

Иммуногистохимию нейросфер и дифференцированных нейросфер осуществляли как описано (Geshwind et al., 2001) с помощью следующих антител: антитело к нестину {Chemicon), антитело к GFAP (Dako), антитело к TuJ1 (Chemicon), антитело к O4 (Chemicon), антитело к Sox2 (Chemicon), антитело к α -тубулину (Sigma). Ядра были контрокрашены 4',6-диамино-2-фенилиндолом (DAPI).

Для количественного определения уровней белка LIF, секретируемого в среду, применяли набор ИФА для определения человеческого LIF (R&D Systems), следуя описаниям производителя. Надосадочную жидкость клеток U373MG и нейросфер GBM, ранее лишенных сыворотки, собирали через 48 часов после указанной обработки. Плавающие клетки отбрасывали и 5 мл надосадочных жидкостей концентрировали с помощью мембран «Amicon Ultra-4 PLCC Ultracel-PL 5 kDa» (Millipore) до конечного объема 200 мкл.

Иммунопреципитацию хроматина осуществляли как описано (Bruna et al., упомянуто выше). Серии проксимальных и дистальных праймеров промотора LIF покрывали области (-410/-165) и (-4534/-4293), соответственно.

1.4. Анализы самообновления

Самообновление нейросфер оценивали рассеиванием одинакового числа клеток с очень низкой плотностью в лунки 96-луночного планшета. Клетки обрабатывали, в отсутствие факторов роста, указанными соединениями и подсчитывали общее количество новых нейросфер, образованных через 7 дней в культуре (Lee et al. (2008) Cancer Cell 13, 69-80; Reynolds and Weiss, (1996) Dev Biol 175, 1-13; Seaberg and van der Kooy, (2002) J Neurosci 22, 1784-1793).

1.5. Количественный ПЦР в реальном времени

Количественный ПЦР-РВ осуществляли с помощью зондов «Taqman» от «Applied Biosystems», в соответствии с рекомендациями производителя. Реакции проводили с помощью детектора последовательностей «ABI 7000» (Perkin Elmer), а результаты выражали как кратное изменение подсчитанное способом DDCT относительно контрольного образца или первого подсчитанного образца. Рибосомальная единица 18S или β -актин были использованы в качестве внутренних контролей для нормализации.

1.6. Анализы с люциферазой

Клетки A172 транзитивно трансфецировали с помощью «Lipofectamine 2000» (Invitrogen) различными конструктами-индикаторами промотора LIF и плазмидой pRL-ТК с люциферазой из Renilla (Promega) в качестве контроля для нормализации.

1.7. Анализы внутричерепных опухолей

Указанные количества клеток стереотаксически инокулировали в полосатое тело правой гемисферы мозга (1 мм вперед, 1,8 мм в бок относительно брегмы, и 3,0 мм интрапаренхимально) семинедельных самок мышей Balbc nu/nu (Charles River Laboratories). Мышей умерщвляли, когда они демонстрировали нейтральные симптомы и значительную потерю массы. Исследования проводили с помощью магнитно-резонансной томографии (МРТ) с вертикальным магнитом 9,4 Т в интерфейсе с системой «AVANCE 400» (Bruker). Под анестезией с ксилазином/кетамином, мышам делали внутривенную инъекцию контрастного агента для МРТ, гадолиний-диэтилентриаминпентауксусной кислоты, в дозе ммоль Gd/кг массы и размещали в радиочастотной катушке 18 (внутренний диаметр, 35 мм). Изображения всего мозга мыши были получены после захвата локализатором изображения по трем ортогональным осям.

1.8. Статистический анализ

Тест корреляции Спирмена использовали для анализа взаимодействий между LIF и TGFβ2, Мусаси-1, Sox2 и Нестином. Данные на графике представлены в виде среднего ± среднее квадратичное отклонение.

Пример 1

TGFβ индуцирует самообновление GIC, полученных из пациента

Для исследования воздействия TGFβ на способность самообновления GIC (клеток-инициаторов глиобластомы, англ. glioma initiating cells), клетки были получены из образцов хирургически удаленной GBM (мультиформной глиобластомы, англ. glioblastoma multiforme). Из одного образца опухоли, с одной стороны, были получены первичные культуры опухолевых клеток (англ. PCTC, primary cultures of tumor cells) в присутствии сыворотки, и параллельно, опухолевые клетки из того же образца культивировали в бессывороточной среде в присутствии EGF и FGF. Клетки, культивируемые в бессывороточной среде, дополненной EGF и FGF, быстро образовывали неадгерентные многоклеточные сферы (нейросферы), как было описано (Galli et al. (2004) Cancer Res 64, 7011-7021; Gunther et al., упомянуто выше; Lee et al., (2006) Cancer Cell 9, 391-403; Singh et al. (2003) Cancer Res 63, 5821- 5828) (фигура 1А).

Нейросферы, полученные из образцов опухоли, экспрессировали высокие уровни маркеров клеток-нейропредшественников, Мусаси-1, Sox2 и Нестин (фигура 1B), а при продвижении по пути мультилинейной дифференцировки приобретали экспрессию GFAP (маркера астроцитов), Tuj-1 (нейронального маркера) и O4 (маркера олигодендроцитов), при культивировании в присутствии сыворотки (фигура 2). Более того, нейросферы, полученные из опухолей были сильноонкогенными по сравнению с РСТС. Клетки нейросфер и РСТС ортотопически имплантировали в мозг иммуносупрессированных мышей. Опухолевый рост оценивали посредством магниторезонансной томографии (МРТ), проверяли массу мышей. Клетки нейросфер образовывали опухоли через 30-60 дней после инокуляции, что вызывало интенсивную потерю массы, тогда как РСТС не росли в опухоли в течение того же интервала времени во всех случаях (фигура 1C). Таким образом, нейросферы, полученные из образцов человеческих GBM экспрессировали маркеры клеток-нейропредшественников, демонстрируя потенциал мультилинейной дифференцировки и были сильноонкогенными. Все эти характеристики указывают на то, что нейросферы, полученные из GBM пациентов, были обогащены GIC.

Было принято решение оценить воздействие $TGF\beta$ на способность самообновления GIC нижеупомянутым хорошо описанным протоколом, основанным на способности GIC образовывать нейросферы (Reynolds and Weiss, 1996, Dev Biol. 175:1-13; Seaberg and van der Kooy, 2002, J Neurosci 22:1784-1793). Нейросферы, полученные из пациентов, диссоциировали в индивидуальные клетки, обрабатывали $TGF\beta$ или оставляли необработанными в течение 7 дней в отсутствии факторов роста, после чего подсчитывали новообразованные нейросферы и общее количество клеток. Следуя этому протоколу, оценивали воздействие $TGF\beta$ на способность самообновления GIC, полученных из трех различных пациентов. Обработка с помощью $TGF\beta$ значительно увеличивает количество нейросфер и общее количество клеток (фигура 1D, 1E, 1F). Эти эффекты блокировались, когда одновременно с $TGF\beta$ добавляли ингибитор рецептора $TGF\beta I$ ($T\beta RI$). Отдельно ингибитор $T\beta RI$ не оказывал значимого воздействия (фигура 1D, 1E, 1F). Эти результаты говорят о том, что путь $TGF\beta$ усиливает самообновление GIC.

Пример 2

$TGF\beta$ индуцирует экспрессию LIF в клетках человеческой GBM

Было принято решение исследовать молекулярные механизмы, ответственные за воздействие $TGF\beta$ на GIC. В клетках GBM изучали генные ответы на $TGF\beta$, которые

могут быть вовлечены в регуляцию самообновления GIC. В предшествующей работе (Bruna et al., 2007), анализы транскриптома проводили в клеточной линии глиомы U373MG, обработанной TGF β и/или ингибитором T β RI. В U373MG LIF был среди 63 генных ответов на TGF β , зависящих от активности T β RI. Сигнальный путь LIF-LIFR/gp130-JAK-STAT вовлечен в самообновление стволовых клеток, как эмбриональных стволовых клеток (Niwa et al., 1998, *Genes Dev*, 12: 2048-2060; Williams et al., 1988, *Nature*, 336:684-687), так и клеток-нейропредшественников (Bauer and Paterson, 2006, *J Neurosci*, 26:12089-12099; Molne et al., 2000, *J Neurosci Res*, 59:301-311; Wright et al., 2003, *J. Neurochem*, 86:179-195) в связи с чем было высказано предположение о том, что LIF может опосредовать воздействие TGF β на GIC. Впервые было показано, что опосредуемая TGF β индукция транскрипта LIF наблюдается в опухолевых клетках, полученных из пациентов. Панель PCTC, полученная из 11 различных человеческих GBM, обрабатывали TGF β в течение 3 часов и определяли уровни мРНК LIF. TGF β индуцирует LIF во всех проанализированных PCTC (фигура 3A). Эти результаты указывают на то, что индукция LIF посредством TGF β является обычным феноменом, который имеет место в большинстве человеческих GBM. Более того, TGF β был способен индуцировать транскрипт LIF в нейросферах, полученных из пациентов (фигура 3B) и данное воздействие зависело от активности T β RI, поскольку индукция LIF посредством TGF β блокировалась в присутствии ингибитора T β RI (фигура 3C). Три представителя семейства TGF β (TGF β 1, TGF β 2, and TGF β 3) оказались способны индуцировать LIF в нейросферах, полученных из пациентов (фигура 3D) и, как и ожидалось, индукция транскрипта LIF посредством TGF β приводит к увеличению секреции белка LIF, при измерении его с помощью ИФА в кондиционированной среде для нейросфер (фигура 3E).

