

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044914**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.10.11

(21) Номер заявки
202092966

(22) Дата подачи заявки
2019.06.17

(51) Int. Cl. **C07K 16/24** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ УЛУЧШЕНИЯ ОТВЕТА НА ЛЕЧЕНИЕ С ПОМОЩЬЮ АНТИТЕЛА К LIF У ИНДИВИДУУМОВ, СТРАДАЮЩИХ ОТ РАКА

(31) 18382431.7; 19382131.1

(32) 2018.06.18; 2019.02.22

(33) EP

(43) 2021.03.30

(86) PCT/IB2019/000806

(87) WO 2019/243898 2019.12.26

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**МЕДИММУН ЛИМИТЕД
(GB); ФУНДАСИО ПРИВАДА
ИНСТИТУТ Д'ИНВЕСТИГАСИО
ОНКОЛЬОХИКА ДЕ ВАЛЬ
ЭБРОН; ФУНДАСИО ПРИВАДА
ИНСТИТУСИО КАТАЛАНА ДЕ
РЕСЕРКА И ЭСТУДИС АВАНКАТС
(ES)**

(72) Изобретатель:
**Сеоане Суарез Жоан, Анидо
Фолгуэйра Джудит (ES), Халлетт
Робин Мэттью, Бэйлисс Питер
Эдвард, Джеганатхан Аджитха (CA),
Гиблин Патрисиа Энн (US), Убер
Руано Исабель (ES), Маграм Жанн
(US), Паскуаль Гарсиа Моника,
Бонфилл Тейксидор Эстер, Планас
Риголь Эстер (ES)**

(74) Представитель:
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатъев
А.В., Бильк А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)**

(56) WO-A1-2018115960
WO-A1-2017089614

HYMAN D.M. ET AL.: "A phase 1 study of MSC-1, a humanized anti-LIF monoclonal antibody, in patients with advanced solid tumors", EMBASE, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, 1 May 2018 (2018-05-01), XP002795313, abstract

Anonymous: "A Phase 1 Multicenter, Open-Label, Dose-Escalation and Dose-Expansion Study to Evaluate the Safety, Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, Immunogenicity and Antitumor Activity of MSC-1 in Patients With Advanced Solid Tumors", cinaltrials.gov, 30 March 2018 (2018-03-30), XP055648550, Retrieved from the Internet: URL:https://clinicaltrials.gov/ct2/history/NCT03490669?V_3=View#StudyPageTop [retrieved on 2019-12-03], the whole document page 4, paragraph 3 page 7, paragraph 3

(57) В изобретении описаны способы отбора и лечения пациентов, которые, вероятно, будут отвечать на лечение с помощью антитела к LIF.

044914 B1

044914 B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно европейской заявке под серийным номером 18382431,7, поданной 18 июня 2018 года, и европейской заявке под серийным номером 19382131,1, поданной 22 февраля 2019 года, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Предпосылки изобретения

Лейкоз-ингибирующий фактор (LIF) является представителем семейства цитокинов типа интерлейкин-6 (IL-6). На основе известных видов физиологической активности LIF, клинических признаков дефицита LIF и неклинических исследований экспрессии LIF в здоровых тканях и опухолях ожидается, что ингибирование LIF будет хорошо переноситься и приведет к противоопухолевой эффективности в ряде солидных опухолей, включая без ограничения немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), рак поджелудочной железы, рак яичника и мультиформную глиобластому (GBM).

Одна проблема, с которой сталкиваются клиницисты при лечении рака с помощью мишень-специфических терапевтических средств, заключается в том, что не все опухоли могут отвечать на данное мишень-специфическое терапевтическое средство. Даже в случае типов опухолей, которые, как известно, экспрессируют LIF или рецептор LIF, существует значительная гетерогенность среди отдельных опухолей. Кроме того, не все опухоли, которые экспрессируют LIF или рецептор LIF, могут отвечать одинаково, поэтому существует потребность в эффективных способах определения индивидуумов, которым лечение с помощью терапевтического антитела к LIF может принести наибольшую пользу.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение относится к способам лечения рака у индивидуумов, включающим введение терапевтического антитела к LIF тем индивидуумам, которые, скорее всего, будут отвечать на указанное антитело, и к способам определения того, какие индивидуумы с наибольшей вероятностью будут отвечать на терапевтическое антитело к LIF. Пациентов с опухолями или страдающих от видов рака, которые характеризуются экспрессией LIF или рецептора LIF на уровне мРНК или белка, превышающем эталонный уровень, как описано в данном документе, можно эффективно лечить с помощью терапевтического антитела к LIF. Кроме того, описано несколько биомаркеров, отличных от биомаркеров LIF, с помощью которых можно определять индивидуумов, которым лечение с помощью терапевтического антитела к LIF принесет пользу. Эти биомаркеры, отличные от биомаркеров LIF, можно использовать отдельно или вместе с анализом, при котором измеряют уровень LIF или рецептора LIF. Биомаркеры, отличные от биомаркеров LIF, включают иммуномодулирующие молекулы, которые указывают на иммуносупрессивную сигнатуру, что включает присутствие иммуносупрессивных типов клеток, иммуносупрессивных цитокинов или иммуносупрессивных хемокинов. Предполагается, что определение уровня LIF или рецептора LIF вместе с иммуносупрессивной сигнатурой увеличит предсказательную силу способа определения лечения с помощью терапевтического антитела к LIF.

В одном аспекте в данном документе описан способ лечения индивидуума, страдающего от рака, с помощью терапевтического антитела к лейкоз-ингибирующему фактору (LIF), включающий определение уровня LIF, превышающего эталонный уровень, в биологическом образце, полученном от индивидуума, и введение терапевтического количества антитела к LIF индивидууму, если уровень LIF выше эталонного уровня LIF. В определенных вариантах осуществления терапевтическое антитело к LIF содержит: определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 1-3; определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 4 или 5; определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 6-8; определяющую комплементарность область 1 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 9 или 10; определяющую комплементарность область 2 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 11 или 12; и определяющую комплементарность область 3 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13. В определенных вариантах осуществления терапевтическое антитело к LIF содержит переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина, характеризующуюся по меньшей мере 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 14, 15, 17 или 38, и переменную область легкой цепи иммуноглобулина, характеризующуюся по меньшей мере 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 18-21. В определенных вариантах осуществления терапевтическое антитело к LIF содержит область тяжелой цепи иммуноглобулина, характеризующуюся по меньшей мере 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 30-33 или 39, и область легкой цепи иммуноглобулина, характеризующуюся по меньшей мере 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 34-37. В определенных вариантах осуществления терапевтическое антитело к LIF представляет собой антитело IgG, содержащее две тяжелые цепи иммуноглобулина и две легкие цепи иммуноглобулина. В определенных вариантах осуществления уровень LIF представляет собой уровень белка LIF, и определение уровня