Пример 3

TGF β индуцирует экспрессию LIF через активированный комплекс Smad, который связывается с промотором LIF

Для исследования транскрипционной регуляции LIF посредством TGF β , промотор человеческого LIF клонировали в репортерный конструктор pGL2-basic. В клетках U373MG TGF β оказался способен трансаktivировать репортерные конструкторы, которые содержат -634/+32 и -276/+32 области промотора LIF. Фрагмент -73/+32 промотора LIF потерял транскрипционный ответ на TGF β , что указывает на то, что элемент ответа на TGF β включен в область -276/-73 (фигура 4A, 4B). Данная область содержит одиночный Smad-связывающий элемент (SBE, 5'GTCT-3') вблизи сайта связывания SP1 (фигура 4A). SBE мутировали и наблюдали устранение ответа на TGF β (фигура 4B), что указывает на то, что для индукции транскрипции активированный комплекс Smad связывает проксимальный SBE в промоторе LIF. Осуществляли анализы иммунопреципитации хроматина (ChIP) и наблюдали, что эндогенный Smad2 связывает проксимальную область промотора LIF и не связывает дистальную область на 4 тыс. п.о. выше участка инициации транскрипции в клетке, обработанной TGF β (фигура 4C). Для того чтобы окончательно продемонстрировать то, что Smad вовлечен в индукцию экспрессии LIF посредством TGF β , Smad2, Smad3, Smad2 и 3, и Smad4 подвергали сайленсингу с помощью РНК интерференции. Индукция LIF посредством TGF β снижалась при уменьшении уровней Smad2 и Smad3, или Smad4, что указывает на то, что активированный комплекс Smad требуется для транскрипционного ответа LIF на TGF β (фигура 4D). Smad2 и Smad3 являются избыточными в этом процессе поскольку сайленсинг каждого Smad отдельно не оказывает значимого влияния на уровни LIF, индуцированные TGF β (фигура 4D). Как и ожидалось, индукция LIF посредством TGF β в нейросферах, полученных из пациентов, также зависела от Smad. Сайленсинг Smad4 в человеческих GBM устраняет ответ LIF на TGF β (фигура 4E).

Пример 4

TGF β индуцирует путь JAK-STAT посредством индукции LIF в нейросферах, полученных из пациентов

В целях определения, является ли сигнальный путь LIF функциональным в нейросферах GBM, нейросферы обрабатывали рекомбинантным LIF и определяли уровни фосфорилирования расположенного ниже по сигнальному пути субстрата рецепторного комплекса LIF, STAT3. Рекомбинантный LIF индуцирует быстрое

фосфорилирование STAT3, что говорит о том, что нейросферы, полученные из пациентов, экспрессируют функциональный комплекс рецептора LIF (фигура 5A). Более того, индукция p-STAT3 устранялась в присутствии фармакологического JAK-специфического тетрациклического пиридона 6 (P6) (Pedranzini et al., 2006, Cancer Res, 66: 9714-9721; Thompson et al., 2002, Bioorg Med Chem Lett, 12:1219-1223) (фигура 5B). Интересно, что TGF β индуцирует фосфорилирование STAT3 в нейросферах GBM, а ингибитор T β RI препятствует этому воздействию (фигура 5C). Было принято решение оценить опосредует ли LIF индукцию p-STAT3 посредством TGF β . Для этой цели, нейтрализующее антитело против LIF использовали для специфической блокировки воздействия секретируемого LIF на клетки, обработанные TGF β . Присутствие нейтрализующего антитела к LIF снижает индукцию p-STAT3 посредством TGF β . Более того, уровни p-STAT3 в клетках, обработанных TGF β , репрессировались обработкой P6 (фигура 5D). Эти данные указывают на то, что TGF β способен активировать путь JAK-STAT в нейросферах, полученных из пациентов, посредством индукции секреции LIF, который действует через аутокринную/паракринную петлю.

Пример 5

LIF опосредует индукцию самообновления GIC посредством TGF β

Было принято решение оценить опосредуют ли LIF и сигнальный путь JAK-STAT повышение самообновления GIC посредством TGF β . Для этой цели, нейтрализующее антитело против LIF и P6 использовали для специфической блокировки воздействия секретируемого LIF на клетки, обработанные TGF β . Нейросферы диссоциировали на индивидуальные клетки и обрабатывали TGF β , рекомбинантным LIF, антителами к LIF и/или P6. Подсчитывали вновь образованные нейросферы и общее количество клеток. Рекомбинантный LIF повышал количество вновь образованных нейросфер, а также общее число клеток, указывая на то, что LIF индуцирует самообновление GIC (фигуры 6A, 6B, 6C). Обработка нейтрализующим антителом к LIF снижает индукцию самообновления GIC посредством TGF β . Более того, P6 репрессировал воздействие TGF β на самообновление GIC, что указывает на то, что воздействие TGF β на самообновление зависит от активности JAK (фигура 6A, 6B, 6C). В целом, эти данные говорят о том, что TGF β индуцирует способность к самообновлению GIC, полученных из пациентов, через путь LIF-JAK-STAT.

Пример 6

TGF β предотвращает дифференцировку GIC с помощью LIF

Нейросферы, полученные из GBM, выращенные в отсутствии факторов роста и рассеянные в покрытых полилизинном чашках имеют тенденцию к дифференцировке с потерей экспрессии маркеров нейропредшественников Мусаси-1, Sox2 и Нестина, и к прикреплению к культуральной чашке. Было принято решение оценить воздействие TGF β и LIF на этот процесс дифференцировки. Нейросферы культивировали в присутствии TGF β или LIF без EGF или FGF в течение 7 дней, а затем процессировали для иммуногистохимического окрашивания и количественной ПЦР-РВ для определения уровней маркеров-нейропредшественников Мусаси-1, Sox-2 и Нестина. Нейросферы, обработанные TGF β или LIF, отличались морфологически от контрольных клеток тем, что они были меньше прикреплены к культуральной чашке, сохраняя сферическую форму. Более того, клетки, обработанные TGF β или LIF, поддерживают экспрессию Мусаси-1, Sox2 и Нестина, обнаруженную иммуногистохимическими анализами (фигура 7А) и определяемую количественной ПЦР-РВ (фигура 7В). Это указывает на то, что TGF β и LIF являются факторами, которые не только регулируют самообновление GIC, но также вовлечены в предотвращение дифференцировки GIC.

Пример 7

Воздействие TGF β и LIF на нормальные человеческие нейропредшественники

Эти данные указывают на то, что TGF β и LIF регулировали самообновление и дифференцировку GIC. Было принято решение оценить было ли это воздействие специфичным для опухолевых клеток, или оно также присутствует в нормальных клетках-нейропредшественниках. Для ответа на этот вопрос, клетки-нейропредшественники, получали из образцов человеческой эмбриональной коры мозга (от 12 до 16 недель после оплодотворения). Ранее было описано (Carpenter et al., 1999, Exp Neurol, 158: 265-278; Poltavtseva et al., 2002, Brain Res Dev Brain Res, 134: 149-154; Wright et al., 2003, J Neurochem, 86: 179-195), что нейросферы, полученные из человеческих нейропредшественников, при их выращивании в бессывороточной среде, дополненной EGF и FGF, экспрессируют Мусаси-1, Sox-2, Нестин подобно нейросферам GBM (фигура 8А). Во-первых, была определена индукция LIF посредством TGF β в нормальных человеческих нейропредшественниках. Нормальные нейросферы не индуцируют LIF в ответ на TGF β 1, TGF β 2 или TGF β 3 по сравнению с нейросферами GBM (фигура 8В). Более того, TGF β не индуцирует LIF в мышинных нейропредшественниках, полученных из мышинных эмбрионов или из субвентрикулярной области взрослых мышей (данные не показаны). Это указывает на то, что индукция LIF посредством TGF β

является специфичной для нейросфер GBM. Как и ожидалось, поскольку TGF β не индуцировал LIF, TGF β не повышал способность к самообновлению нормальных нейропредшественников, и количество и размер нейросфер нейропредшественников не увеличивались обработкой TGF β . Фактически нейросферы, обработанные TGF β , были меньше и общее количество клеток снизилось из-за присутствия TGF β (фигура 8C, 8D). С другой стороны, LIF увеличил количество и размер новообразованных нейросфер, а также общее количество клеток (фигура 8C, 8D) в соответствии с предшествующими работами (Bauer and Patterson, 2006; Wright et al., 2003). Таким образом, LIF обладает одинаковым воздействием на самообновление GBM и нормальных нейросфер. И наоборот, существует различие в воздействии TGF β на способность самообновления нормальных и опухолевых нейросфер из-за неспособности TGF β индуцировать LIF в нормальных нейропредшественниках.

Пример 8

Экспрессия LIF в человеческих глиомах коррелирует с TGF β 2 и маркерами нейропредшественников

Для оценки экспрессии LIF в человеческих глиомах, анализировали уровни LIF в панели из 39 глиом. Было отмечено, что LIF экспрессировался в 17, и был сильно экспрессирован в 4-6 из 39 глиом (фигура 9A), что указывает на то, что большая часть человеческих глиом экспрессирует LIF. Поскольку LIF индуцируется TGF β и в предыдущих работах было установлено, что TGF β 2 ответственен за высокую активность TGF β , наблюдаемую в глиомах (Bruna et al., 2007, упомянуто выше), было принято решение оценить вовлечение TGF β 2 в экспрессию LIF. То, что уровни LIF коррелировали с TGF β 2 в панели глиом, дополнительно подтверждая тот факт, что TGF β 2 ответственен за индукцию LIF в человеческих глиомах (фигура 9A, B). Если LIF промотирует самообновление GIC, то опухоли, которые экспрессируют высокие уровни LIF, должны быть обогащены группой клеток данного типа. Для проверки данной гипотезы, уровни LIF сравнивали с экспрессией маркеров GIC/нейропредшественников. Уровни LIF коррелируют с экспрессией Мусаси-1 и Нестина, но не Sox2 (фигура 9A, B), что указывает на то, что LIF активизирует самообновление GIC и увеличивает группу GIC, присутствующую в опухолевой массе.

Пример 9

Пациенты с глиомой или глиобластомой имеют более короткую общую продолжительность жизни

В подмножестве всех пациентов с глиомой, уровни LIF положительно регулированы ≥ 2 раза. В течение определенного периода времени, эти пациенты имеют значимо сниженную вероятность выживания по сравнению с контрольными пациентами. Например, вероятность выживания через 1000 дней снижается примерно на 50% по сравнению со всеми пациентами с глиомой, и до примерно 35% по сравнению с пациентами с глиомой с уровнями LIF, которые положительно не регулированы ≥ 2 раза (фигура 10). Данные получены из программы репозитория молекулярных данных неоплазии мозга (англ. REpository for Molecular BRAin Neoplasia DaTa (REMBRANDT)) Национальный институт рака.

В подмножестве все пациентов с глиобластомой, уровни LIF положительно регулированы ≥ 9 раз. В течение определенного периода времени, эти пациенты имеют значимо сниженную вероятность выживания по сравнению с контрольными пациентами. Например, вероятность выживания через 500 дней снижается примерно на 50% по сравнению со всеми пациентами с глиобластомой (фигура 11). Данные получены из программы репозитория молекулярных данных неоплазии мозга (англ. REpository for Molecular BRAin Neoplasia DaTa (REMBRANDT)) Национальный институт рака.

Пример 10

Уровни мРНК LIF аномально высоки в различных типах опухолей

Некоторые пациенты с определенными типами опухолей имеют аберрантно высокие уровни LIF, на что указывает аберрантно высокие уровни мРНК LIF (фигура 12). Данные получены у биоинформатической команды «GeneSapiens» (www.genesapiens.org).

Это указывает на то, что LIF может обеспечить селективное преимущество в прогрессии различных типов опухолей. Типы опухолей из ≥ 10 проверенных пациентов имеющие уровни мРНК LIF выше величины ошибки: пре-В клеточный острый лимфолейкоз (В-ОЛЛ), острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), глиома, аденокарцинома легкого, колоректальная карцинома, рак мочевого пузыря, протоковый рак молочной железы и карцинома молочной железы.

В этих пациентах с опухолями, экспрессирующими высокие уровни LIF, LIF может действовать как онкогенный фактор посредством регуляции злокачественных опухолевых стволовых клеток. Таким образом, блокада LIF может быть полезна в данной группе опухолей, и LIF также может быть использован в качестве диагностического и/или прогностического фактора в этих пациентах.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения рака, характеризующегося наличием высоких уровней LIF, включающий введение агента, ингибирующего LIF, выбранного из анти-LIF антитела или анти-LIF миРНК.

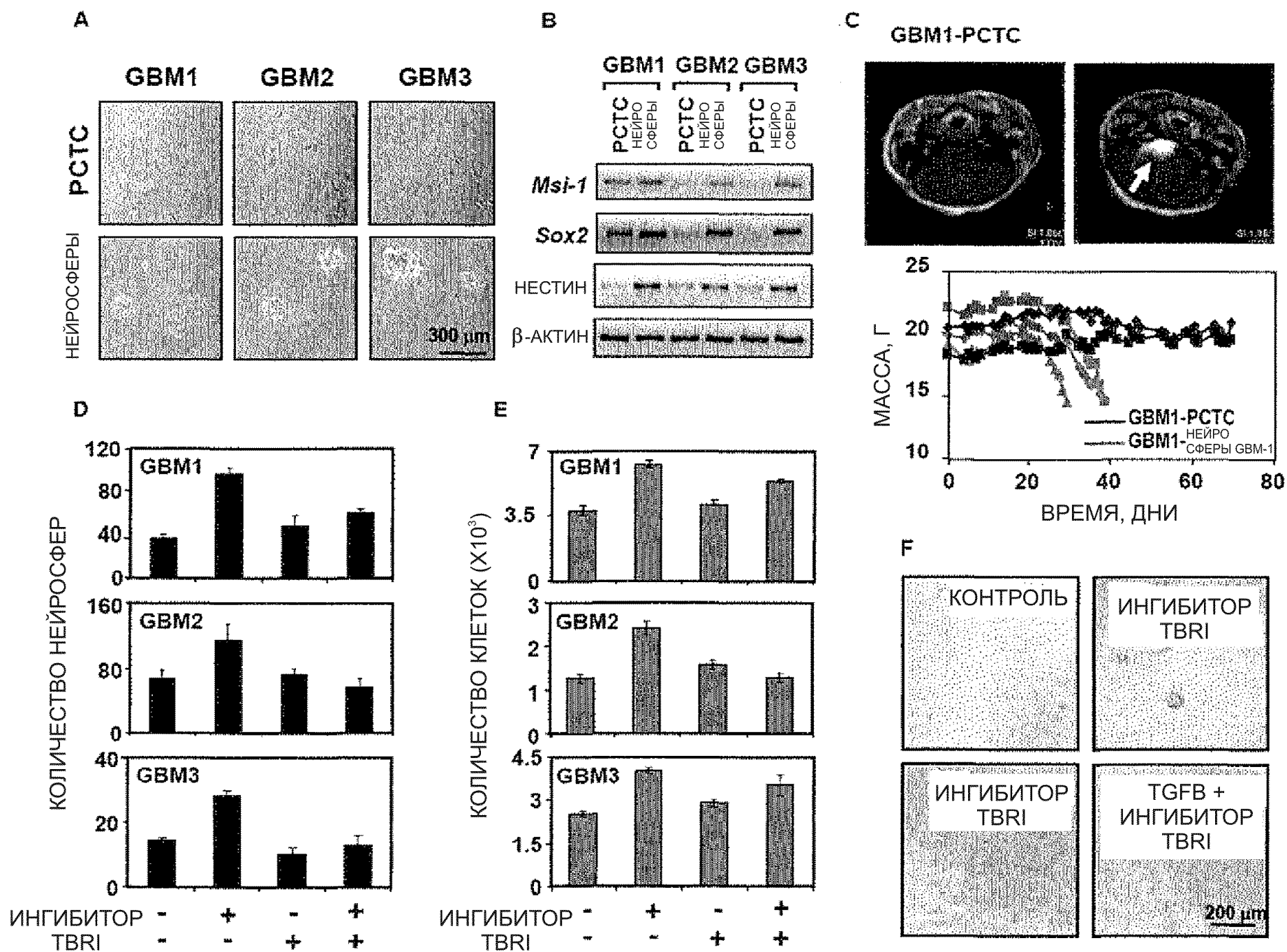
2. Способ по п. 1, в котором антитело действует через ингибирование самообновления опухолевых стволовых клеток.

3. Способ по п. 1 или п. 2, в котором рак вызывается высокой активностью сигнального пути JAK-STAT.

4. Способ по п. 3, в котором рак представляет собой пре-В-клеточный острый лимфобластный лейкоз (В-АЛЛ), пре-Т-клеточный острый лимфобластный лейкоз (Т-АЛЛ), В-клеточный хронический лимфолейкоз (В-ХЛЛ); острый миелоидный лейкоз (ОМЛ); плазмоклеточный лейкоз; миелома; В-клеточная лимфома; лимфома Беркитта; Т-клеточная лимфома; хондросаркома; остеосаркома; саркома Юинга; синовиальная саркома; лейомиосаркома; рабдомиосаркома; липосаркома; саркома, без дополнительных уточнений (БДУ); кожная плоскоклеточная карцинома; меланома; глиома; нейробластома; злокачественная опухоль оболочек периферических нервов (ЗООПН); хордома; плоскоклеточная карцинома полости рта; плоскоклеточная карцинома гортаноглотки; карцинома околоушной железы; аденокарцинома легкого; крупноклеточный рак легкого; мелкоклеточный рак легкого; плоскоклеточная карцинома легкого; карциноидная опухоль легкого; мезотелиома; аденокарцинома пищевода; аденокарцинома желудка; желудочно-кишечная стромальная опухоль (ЖКСО); аденокарцинома тонкой кишки; колоректальная карцинома; рак печени; рак поджелудочной железы; опухоли надпочечников; карцинома щитовидной железы; онкоцитомы почки; рак почки; нефробластома; рак мочевого пузыря; семинома яичка; несеминома яичка, аденокарцинома предстательной железы; протоковый рак молочной железы; лобулярный (дольковый) рак молочной железы; медуллярный рак молочной железы; другой рак молочной железы; карцинома молочной железы, БДУ, светлоклеточная карцинома яичников; эндометриоидный рак яичников; герминома яичников; слизистая карцинома яичника; серозная карцинома яичников; аденокарцинома яичников, без дополнительного уточнения (БДУ); другая опухоль яичника; аденокарцинома брюшины; саркома матки; аденокарцинома матки; плоскоклеточная карцинома матки; мюллерова опухоль матки; аденокарцинома шейки матки; плоскоклеточная карцинома шейки матки; карцинома вагины/вульвы.

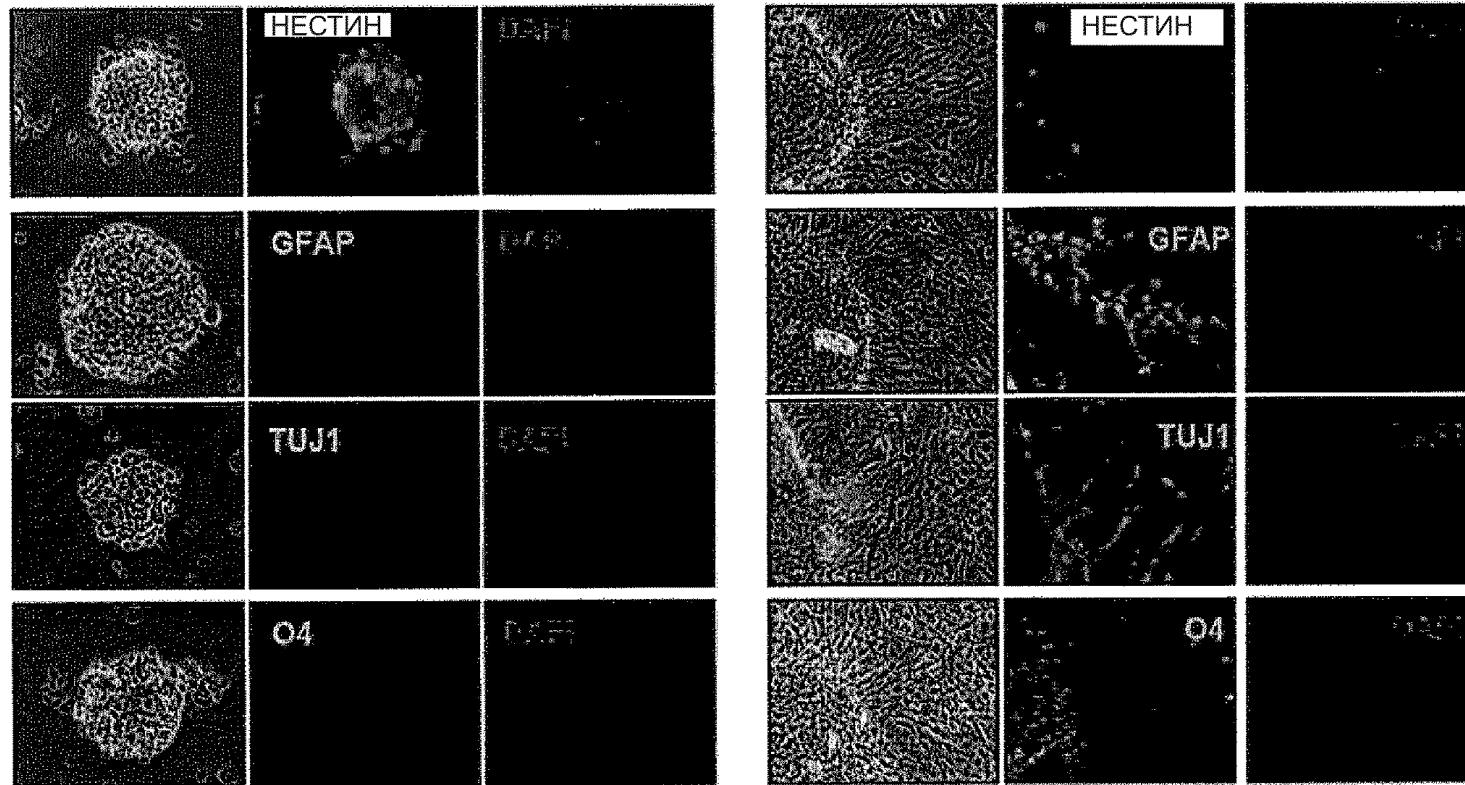
5. Способ по п. 1, в котором рак представляет собой рак поджелудочной железы.

6. Фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество агента, ингибирующего LIF, вместе с фармацевтически приемлемым носителем, для ее применения в способе по любому из п.п. 1-5, где ингибирующий агент выбран из антитела и миРНК.

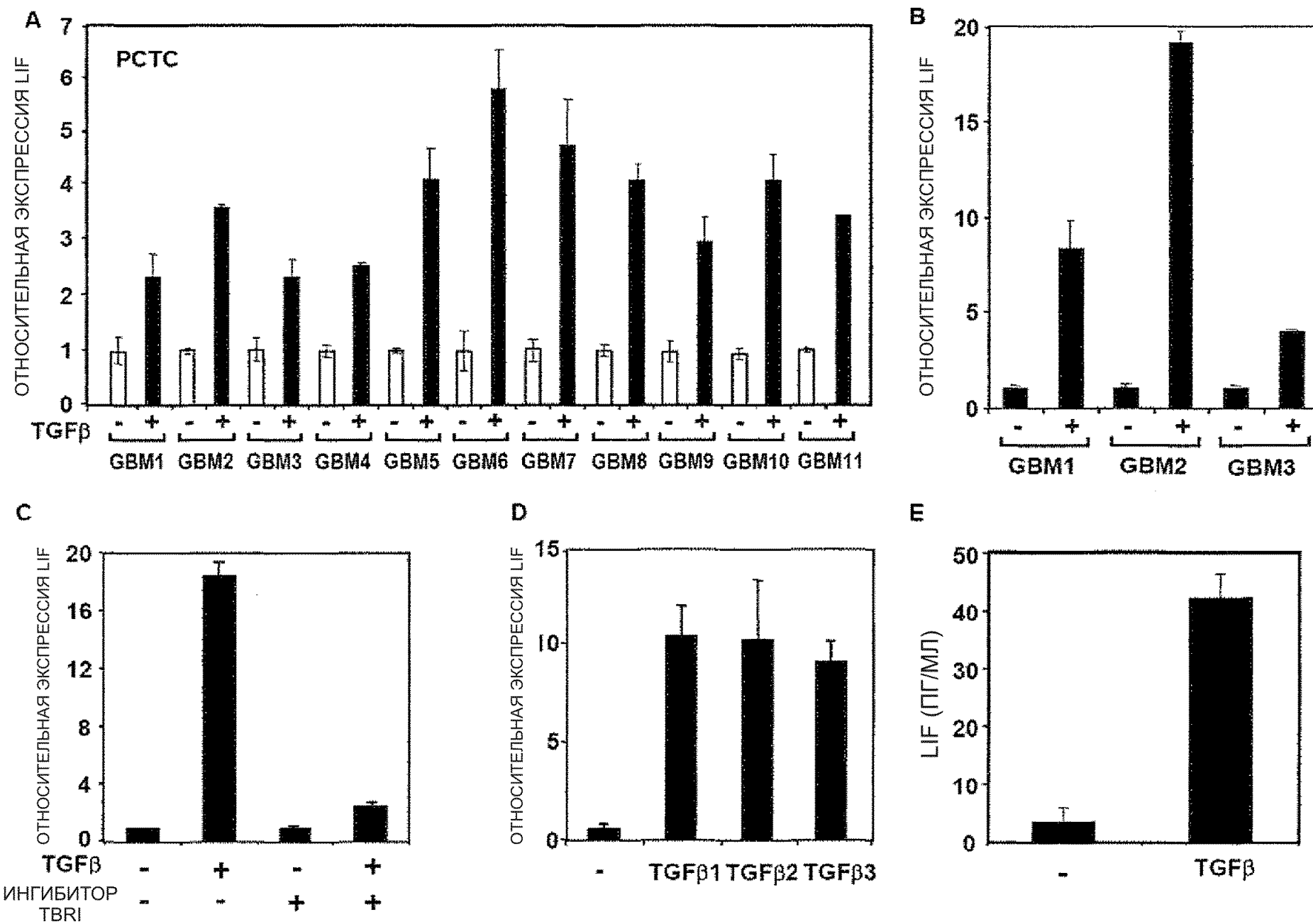


Фиг. 1

НЕЙРОСФЕРЫ GBM-1

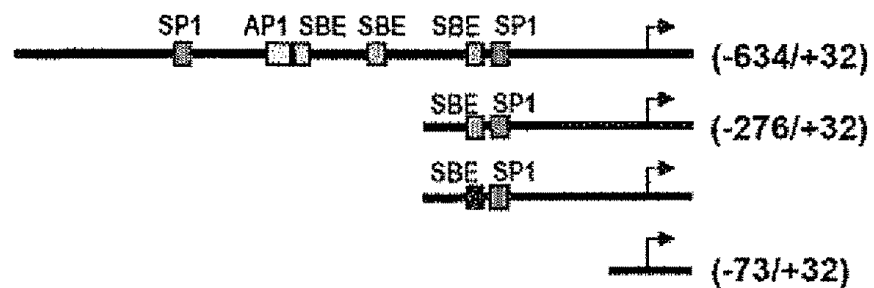
НЕЙРОСФЕРЫ GBM-1, ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫЕ В
СЫВОРОТКЕ