вующий 5-му перцентиллю экспрессии мРНК LIF при видах рака того же типа. В определенных вариантах осуществления эталонный уровень составляет уровень, соответствующий 10-му перцентиллю экспрессии мРНК LIF при видах рака того же типа. В определенных вариантах осуществления эталонный уровень составляет уровень, соответствующий 5-му перцентиллю экспрессии мРНК LIF в иллюстративном образце видов рака у человека. В определенных вариантах осуществления эталонный уровень составляет уровень, соответствующий 10-му перцентиллю экспрессии мРНК LIF в иллюстративном образце видов рака у человека. В определенных вариантах осуществления эталонный уровень LIF соответствует 25-му перцентиллю экспрессии белка LIF при LIF-положительных видах рака того же типа. В определенных вариантах осуществления эталонный уровень LIF соответствует 50-му перцентиллю экспрессии белка LIF при LIF-положительных видах рака того же типа. В определенных вариантах осуществления эталонный уровень LIF соответствует 25-му перцентиллю экспрессии белка LIF в иллюстративном образце видов рака у человека. В определенных вариантах осуществления эталонный уровень LIF соответствует 50-му перцентиллю экспрессии белка LIF в иллюстративном образце видов рака у человека. В определенных вариантах осуществления эталонный уровень LIF представляет собой уровень мРНК LIF, и определение уровня включает проведение по меньшей мере одного анализа, с помощью которого выявляют мРНК LIF, или получение результатов по меньшей мере одного анализа, с помощью которого выявляют мРНК LIF. В определенных вариантах осуществления эталонный уровень составляет уровень, соответствующий 25-му перцентиллю экспрессии мРНК LIF при видах рака того же типа. В определенных вариантах осуществления эталонный уровень составляет уровень, соответствующий 50-му перцентиллю экспрессии мРНК LIF при видах рака того же типа. В определенных вариантах осуществления эталонный уровень составляет уровень, соответствующий 25-му перцентиллю экспрессии мРНК LIF в иллюстративном образце видов рака у человека. В определенных вариантах осуществления эталонный уровень составляет уровень, соответствующий 50-му перцентиллю экспрессии мРНК LIF в иллюстративном образце видов рака у человека. В определенных вариантах осуществления эталонный уровень LIF представляет собой уровень ДНК LIF, и определение уровня включает проведение по меньшей мере одного анализа, с помощью которого выявляют ДНК LIF, или получение результатов по меньшей мере одного анализа, с помощью которого выявляют ДНК LIF. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один анализ включает полимеразную цепную реакцию (ПЦР). В определенных вариантах осуществления ПЦР включает количественную ПЦР. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один анализ включает реакцию секвенирования. В определенных вариантах осуществления реакция секвенирования включает реакцию секвенирования нового поколения. В определенных вариантах осуществления биологический образец включает образец крови. В определенных вариантах осуществления образец крови представляет собой плазму крови. В определенных вариантах осуществления образец крови представляет собой сыворотку крови. В определенных вариантах осуществления биологический образец включает образец ткани. В определенных вариантах осуществления биологический образец представляет собой биоптат опухоли. В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает определение уровня ДНК, мРНК или белка иммуномодулирующей молекулы, превышающего эталонный уровень иммуномодулирующей молекулы. В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает определение уровня ДНК, мРНК или белка иммуномодулирующей молекулы, который ниже эталонного уровня иммуномодулирующей молекулы. В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующая молекула выбрана из мРНК, транскрибируемой с элементов перечня, состоящего из MNCII, CXCL9, CXCL10, CXCR3, PD-L1, CCL7, CCL2, CCL3 и CCL22, или белка, получаемого из них. В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает определение уровня маркера макрофагов типа II (M2), превышающего эталонный уровень ДНК, мРНК или белка маркера макрофагов типа II (M2). В определенных вариантах осуществления маркер M2 представляет собой мРНК, транскрибируемую с элементов перечня, состоящего из CD206, CD163, PF4, CTSK и ARG1, или белок, получаемый из них. В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает определение уровня ДНК, мРНК или белка рецептора LIF (LIFR), превышающего эталонный уровень LIFR. В определенных вариантах осуществления уровень LIFR выявляют на иммуномодулирующей клетке. В определенных вариантах осуществления рак у человека выбран из перечня, состоящего из немелкоклеточного рака легкого, рака яичника, рака почки, рака мочевого пузыря, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака уrogenитального тракта, гинекологического рака, рака желудочно-кишечного тракта, рака эндокринной системы, мультиформной глиобластомы, рака молочной железы, меланомы, колоректального рака, рака желчного протока, рака шейки матки, рака эндометрия, плоскоклеточной карциномы головы и шеи и их комбинаций. В определенных вариантах осуществления рак у человека выбран из перечня, состоящего из немелкоклеточного рака легкого, рака яичника, рака почки, рака мочевого пузыря и их комбинаций. В определенных вариантах осуществления рак у человека выбран из перечня, состоящего из рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, мультиформной глиобластомы и их комбинаций.

В другом аспекте в данном документе описан способ лечения индивидуума, страдающего от рака, с помощью терапевтического антитела к лейкоз-ингибирующему фактору (LIF), включающий определение уровня LIF, превышающего эталонный уровень, в биологическом образце, полученном от индивидуума, и введение терапевтического количества антитела к LIF. В определенных вариантах осуществления те-

рапевтическое антитело к LIF содержит: определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 1-3; определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 4 или 5; определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 6-8; определяющую комплементарность область 1 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 9 или 10; определяющую комплементарность область 2 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 11 или 12; и определяющую комплементарность область 3 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13. В определенных вариантах осуществления терапевтическое антитело к LIF содержит переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина, характеризующуюся по меньшей мере 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 14, 15, 17 или 38, и переменную область легкой цепи иммуноглобулина, характеризующуюся по меньшей мере 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 18-21. В определенных вариантах осуществления терапевтическое антитело к LIF содержит область тяжелой цепи иммуноглобулина, характеризующуюся по меньшей мере 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 30-33 или 39, и область легкой цепи иммуноглобулина, характеризующуюся по меньшей мере 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 34-37. В определенных вариантах осуществления терапевтическое антитело к LIF представляет собой антитело IgG, содержащее две тяжелые цепи иммуноглобулина и две легкие цепи иммуноглобулина. В определенных вариантах осуществления уровень LIF представляет собой уровень белка LIF, и определение уровня включает проведение по меньшей мере одного анализа, с помощью которого выявляют белок LIF, или получение результатов по меньшей мере одного анализа, с помощью которого выявляют белок LIF. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один анализ включает иммуногистохимическое исследование. В определенных вариантах осуществления эталонный уровень составляет приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 50% клеток с положительным окрашиванием антителом к LIF.

В определенных вариантах осуществления эталонный уровень соответствует показателю ИНС, составляющему 100. В определенных вариантах осуществления эталонный уровень соответствует показателю ИНС, составляющему от приблизительно 1 до приблизительно 300. В определенных вариантах осуществления эталонный уровень соответствует показателю ИНС, составляющему от приблизительно 1 до приблизительно 30, от приблизительно 1 до приблизительно 60, от приблизительно 1 до приблизительно 90, от приблизительно 1 до приблизительно 120, от приблизительно 1 до приблизительно 150, от приблизительно 1 до приблизительно 180, от приблизительно 1 до приблизительно 210, от приблизительно 1 до приблизительно 240, от приблизительно 1 до приблизительно 270, от приблизительно 1 до приблизительно 300, от приблизительно 30 до приблизительно 60, от приблизительно 30 до приблизительно 90, от приблизительно 30 до приблизительно 120, от приблизительно 30 до приблизительно 150, от приблизительно 30 до приблизительно 180, от приблизительно 30 до приблизительно 210, от приблизительно 30 до приблизительно 240, от приблизительно 30 до приблизительно 270, от приблизительно 30 до приблизительно 300, от приблизительно 60 до приблизительно 90, от приблизительно 60 до приблизительно 120, от приблизительно 60 до приблизительно 150, от приблизительно 60 до приблизительно 180, от приблизительно 60 до приблизительно 210, от приблизительно 60 до приблизительно 240, от приблизительно 60 до приблизительно 270, от приблизительно 60 до приблизительно 300, от приблизительно 90 до приблизительно 120, от приблизительно 90 до приблизительно 150, от приблизительно 90 до приблизительно 180, от приблизительно 90 до приблизительно 210, от приблизительно 90 до приблизительно 240, от приблизительно 90 до приблизительно 270, от приблизительно 90 до приблизительно 300, от приблизительно 120 до приблизительно 150, от приблизительно 120 до приблизительно 180, от приблизительно 120 до приблизительно 210, от приблизительно 120 до приблизительно 240, от приблизительно 120 до приблизительно 270, от приблизительно 120 до приблизительно 300, от приблизительно 150 до приблизительно 180, от приблизительно 150 до приблизительно 210, от приблизительно 150 до приблизительно 240, от приблизительно 150 до приблизительно 270, от приблизительно 150 до приблизительно 300, от приблизительно 180 до приблизительно 210, от приблизительно 180 до приблизительно 240, от приблизительно 180 до приблизительно 270, от приблизительно 180 до приблизительно 300, от приблизительно 210 до приблизительно 240, от приблизительно 210 до приблизительно 270, от приблизительно 210 до приблизительно 300, от приблизительно 240 до приблизительно 270, от приблизительно 240 до приблизительно 300 или от приблизительно 270 до приблизительно 300. В определенных вариантах осуществления эталонный уровень соответствует показателю ИНС, составляющему приблизительно 1, приблизительно 30, приблизительно 60, приблизительно 90, приблизительно 120, приблизительно 150, приблизительно 180, приблизительно 210, приблизительно 240, приблизительно 270 или приблизительно 300. В определенных вариантах осуществления эталонный уровень соответствует показателю ИНС, составляющему по меньшей мере приблизительно 1, приблизительно 30, приблизительно 60, приблизительно 90,

приблизительно 120, приблизительно 150, приблизительно 180, приблизительно 210, приблизительно 240 или приблизительно 270. В некоторых вариантах осуществления эталонный уровень соответствует показателю ИНС, составляющему не более приблизительно 30, приблизительно 60, приблизительно 90, приблизительно 120, приблизительно 150, приблизительно 180, приблизительно 210, приблизительно 240, приблизительно 270 или приблизительно 300.

В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один анализ включает твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA). В определенных вариантах осуществления с помощью ELISA выявляют электрохемилюминесценцию. В определенных вариантах осуществления эталонный уровень составляет по меньшей мере приблизительно 4 пг/мл LIF в неразбавленном биологическом образце, полученном от индивидуума. В определенных вариантах осуществления эталонный уровень LIF соответствует 5-му перцентилю экспрессии белка LIF при LIF-положительных видах рака того же типа. В определенных вариантах осуществления эталонный уровень LIF соответствует 10-му перцентилю экспрессии белка LIF при LIF-положительных видах рака того же типа. В определенных вариантах осуществления эталонный уровень LIF соответствует 5-му перцентилю экспрессии белка LIF в иллюстративном образце видов рака у человека. В определенных вариантах осуществления эталонный уровень LIF соответствует 10-му перцентилю экспрессии белка LIF в иллюстративном образце видов рака у человека. В определенных вариантах осуществления уровень LIF представляет собой уровень мРНК LIF, и определение уровня включает проведение по меньшей мере одного анализа, с помощью которого выявляют мРНК LIF, или получение результатов по меньшей мере одного анализа, с помощью которого выявляют мРНК LIF. В определенных вариантах осуществления эталонный уровень составляет уровень, соответствующий 5-му перцентилю экспрессии мРНК LIF при видах рака того же типа. В определенных вариантах осуществления эталонный уровень составляет уровень, соответствующий 10-му перцентилю экспрессии мРНК LIF при видах рака того же типа. В определенных вариантах осуществления эталонный уровень составляет уровень, соответствующий 5-му перцентилю экспрессии мРНК LIF в иллюстративном образце видов рака у человека. В определенных вариантах осуществления эталонный уровень составляет уровень, соответствующий 10-му перцентилю экспрессии мРНК LIF в иллюстративном образце видов рака у человека. В определенных вариантах осуществления эталонный уровень LIF соответствует 25-му перцентилю экспрессии белка LIF при LIF-положительных видах рака того же типа. В определенных вариантах осуществления эталонный уровень LIF соответствует 50-му перцентилю экспрессии белка LIF при LIF-положительных видах рака того же типа. В определенных вариантах осуществления эталонный уровень LIF соответствует 25-му перцентилю экспрессии белка LIF в иллюстративном образце видов рака у человека. В определенных вариантах осуществления эталонный уровень LIF соответствует 50-му перцентилю экспрессии белка LIF в иллюстративном образце видов рака у человека. В определенных вариантах осуществления уровень LIF представляет собой уровень мРНК LIF, и определение уровня включает проведение по меньшей мере одного анализа, с помощью которого выявляют мРНК LIF, или получение результатов по меньшей мере одного анализа, с помощью которого выявляют мРНК LIF. В определенных вариантах осуществления эталонный уровень составляет уровень, соответствующий 25-му перцентилю экспрессии мРНК LIF при видах рака того же типа. В определенных вариантах осуществления эталонный уровень составляет уровень, соответствующий 50-му перцентилю экспрессии мРНК LIF при видах рака того же типа. В определенных вариантах осуществления эталонный уровень составляет уровень, соответствующий 25-му перцентилю экспрессии мРНК LIF в иллюстративном образце видов рака у человека. В определенных вариантах осуществления эталонный уровень составляет уровень, соответствующий 50-му перцентилю экспрессии мРНК LIF в иллюстративном образце видов рака у человека. В определенных вариантах осуществления уровень LIF представляет собой уровень ДНК LIF, и определение уровня включает проведение по меньшей мере одного анализа, с помощью которого выявляют ДНК LIF, или получение результатов по меньшей мере одного анализа, с помощью которого выявляют ДНК LIF. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один анализ включает полимеразную цепную реакцию (ПЦР). В определенных вариантах осуществления ПЦР включает количественную ПЦР. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один анализ включает реакцию секвенирования. В определенных вариантах осуществления реакция секвенирования включает реакцию секвенирования нового поколения. В определенных вариантах осуществления биологический образец включает образец крови. В определенных вариантах осуществления образец крови представляет собой плазму крови. В определенных вариантах осуществления образец крови представляет собой сыворотку крови. В определенных вариантах осуществления биологический образец включает образец ткани. В определенных вариантах осуществления биологический образец представляет собой биоптат опухоли. В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает определение уровня ДНК, мРНК или белка иммуномодулирующей молекулы, превышающего эталонный уровень иммуномодулирующей молекулы. В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает определение уровня ДНК, мРНК или белка иммуномодулирующей молекулы, который ниже эталонного уровня иммуномодулирующей молекулы. В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующая молекула выбрана из мРНК, транскрибируемой с элементов перечня, состоящего из MHCII, CXCL9, CXCL10, CXCR3, PD-L1, CCL7, CCL2, CCL3 и CCL22, или белка, получаемого из них. В определенных вариантах