Фиг. 2

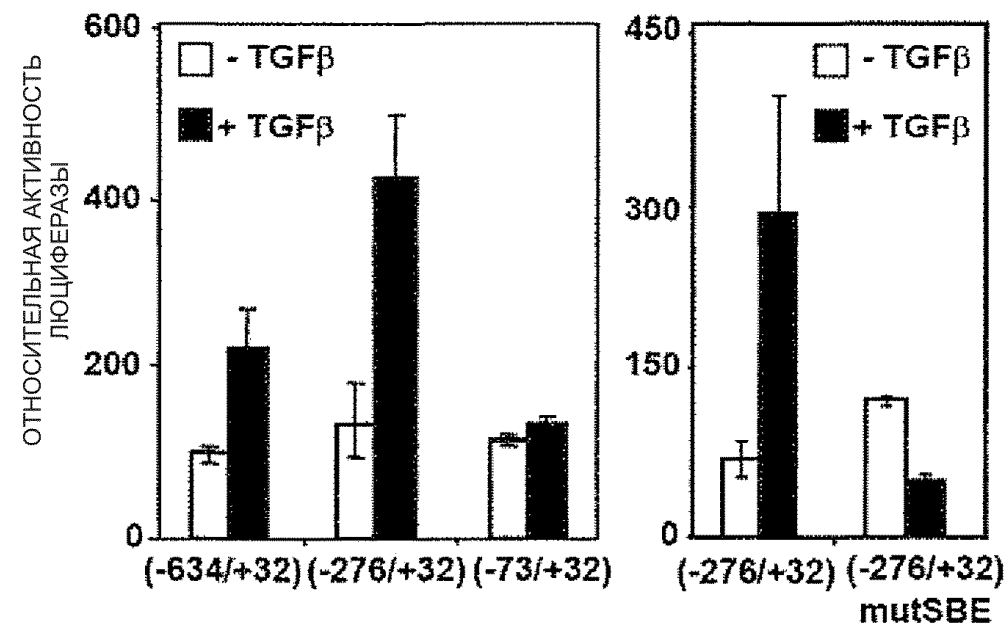


Фиг. 3

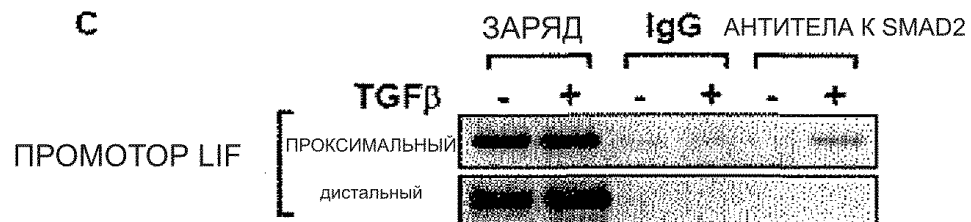
A



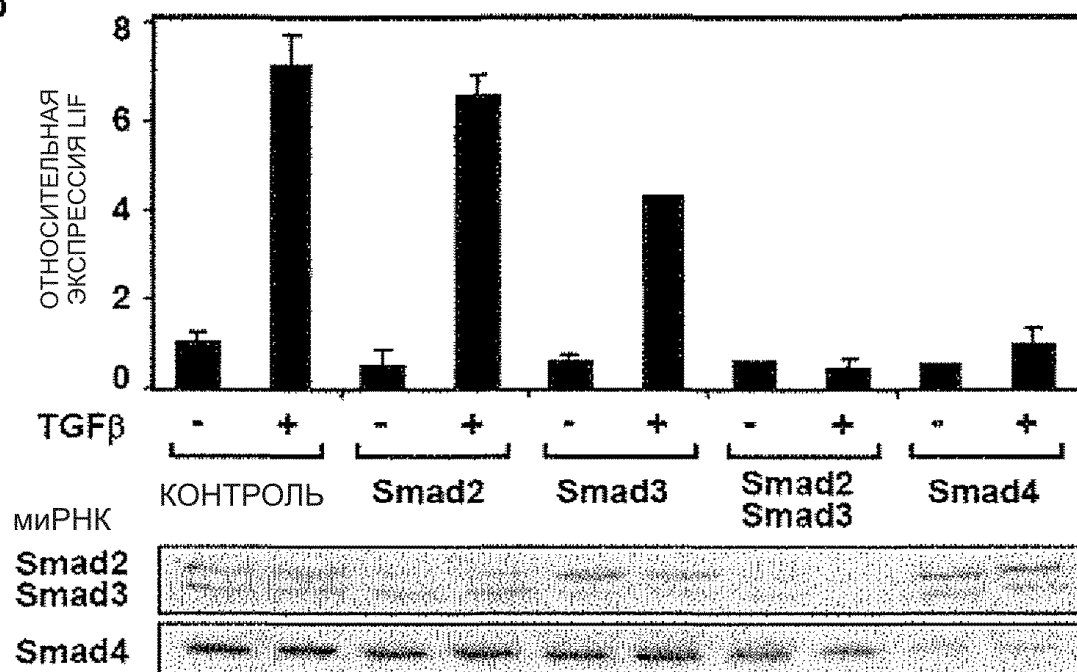
B



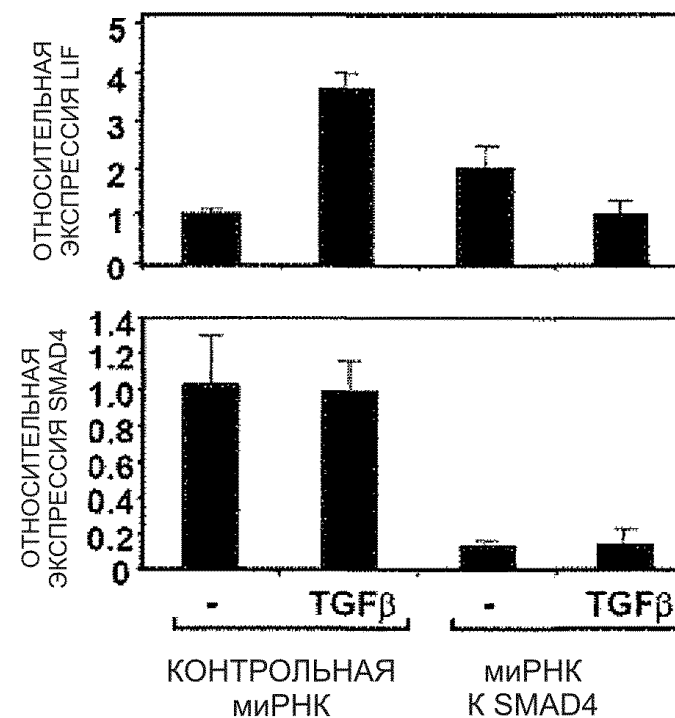