осуществления способ дополнительно включает определение уровня ДНК, мРНК или белка маркера макрофагов типа II (M2), превышающего эталонный уровень маркера макрофагов типа II (M2). В определенных вариантах осуществления маркер M2 представляет собой мРНК, транскрибируемую с элементов перечня, состоящего из CD206, CD163, PF4, CTSK и ARG1, или белок, получаемый из них. В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает определение уровня ДНК, мРНК или белка рецептора LIF (LIFR), превышающего эталонный уровень LIFR. В определенных вариантах осуществления уровень LIFR выявляют на иммуномодулирующей клетке. В определенных вариантах осуществления рак у человека выбран из перечня, состоящего из немелкоклеточного рака легкого, рака яичника, рака почки, рака мочевого пузыря, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака уrogenитального тракта, гинекологического рака, рака желудочно-кишечного тракта, рака эндокринной системы, мультиформной глиобластомы, рака молочной железы, меланомы, колоректального рака, рака желчного протока, рака шейки матки, рака эндометрия, плоскоклеточной карциномы головы и шеи и их комбинаций. В определенных вариантах осуществления рак у человека выбран из перечня, состоящего из немелкоклеточного рака легкого, рака яичника, рака почки, рака мочевого пузыря и их комбинаций. В определенных вариантах осуществления рак у человека выбран из перечня, состоящего из рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, мультиформной глиобластомы и их комбинаций.

В другом аспекте в данном документе описан способ лечения индивидуума, страдающего от рака, с помощью терапевтического антитела к лейкоз-ингибирующему фактору (LIF), включающий определение уровня рецептора лейкоз-ингибирующего фактора (LIFR), превышающего эталонный уровень, в биологическом образце, полученном от индивидуума, и введение терапевтического количества антитела к LIF индивидууму, если уровень LIFR выше эталонного уровня LIFR. В определенных вариантах осуществления уровень LIFR выявляют на иммуномодулирующей клетке. В определенных вариантах осуществления терапевтическое антитело к LIF содержит: определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 1-3; определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 4 или 5; определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 6-8; определяющую комплементарность область 1 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 9 или 10; определяющую комплементарность область 2 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 11 или 12; и определяющую комплементарность область 3 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13. В определенных вариантах осуществления терапевтическое антитело к LIF содержит вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина, характеризующуюся по меньшей мере 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 14, 15, 17 или 38, и вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина, характеризующуюся по меньшей мере 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 18-21. В определенных вариантах осуществления терапевтическое антитело к LIF содержит область тяжелой цепи иммуноглобулина, характеризующуюся по меньшей мере 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 30-33 или 39, и область легкой цепи иммуноглобулина, характеризующуюся по меньшей мере 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 34-37. В определенных вариантах осуществления терапевтическое антитело к LIF представляет собой антитело IgG, содержащее две тяжелые цепи иммуноглобулина и две легкие цепи иммуноглобулина. В определенных вариантах осуществления уровень LIFR представляет собой уровень белка LIFR, и определение уровня включает проведение по меньшей мере одного анализа, с помощью которого выявляют белок LIFR, или получение результатов по меньшей мере одного анализа, с помощью которого выявляют белок LIFR. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один анализ включает иммуногистохимическое исследование. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один анализ включает твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA). В определенных вариантах осуществления с помощью ELISA выявляют электрохемилюминесценцию. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один анализ включает проточную цитометрию. В определенных вариантах осуществления уровень LIFR представляет собой уровень мРНК LIFR, и определение уровня включает проведение по меньшей мере одного анализа, с помощью которого выявляют мРНК LIFR, или получение результатов по меньшей мере одного анализа, с помощью которого выявляют мРНК LIFR. В определенных вариантах осуществления уровень LIFR представляет собой уровень ДНК LIFR, и определение уровня включает проведение по меньшей мере одного анализа, с помощью которого выявляют ДНК LIFR, или получение результатов по меньшей мере одного анализа, с помощью которого выявляют ДНК LIFR. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один анализ включает полимеразную цепную реакцию (ПЦР). В определенных вариантах осуществления ПЦР включает количественную ПЦР. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один анализ включает реакцию секвенирования. В определенных вариантах осуществления реакция секвенирования включает реакцию секвенирования нового поколения. В определенных вариантах осуществления биоло-

гический образец включает образец крови. В определенных вариантах осуществления образец крови представляет собой плазму крови. В определенных вариантах осуществления образец крови представляет собой сыворотку крови. В определенных вариантах осуществления биологический образец включает образец ткани. В определенных вариантах осуществления биологический образец представляет собой биоптат опухоли. В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает определение уровня ДНК, мРНК или белка иммуномодулирующей молекулы, превышающего эталонный уровень иммуномодулирующей молекулы. В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает определение уровня ДНК, мРНК или белка иммуномодулирующей молекулы, который ниже эталонного уровня иммуномодулирующей молекулы. В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующая молекула выбрана из мРНК, транскрибируемой с элементов перечня, состоящего из МНСII, CXCL9, CXCL10, CXCR3, PD-L1, CCL7, CCL2, CCL3 и CCL22, или белка, получаемого из них. В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает определение уровня ДНК, мРНК или белка маркера макрофагов типа II (M2), превышающего эталонный уровень маркера макрофагов типа II (M2). В определенных вариантах осуществления маркер M2 представляет собой мРНК, транскрибируемую с элементов перечня, состоящего из CD206, CD163, PF4, CTSK и ARG1, или белок, получаемый из них. В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает определение уровня ДНК, мРНК или белка LIF, превышающего эталонный уровень LIF. В определенных вариантах осуществления рак у человека выбран из перечня, состоящего из немелкоклеточного рака легкого, рака яичника, рака почки, рака мочевого пузыря, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака уrogenитального тракта, гинекологического рака, рака желудочно-кишечного тракта, рака эндокринной системы, мультиформной глиобластомы, рака молочной железы, меланомы, колоректального рака, рака желчного протока, рака шейки матки, рака эндометрия, плоскоклеточной карциномы головы и шеи и их комбинаций. В определенных вариантах осуществления рак у человека выбран из перечня, состоящего из немелкоклеточного рака легкого, рака яичника, рака почки, рака мочевого пузыря и их комбинаций. В определенных вариантах осуществления рак у человека выбран из перечня, состоящего из рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, мультиформной глиобластомы и их комбинаций.

В другом аспекте в данном документе описан способ лечения индивидуума, страдающего от рака, с помощью терапевтического антитела к лейкоз-ингибирующему фактору (LIF), включающий определение уровня рецептора лейкоз-ингибирующего фактора (LIFR), превышающего эталонный уровень в биологическом образце, полученном от индивидуума, и введение терапевтического количества антитела к LIF индивидууму. В определенных вариантах осуществления уровень LIFR выявляют на иммуномодулирующей клетке. В определенных вариантах осуществления терапевтическое антитело к LIF содержит: определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 1-3; определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 4 или 5; определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 6-8; определяющую комплементарность область 1 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 9 или 10; определяющую комплементарность область 2 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 11 или 12; и определяющую комплементарность область 3 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13. В определенных вариантах осуществления терапевтическое антитело к LIF содержит переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина, характеризующуюся по меньшей мере 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 14, 15, 17 или 38, и переменную область легкой цепи иммуноглобулина, характеризующуюся по меньшей мере 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 18-21. В определенных вариантах осуществления терапевтическое антитело к LIF содержит область тяжелой цепи иммуноглобулина, характеризующуюся по меньшей мере 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 30-33 или 39, и область легкой цепи иммуноглобулина, характеризующуюся по меньшей мере 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 34-37. В определенных вариантах осуществления терапевтическое антитело к LIF представляет собой антитело IgG, содержащее две тяжелые цепи иммуноглобулина и две легкие цепи иммуноглобулина. В определенных вариантах осуществления уровень LIFR представляет собой уровень белка LIFR, и определение уровня включает проведение по меньшей мере одного анализа, с помощью которого выявляют белок LIFR, или получение результатов по меньшей мере одного анализа, с помощью которого выявляют белок LIFR. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один анализ включает иммуногистохимическое исследование. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один анализ включает твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA). В определенных вариантах осуществления с помощью ELISA выявляют электрохемилюминесценцию. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один анализ включает проточную цитометрию. В определенных вариантах осуществления уровень LIFR представляет собой уровень мРНК LIFR, и определение уровня включает проведение по

меньшей мере одного анализа, с помощью которого выявляют мРНК LIFR, или получение результатов по меньшей мере одного анализа, с помощью которого выявляют мРНК LIFR. В определенных вариантах осуществления уровень LIFR представляет собой уровень ДНК LIFR, и определение уровня включает проведение по меньшей мере одного анализа, с помощью которого выявляют ДНК LIFR, или получение результатов по меньшей мере одного анализа, с помощью которого выявляют ДНК LIFR. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один анализ включает полимеразную цепную реакцию (ПНР). В определенных вариантах осуществления ПЦР включает количественную ПЦР. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один анализ включает реакцию секвенирования. В определенных вариантах осуществления реакция секвенирования включает реакцию секвенирования нового поколения. В определенных вариантах осуществления биологический образец включает образец крови. В определенных вариантах осуществления образец крови представляет собой плазму крови. В определенных вариантах осуществления образец крови представляет собой сыворотку крови. В определенных вариантах осуществления биологический образец включает образец ткани. В определенных вариантах осуществления биологический образец представляет собой биоптат опухоли. В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает определение уровня ДНК, мРНК или белка иммуномодулирующей молекулы, превышающего эталонный уровень иммуномодулирующей молекулы. В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает определение уровня ДНК, мРНК или белка иммуномодулирующей молекулы, который ниже эталонного уровня иммуномодулирующей молекулы. В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующая молекула выбрана из мРНК, транскрибируемой с элементов перечня, состоящего из MHCII, CXCL9, CXCL10, CXCR3, PD-L1, CCL7, CCL2, CCL3 и CCL22, или белка, получаемого из них. В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает определение уровня ДНК, мРНК или белка маркера макрофагов типа II (M2), превышающего эталонный уровень маркера макрофагов типа II (M2). В определенных вариантах осуществления маркер M2 представляет собой мРНК, транскрибируемую с элементов перечня, состоящего из CD206, CD163, PF4, CTSK и ARG1, или белок, получаемый из них. В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает определение уровня ДНК, мРНК или белка LIF, превышающего эталонный уровень LIF. В определенных вариантах осуществления рак у человека выбран из перечня, состоящего из немелкоклеточного рака легкого, рака яичника, рака почки, рака мочевого пузыря, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака урогенитального тракта, гинекологического рака, рака желудочно-кишечного тракта, рака эндокринной системы, мультиформной глиобластомы, рака молочной железы, меланомы, колоректального рака, рака желчного протока, рака шейки матки, рака эндометрия, плоскоклеточной карциномы головы и шеи и их комбинаций. В определенных вариантах осуществления рак у человека выбран из перечня, состоящего из немелкоклеточного рака легкого, рака яичника, рака почки, рака мочевого пузыря и их комбинаций. В определенных вариантах осуществления рак у человека выбран из перечня, состоящего из рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, мультиформной глиобластомы и их комбинаций.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 представлены результаты вестерн-блоттинга, демонстрирующие ингибирование LIF-индуцированного фосфорилирования STAT3 различными гуманизированными антителами к LIF.