C



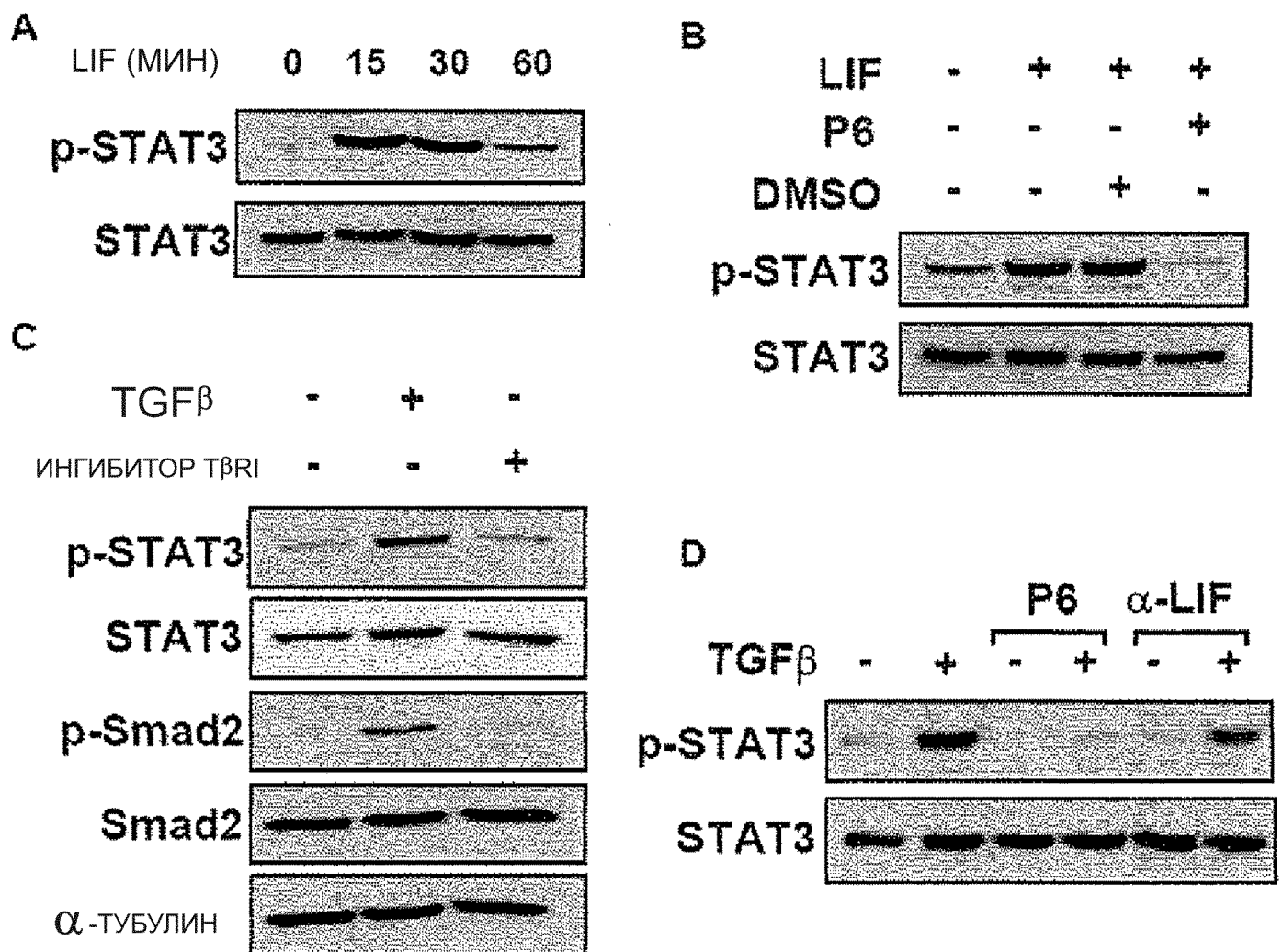
D



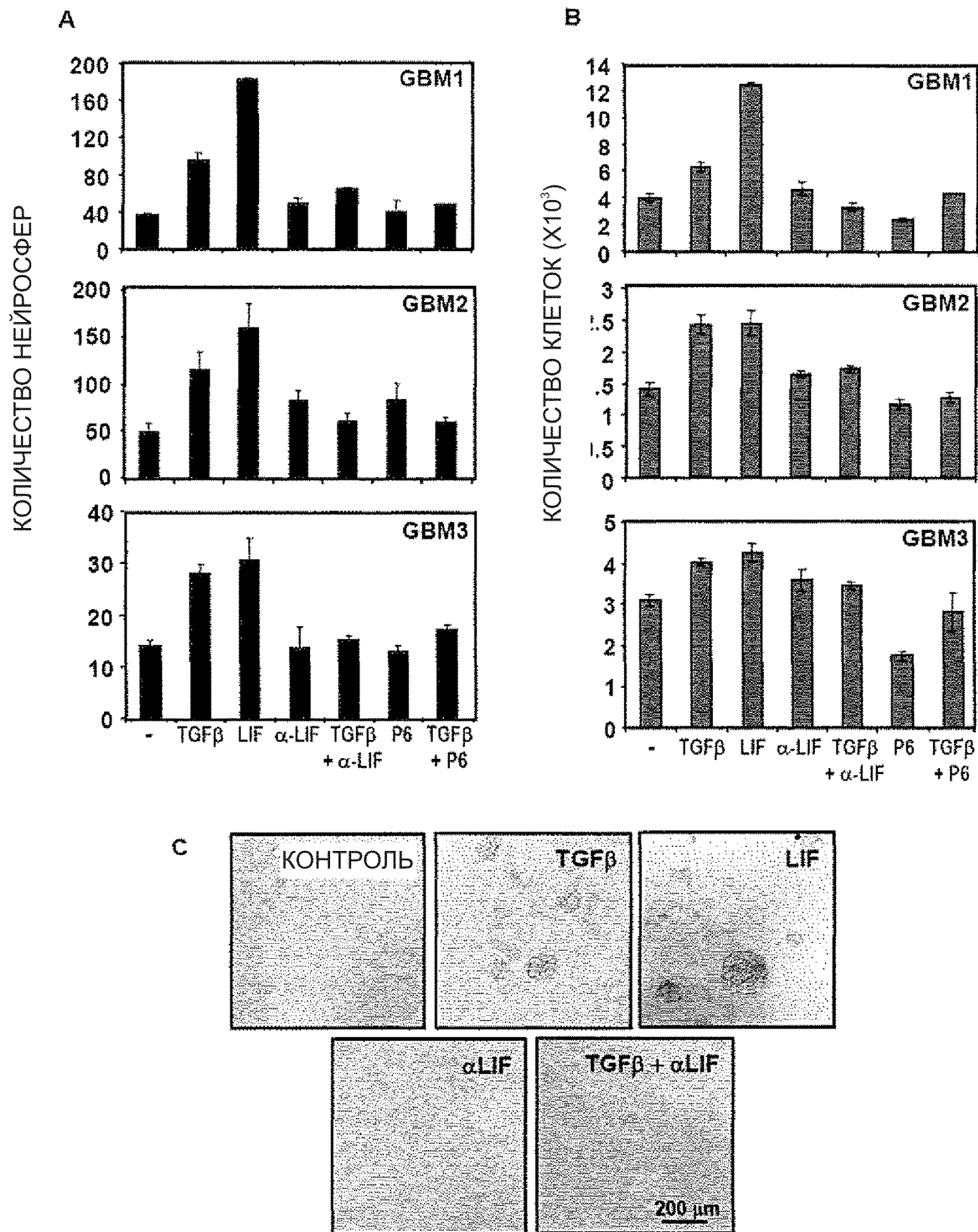
E



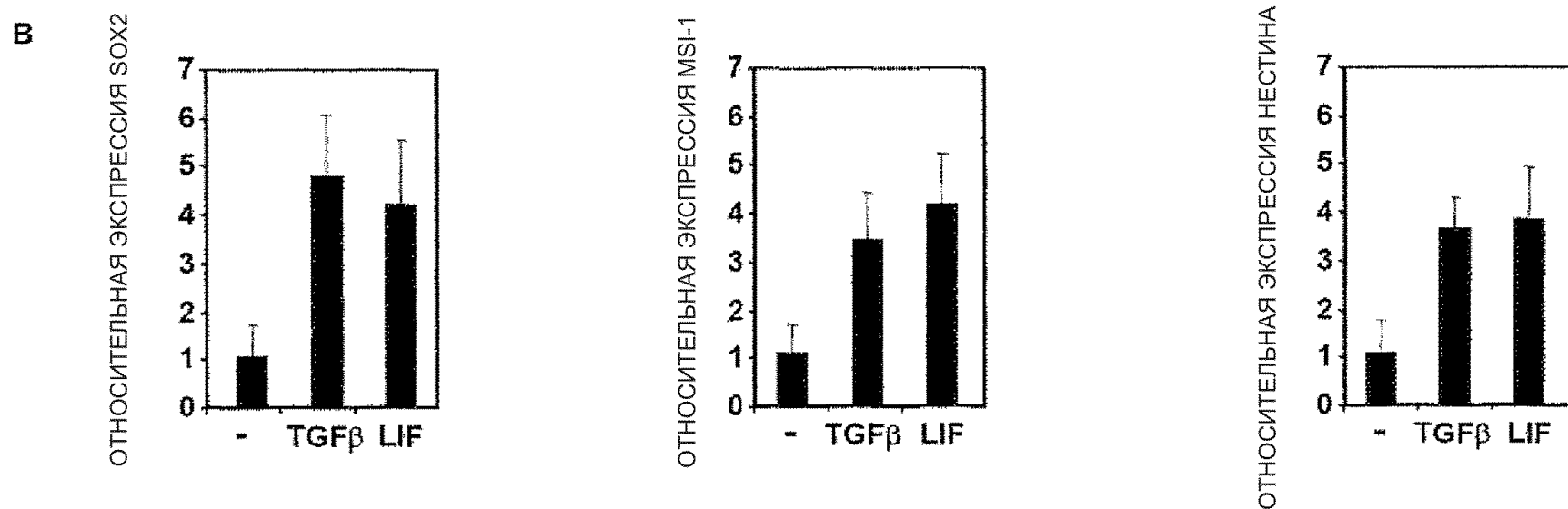
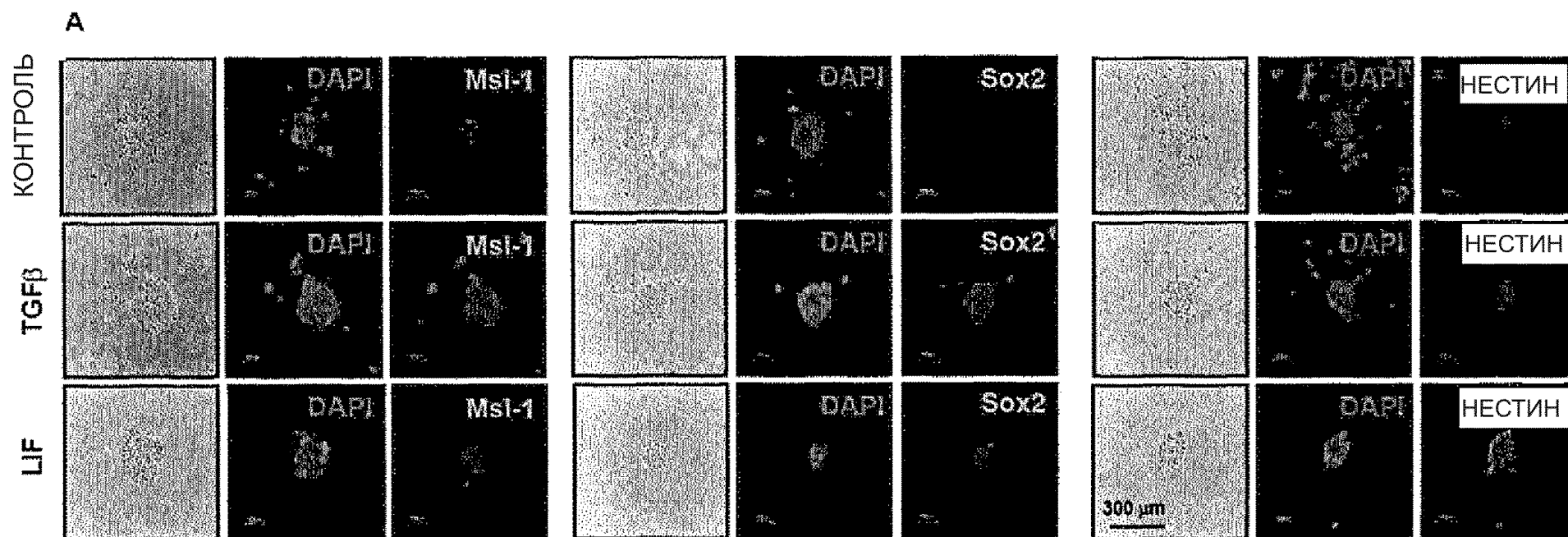
ФИГ. 4