На фиг. 2А и 2В представлены результаты вестерн-блоттинга, демонстрирующие ингибирование LIF-индуцированного фосфорилирования STAT3 гуманизированным и исходным антителом 5D8.

На фиг. 3А показана IC_{50} для ингибирования LIF в клетках U-251 с использованием антитела h5D8.

На фиг. 3В показаны репрезентативные IC_{50} , определенные по кривой зависимости доза-эффект ингибирования pSTAT3 посредством r5D8 и h5D8 в условиях стимуляции эндогенным LIF. Показаны репрезентативные кривые ($n=1$ h5D8, $n=2$ r5D8).

На фиг. 4 представлены результаты вестерн-блоттинга, демонстрирующие ингибирование LIF-индуцированного фосфорилирования STAT3 различными моноклональными антителами, описанными в данном раскрытии.

На фиг. 5 представлены результаты иммуногистохимического окрашивания и количественного определения экспрессии LIF при мультиформной глиобластоме (GBM), NSCLC (немелкоклеточной карциноме легкого), раке яичника, в опухолях при колоректальном раке и опухолях поджелудочной железы от пациентов-людей. Горизонтальные черты представляют среднее значение \pm SEM.

На фиг. 6 представлен график, демонстрирующий результаты эксперимента, проведенного на мышинной модели немелкоклеточного рака легкого с применением гуманизованного антитела 5D8.

На фиг. 7А показан эффект r5D8 в отношении ингибирования клеток U251 в ортотопической мышинной модели GBM. Результаты количественного определения показаны для дня 26.

На фиг. 7В показаны данные по мышам, которых инокулировали человеческими клетками U251 GBM, экспрессирующими люциферазу, а затем обрабатывали с помощью 100, 200 или 300 мкг h5D8 или среды-носителя два раза в неделю. Размер опухоли определяли по биолуминесценции (Xenogen IVIS Spectrum) в день 7. На графике показаны отдельные значения измерения опухолей, при этом горизонтальные черты показывают среднее значение \pm SEM. Статистическую значимость рассчитывали с использованием непарного непараметрического U-критерия Манна-Уитни.

На фиг. 8А показан эффект r5D8 в отношении ингибирования роста клеток рака яичника в сингенной мышинной модели.

На фиг. 8В показаны значения измерения отдельных опухолей в день 25.

На фиг. 8С проиллюстрировано, что h5D8 демонстрирует значительное снижение роста опухоли при введении в дозе 200 мкг/мышь два раза в неделю ($p < 0,05$). Символы представляют собой среднее значение \pm SEM, статистическая значимость сравнивается со средой-носителем (посредством непарного непараметрического U-критерия Манна-Уитни).

На фиг. 9А показан эффект r5D8 в отношении ингибирования роста клеток колоректального рака в сингенной мышинной модели.

На фиг. 9В показаны значения измерения отдельных опухолей в день 17.

На фиг. 10А показано уменьшение инфильтрации макрофагами участков локализации опухоли в ортотопической мышинной модели GBM с репрезентативным изображением и количественным определением клеток CCL22+.

На фиг. 10В показано снижение поляризации макрофагов в человеческой модели органотипической культуры тканевых срезов. Показаны репрезентативное изображение (слева) и количественное определение (справа).

На фиг. 10С показано снижение поляризации макрофагов к участкам локализации опухоли в сингенной мышинной модели рака яичника с репрезентативным изображением и количественным определением клеток CCL22+.

На фиг. 10D показано уменьшение инфильтрации макрофагами участков локализации опухоли в сингенной мышинной модели колоректального рака с репрезентативным изображением и количественным определением клеток CCL22+.

На фиг. 11А показано увеличение числа немиелоидных эффекторных клеток в сингенной мышинной модели рака яичника после обработки с использованием r5D8.

На фиг. 11В показано увеличение числа немиелоидных эффекторных клеток в сингенной мышинной модели колоректального рака после обработки с использованием r5D8.

На фиг. 11С показано снижение процентного содержания CD4+ T_{REG}-клеток в мышинной модели рака NSCLC после обработки с использованием r5D8.

На фиг. 12 показаны данные по мышам с опухолями CT26, которых два раза в неделю обрабатывали с использованием PBS (контроль) или r5D8, вводимыми интраперитонеально в присутствии или в отсутствие истощающих антител к CD4 и CD8. На графике показаны отдельные значения измерения опухолей в день 13, выраженные в виде среднего объема опухоли \pm SEM. Статистические различия между группами определяли с использованием непарного непараметрического U-критерия Манна-Уитни. R5D8 ингибировало рост опухолей CT26 ($*p < 0,05$). Ингибирование роста опухоли за счет r5D8 было значительно снижено в присутствии истощающих антител к CD4 и CD8 ($****p < 0,0001$).

На фиг. 13А продемонстрирован обзор сокристаллической структуры h5D8 Fab в комплексе с LIF. Сайт взаимодействия gp130 картирован на поверхности LIF (заштрихован темным).

На фиг. 13В продемонстрированы подробные взаимодействия между LIF и h5D8 и показаны остатки, образующие солевые мостики, и остатки h5D8 со скрытой площадью поверхности более 100 Å².

На фиг. 14А продемонстрирована суперпозиция пяти кристаллических структур h5D8 Fab и указана высокая степень сходства, несмотря на то, что они кристаллизовались в разных химических условиях.

На фиг. 14В продемонстрирована обширная сеть ван-дер-ваальсовых взаимодействий, опосредованных непарным Cys100. Этот остаток высокоупорядочен, участвует в образовании конформаций HCDR1 и HCDR3 и не вовлечен в нежелательную перестановку дисульфидных связей. Расстояния между остатками показаны пунктирными линиями и отмечены.

На фиг. 15А посредством ELISA продемонстрировано связывание мутантов h5D8 C100 с человеческим LIF.

На фиг. 15В посредством ELISA продемонстрировано связывание мутантов h5D8 C100 с мышинным LIF.

На фиг. 16А посредством Octet продемонстрировано, что h5D8 не блокирует связывание между LIF и LIFR. Последовательное связывание h5D8 с LIF с последующим связыванием с LIFR.

На фиг. 16В и 16С продемонстрирован ELISA-анализ связывания комплексов LIF/mAb с иммобилизованным LIFR или gp130. Сигналы видоспецифических конъюгированных с пероксидазой антител к IgG (к человеческому для (-) и h5D8, к крысиному для r5d8 и B09), обеспечивающих выявление антительной части комплексов mAb/LIF, связавшихся с LIFR (фиг. 16В) или gp130 (фиг. 16С), иммобилизованными на планшетах.