Фиг. 5

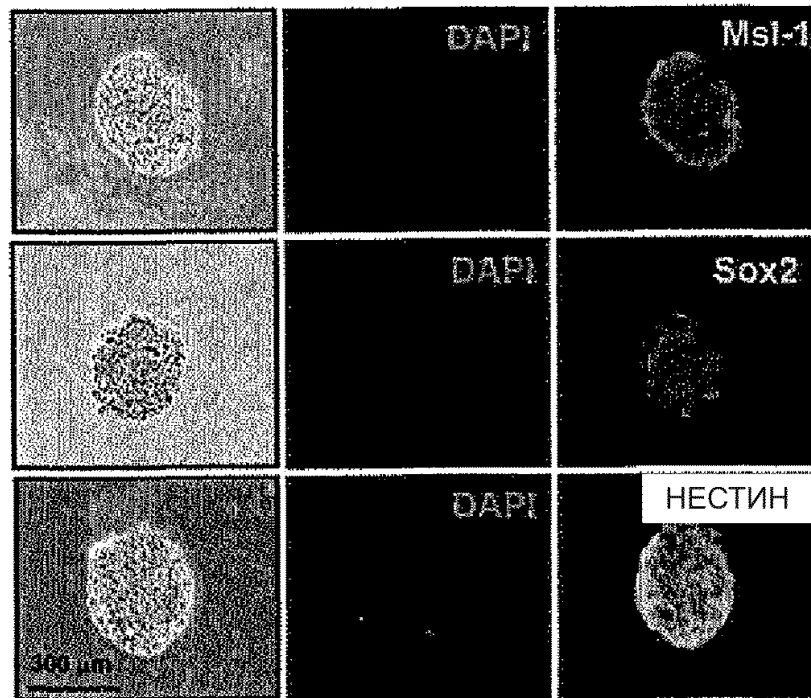


Фиг. 6

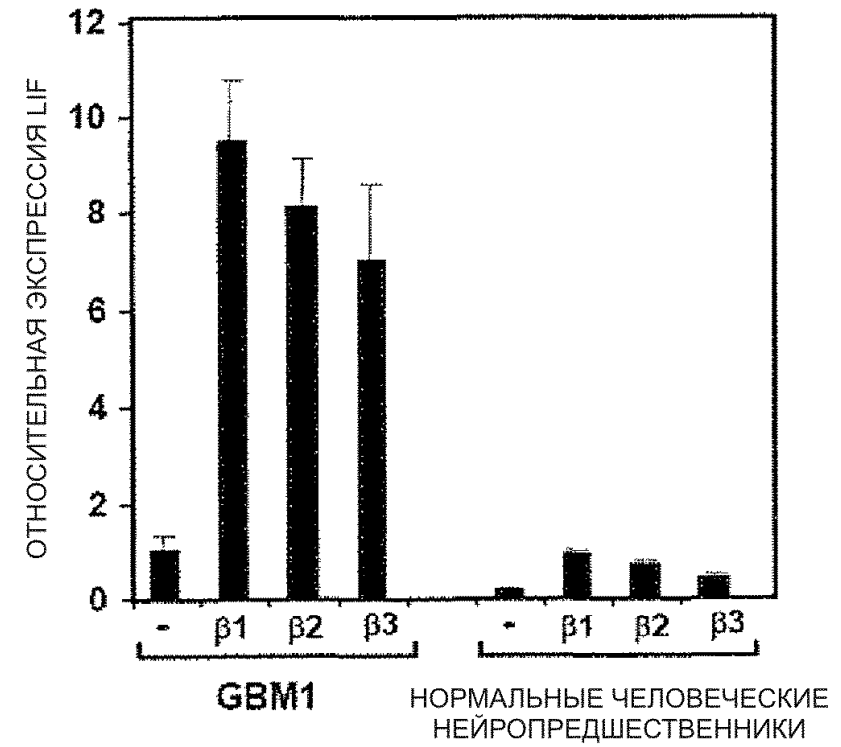


Фиг. 7

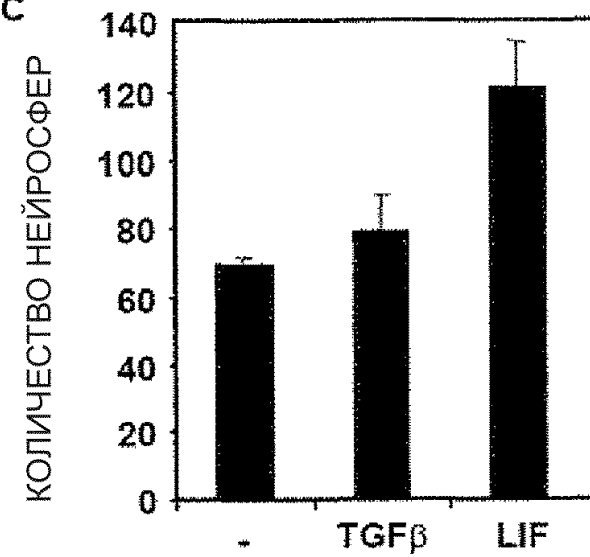
A



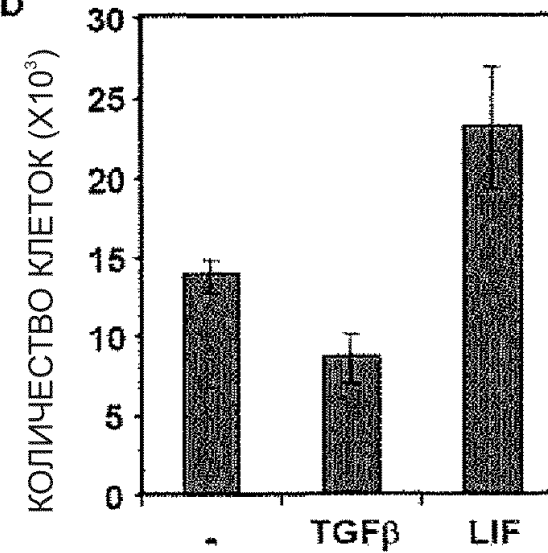
B



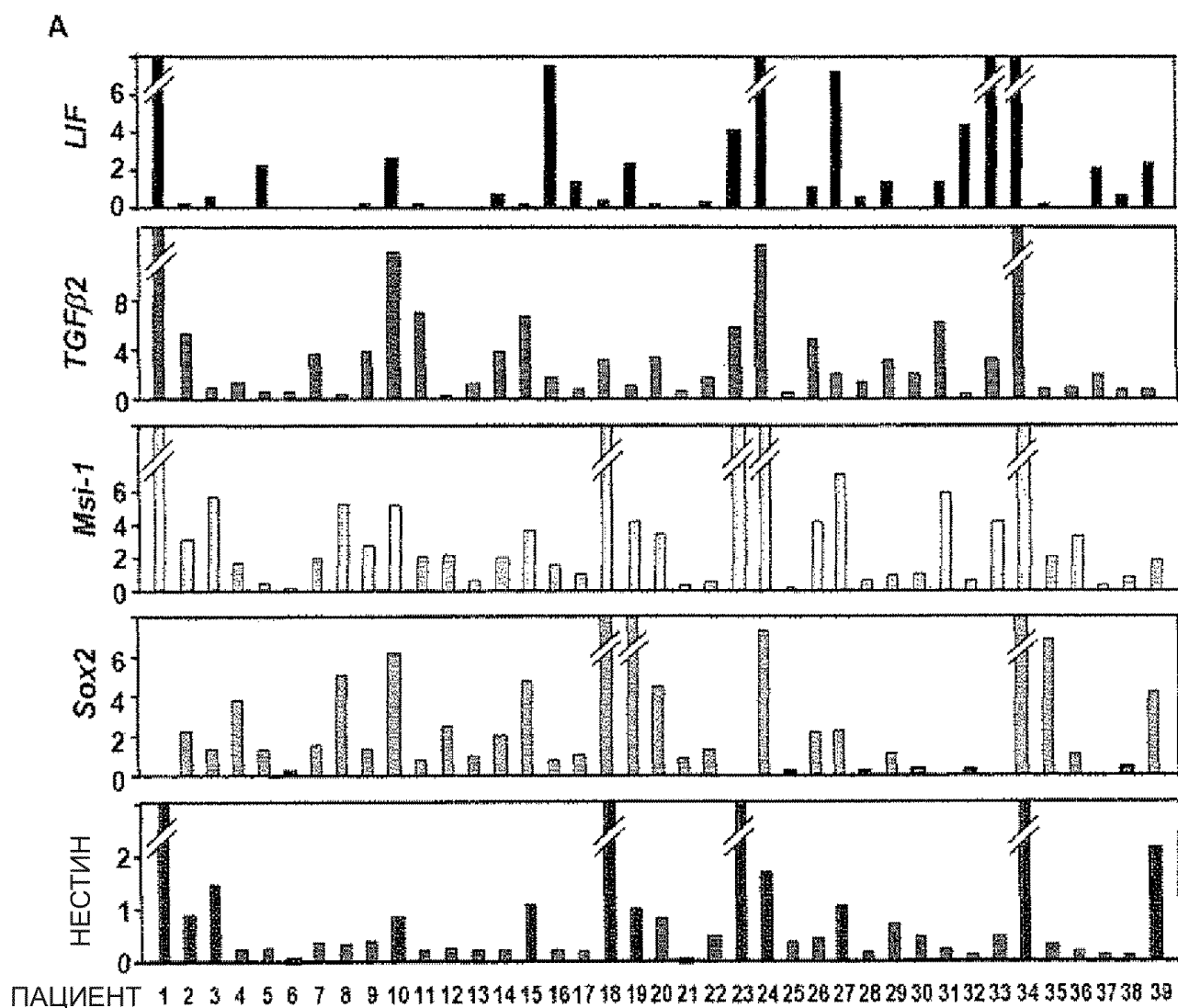
C



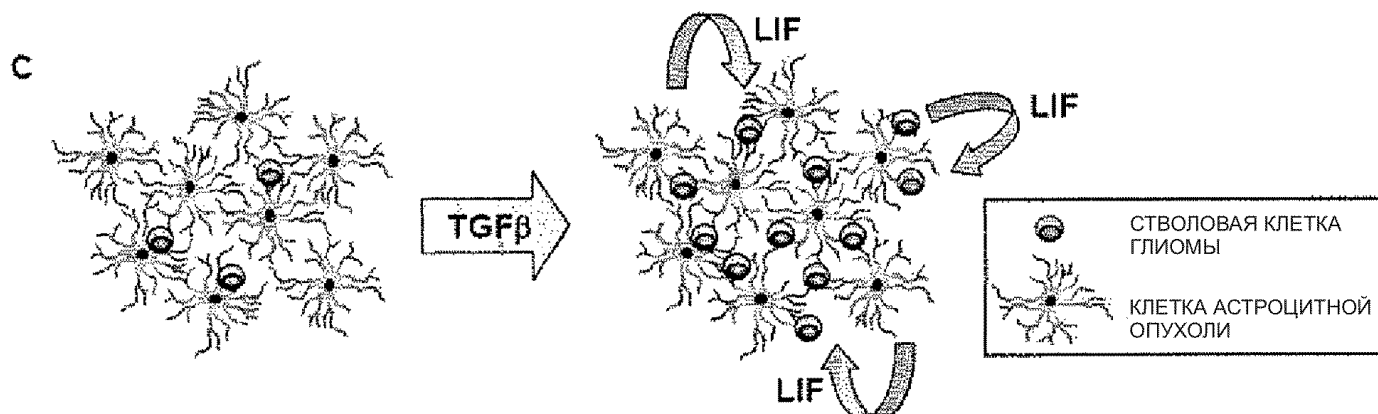
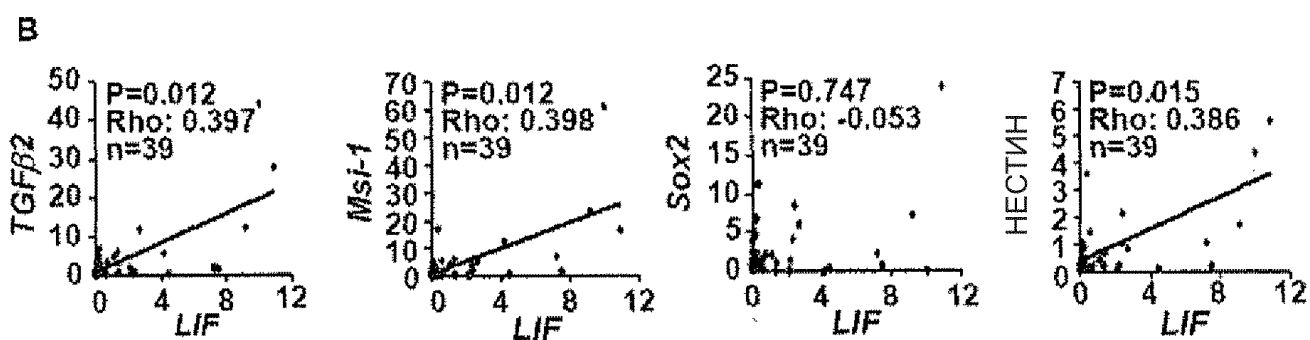
D

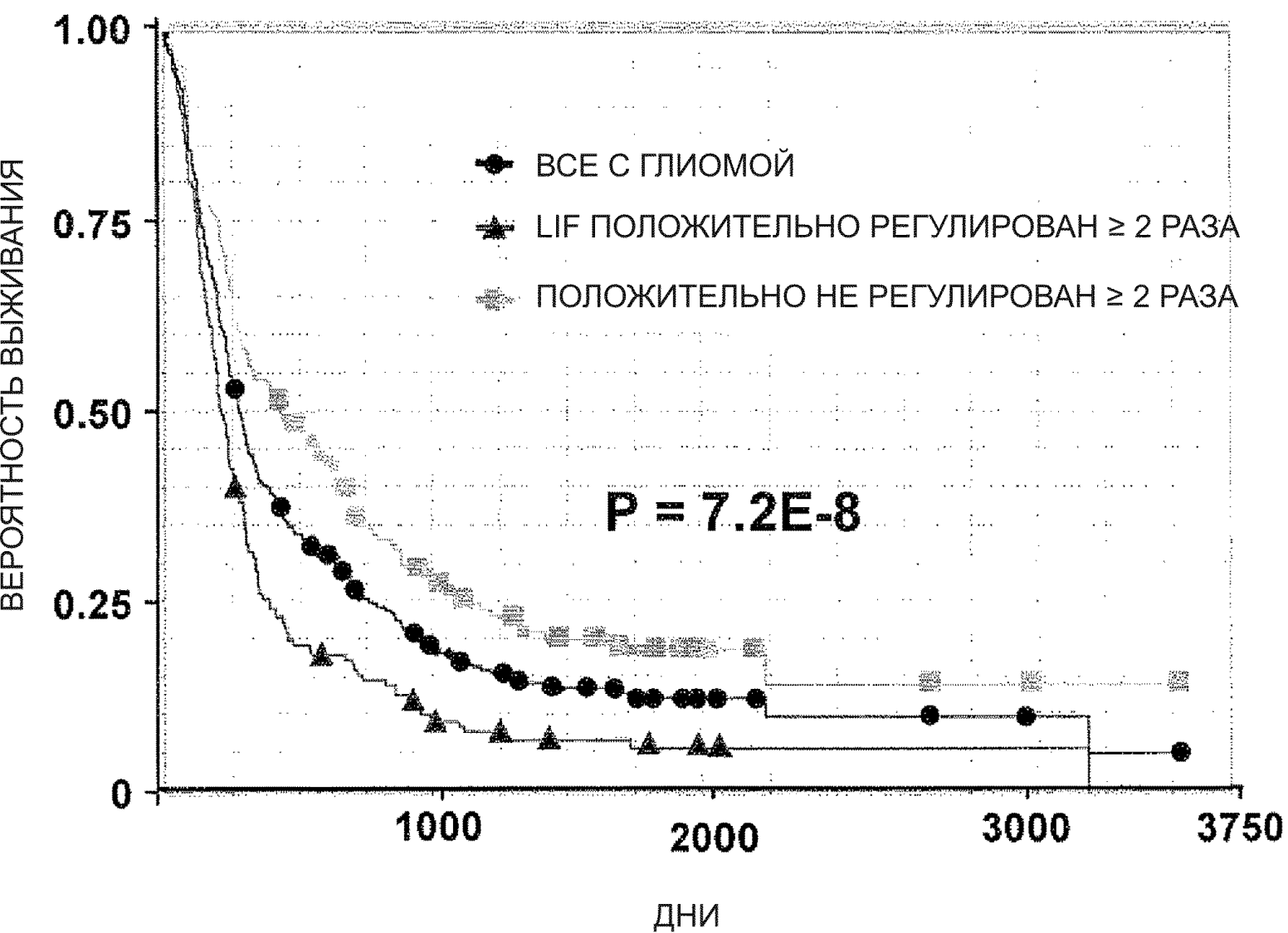


Фиг. 8

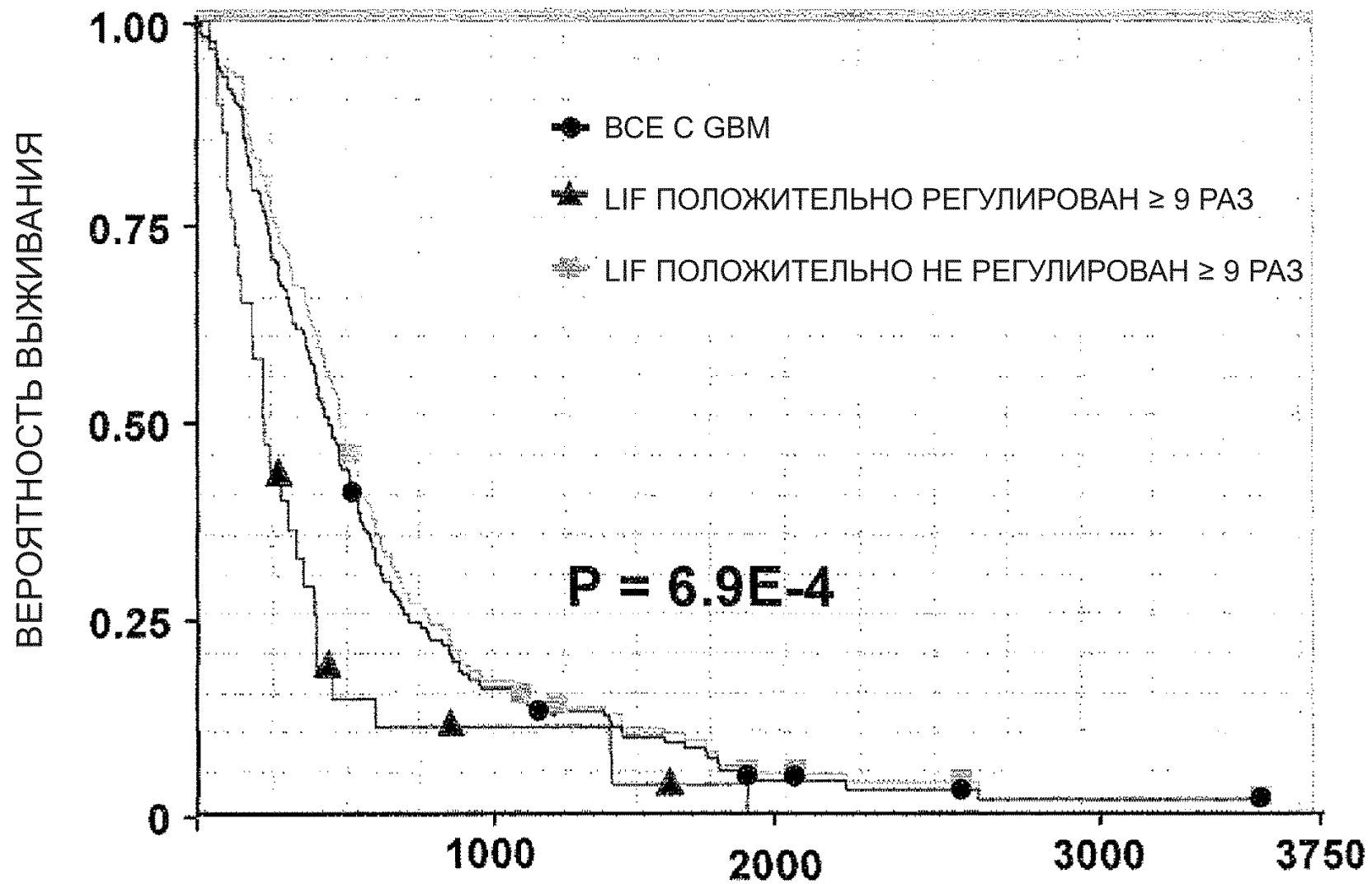


Фиг. 9

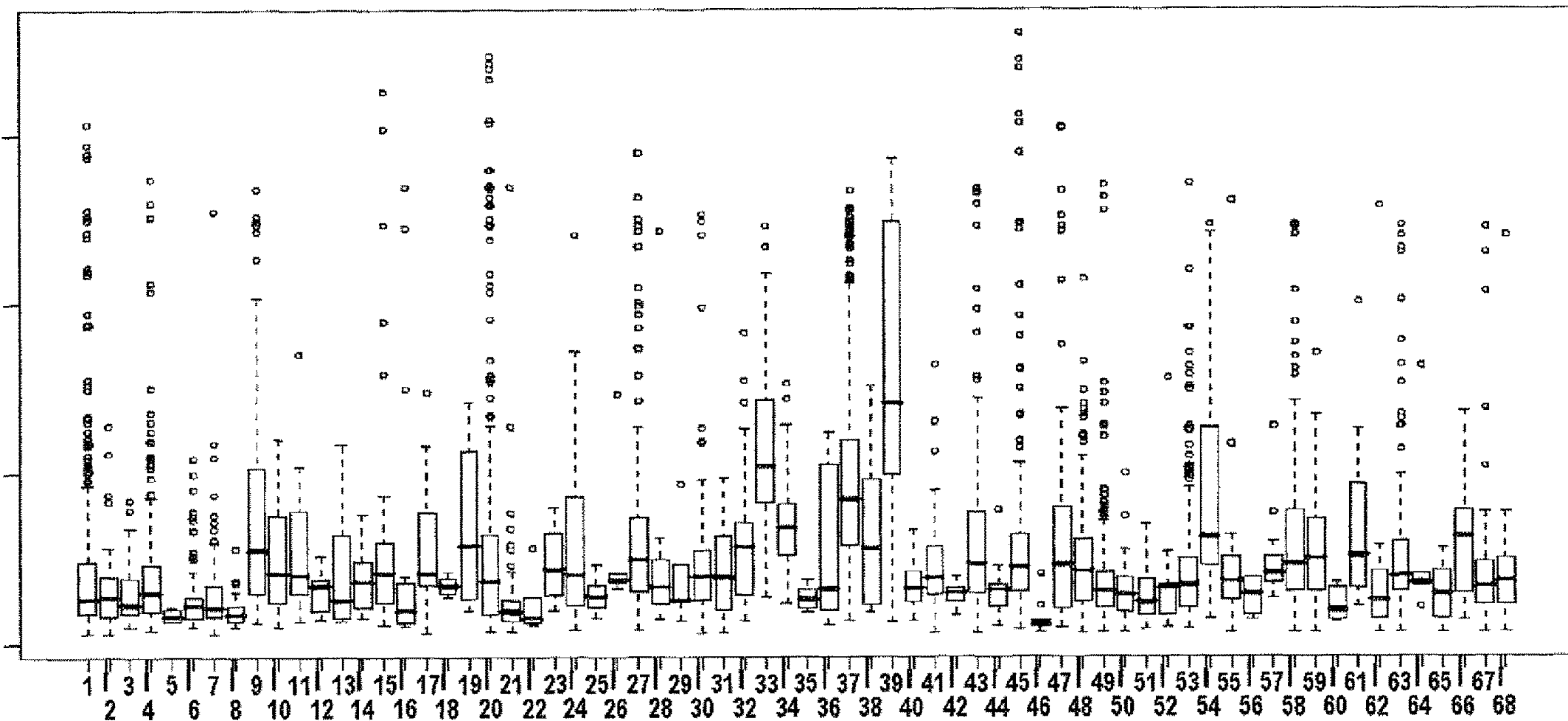




Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12