На фиг. 17А и 17В продемонстрирована экспрессия мРНК LIF (фиг. 16А) или LIFR (фиг. 16В) в 72 различных тканях человека.

На фиг. 18 показаны уровни экспрессии мРНК при разных типах рака, стратифицированные на высоких, средне-высокий, средне-низкий и низкий уровни. Данные по экспрессии представляют собой уровни транскрипта LIF, измеренные в 7769 образцах, отобранных из 22 категорий, полученных из Атласа ракового генома, и разделенные на квартили по всей выборке.

На фиг. 19А показана корреляция (r^2) между уровнями мРНК LIF и уровнями мРНК CCL7. Образцы для каждой категории получали из Атласа ракового генома и ассоциацию между LIF и CCL7 оценивали посредством корреляции Пирсона.

На фиг. 19В показана корреляция (r^2) между уровнями мРНК LIF и уровнями мРНК CCL2. Образцы для каждой категории получали из Атласа ракового генома и ассоциацию между LIF и CCL2 оценивали посредством корреляции Пирсона.

На фиг. 19С показана корреляция (r^2) между уровнями мРНК LIF и уровнями мРНК CCL3. Образцы для каждой категории получали из Атласа ракового генома и ассоциацию между LIF и CCL3 оценивали посредством корреляции Пирсона.

На фиг. 19D показана корреляция (r^2) между уровнями мРНК LIF и уровнями мРНК CCL22. Образцы для каждой категории получали из Атласа ракового генома и ассоциацию между LIF и CCL22 оценивали посредством корреляции Пирсона.

На фиг. 20А показана корреляция (r^2) между уровнями мРНК LIF и сигнатурой экспрессии, типичной для макрофага типа II (M2).

На фиг. 20В показана корреляция между уровнями экспрессии LIF и CD163, CD206 и CCL2 при GBM и раке яичника. Графики регрессии между уровнями экспрессии LIF и CD163, CD206, CCL2 (в \log_2 RSEM) в когортах опухолей из TCGA при GBM и раке яичника (OV).

На фиг. 20С показана корреляция ИНС указанных маркеров из 20 опухолей GBM. Показаны корреляции между LIF и CCL2, CD206, CD163 и CXCL9 с помощью коэффициентов R-квадрат (R^2).

На фиг. 20D показаны процентное содержание и средняя интенсивность флуоресценции (MFI) CCL2⁺ и CXCL9⁺ в TAM (CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C⁻) из опухолей GL261N, обработанных или необработанных антителами к LIF.

На фиг. 20Е показано процентное содержание дважды положительных клеток по сравнению с клетками, положительными по маркерам TAM. Количественное определение CXCL9 относится к общему количеству клеток.

На фиг. 20F показан процент рецепторов CCR2, CXCR3 и LIFR в TAM (CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C⁻) и популяциях CD8⁺ Т-клеток (CD3⁺ CD8⁺), определенный посредством проточной цитометрии. Данные представлены в виде среднего значения \pm SEM. Статистический анализ выполнен с использованием Т-критерия Манна-Уитни. *P < 0,05.

На фиг. 20G показан рост опухоли GL261N у мышей CXCL9^{-/-} и CCL2^{-/-} или мышей, обработанных указанными антителами, при этом данные представлены в виде общего потока (фотон/с).

На фиг. 20H показано кратное увеличение количества опухоль-инфильтрирующих CD8 Т-клеток при указанных обработках. Данные представляют собой среднее значение \pm SEM. Статистические анализы выполнены с использованием Т-критерия Манна-Уитни. *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; ****P < 0,0001.

На фиг. 20I показано процентное содержание дважды положительных клеток по отношению к клеткам Iba1⁺ и процентное содержание клеток CXCL9⁺ в органотипических срезах GBM (пациенты 1, 2, 3), инкубированных с 10 мкг/мл антитела к LIF в течение 3 дней, по отношению к общему количеству клеток. Данные представляют собой среднее значение для всех пациентов \pm SEM. Статистические анализы выполнены с использованием Т-критерия Манна-Уитни. *P < 0,05, **P < 0,01; ***P < 0,001; ****P < 0,0001.

На фиг. 20J показаны уровни транскриптов генов M1 и M2 в опухолях CT26 в конечной точке, определенные с помощью qRT-ПЦР лизата целой опухоли (n = 8). Данные представлены в виде кратного изменения относительно среднего значения для контрольных опухолей, обработанных с помощью IgG1 (Hprt, Tbp, Tfc).

На фиг. 20K показаны результаты количественного определения популяции пан-миелоидных клеток (CD11b⁺ в CD45⁺ клетках), TAM (CD11b⁺ Ly6C^{низкий} F4/80⁺ в CD45⁺ клетках), МНС II⁺ TAM (МНС II⁺ в CD11b⁺ Ly6C^{низкий} F4/80⁺ клетках) и экспрессии МНС II в TAM. Данные показаны в виде среднего значения \pm s.e.m (Значение n указано для каждого эксперимента), *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

На фиг. 21А и В показан уровень рецептора LIF на первичных макрофагах, дифференцированных из первичных моноцитов, от 3 разных доноров, определенный посредством проточной цитометрии (фиг. 21А), и количественно определенный посредством интерполяции против флуоресцентных калибровочных микросфер (фиг. 21В).

На фиг. 22 показано повышение уровней CD206 и CD163 в первичных макрофагах M₀ в ответ на обработку с помощью LIF (20 нМ) в течение 72 ч.

На фиг. 23 показано повышение секреции CCL22 в ответ на обработку с помощью LIF (20 нМ) в макрофагах M₀ и макрофагах M1 и M2 (нижний правый угол).

На фиг. 24 показана экспрессия рецептора LIF на макрофагах, ассоциированных с опухолью, при серозном раке яичника, стадия III-С (два разных донора, две левые панели), и аденокарциноме легкого, стадия III-А (два разных донора, две правые панели), определенная посредством проточной цитометрии. Контрольные графики представляют собой флуоресцентные контроли минус один (FMO).

На фиг. 25 показана экспрессия рецептора LIF на полученных из опухоли моноцитарных супрессорных клетках миелоидного происхождения (M-MDSC), полученных из опухоли полиморфоядерных супрессорных клетках миелоидного происхождения (PMN-MDSC) при серозном раке яичника, стадия III-C (два разных донора, две левые панели), и аденокарциноме легкого, стадия III-A (два разных донора, две правые панели), определенная посредством проточной цитометрии. Контрольные графики представляют собой флуоресцентное окрашивание минус один (FMO). Образцы гейтированы по CD11b⁺ CD33⁺ HLA-DR^{низкий}.

Подробное описание изобретения

В одном аспекте в данном документе описан способ лечения индивидуума, страдающего от рака, с помощью терапевтического антитела к лейкоз-ингибирующему фактору (LIF), включающий определение уровня LIF, превышающего эталонный уровень, в биологическом образце, полученном от индивидуума, и введение терапевтического количества антитела к LIF индивидууму, если уровень LIF выше эталонного уровня LIF.

В другом аспекте в данном документе описан способ лечения индивидуума, страдающего от рака, с помощью терапевтического антитела к лейкоз-ингибирующему фактору (LIF), включающий определение уровня LIF, превышающего эталонный уровень, в биологическом образце, полученном от индивидуума, и введение терапевтического количества антитела к LIF.

В другом аспекте в данном документе описан способ лечения индивидуума, страдающего от рака, с помощью терапевтического антитела к лейкоз-ингибирующему фактору (LIF), включающий определение уровня рецептора лейкоз-ингибирующего фактора (LIFR), превышающего эталонный уровень, в биологическом образце, полученном от индивидуума, и введение терапевтического количества антитела к LIF индивидууму, если уровень LIFR выше эталонного уровня LIFR.

В другом аспекте в данном документе описан способ лечения индивидуума, страдающего от рака, с помощью терапевтического антитела к лейкоз-ингибирующему фактору (LIF), включающий определение уровня рецептора лейкоз-ингибирующего фактора (LIFR), превышающего эталонный уровень в биологическом образце, полученном от индивидуума, и введение терапевтического количества антитела к LIF индивидууму.

Используемый в данном документе термин "индивидуум", "пациент" или "субъект" относится к индивидуумам с поставленным диагнозом, подозрениями на развитие рака, опухоли или новообразования, или подверженным риску их развития. В определенных вариантах осуществления индивидуум представляет собой млекопитающее. В определенных вариантах осуществления млекопитающее представляет собой мышь, крысу, кролика, собаку, кошку, лошадь, корову, овцу, свинью, козу, ламу, альпаку или яка. В определенных вариантах осуществления индивидуум является человеком.

Используемый в данном документе, если не указано иное, термин "иммуномодулирующая молекула" относится к любой молекуле, полипептиду или белку, которые присутствуют либо в опухоли, либо в микроокружении опухоли, которые модулируют или вызывают модуляцию врожденной и/или адаптивной иммунной системы, включая без ограничения иммуносупрессивные хемокины, иммуносупрессивные цитокины или молекулы, представляющие собой ингибиторы контрольной точки иммунного ответа. Иммуномодулирующие молекулы могут продуцироваться иммуномодулирующими клетками, опухолевыми/раковыми клетками или клетками стромы. Иммуномодулирующие молекулы включают в качестве неограничивающего примера CCL7, CCL2, CCL3, CCL22, MIP1, CXCL9, CXCL10, CXCR3 и PD-L1.

Используемый в данном документе, если не указано иное, термин "иммуномодулирующая клетка" относится к любой клетке иммунной системы, которая способна продуцировать иммуномодулирующие факторы, и включает дендритные клетки, макрофаги, макрофаги, ассоциированные с опухолью, макрофаги типа I, макрофаги типа II, супрессорные клетки миелоидного происхождения, полученные из опухоли полиморфоядерные супрессорные клетки миелоидного происхождения (PMN-MDSC), хелперные Т-клетки, регуляторные Т-клетки, активированные Т-клетки, "обученные" антигеном Т-клетки, цитотоксические Т-клетки и т.п.

Используемый в данном документе термин "антитело", если не указано иное, включает антигенсвязывающие фрагменты антител, т.е. фрагменты антител, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном, который связывается с полноразмерным антителом, например фрагменты, которые сохраняют одну или несколько областей CDR. Примеры фрагментов антител включают без ограничения фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv; диатела; линейные антитела; антитела, состоящие только из тяжелых цепей, молекулы одноцепочечных антител, например, одноцепочечные переменные фрагменты (scFv), наноантитела и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител с разными специфичностями, такие как биспецифические антитела. В определенных вариантах осуществления антитела гуманизированы таким образом, чтобы снизить иммунный ответ индивидуума на антитело. Например, антитела могут быть химерными, например отличная от человеческой переменная область с человеческой константной областью, или антителами с привитыми CDR, например отличными от человеческих области CDR с константной областью и последовательностями человеческого каркасного участка переменной области. В определенных вариантах осуществления антитела деиммунизируют после гуманизации. Деиммунизация включает удаление или мутацию одного или нескольких эпитопов Т-клеток

в константной области антитела. В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе антитела являются моноклональными. Используемый в данном документе термин "рекомбинантное антитело" представляет собой антитело, которое содержит аминокислотную последовательность, полученную из двух разных видов или двух разных источников, и включает синтетические молекулы, например антитело, которое содержит отличную от человеческой область CDR и человеческую каркасную или константную область. В определенных вариантах осуществления рекомбинантные антитела по настоящему изобретению получают из молекулы рекомбинантной ДНК или синтезируют. Термины "рак" и "опухоль" относятся к физиологическому состоянию млекопитающих, которое характеризуется нарушением клеточного роста. Рак представляет собой класс заболеваний, при которых группа клеток проявляет неконтролируемый или нежелательный рост. Раковые клетки также могут распространяться в другие места, что может приводить к образованию метастазов. Диссеминация раковых клеток в организме может происходить, например, посредством лимфы или крови. Неконтролируемый рост, инвазию и образование метастазов также называют злокачественными свойствами рака. Эти злокачественные свойства отличают рак от доброкачественных опухолей, которые, как правило, не инвазируют и не метастазируют.

Используемый в данном документе термин "терапевтическое антитело" представляет собой антитело, которое вводят индивидууму и, предположительно, проявляет один или несколько благоприятных эффектов, полезных для лечения рака. Терапевтические антитела по настоящему изобретению включают антитела, имеющие последовательности CDR, переменные области тяжелой и/или легкой цепей иммуноглобулина или тяжелые и легкие цепи иммуноглобулина полностью, идентичные с h5D8, или CDR, которые отличаются от h5D8, но которые обладают подобными характеристиками связывания (эпитоп, аффинность или биологический эффект) и способны проявлять один или несколько благоприятных эффектов, полезных для лечения рака.

Используемый в данном документе термин "терапевтическое количество" представляет собой дозировку терапевтического антитела, предназначенную для проявления одного или нескольких благоприятных эффектов, полезных для лечения рака.

Некоторые конкретные терапевтические количества рассмотрены подробно в данном документе.

Применяемые в данном документе термины "осуществление лечения" или "лечение" относятся к вмешательству в состояние заболевания, предназначенному для проявления одного или нескольких благоприятных эффектов. Лечение рака/опухоли включает способы, предназначенные для того, чтобы вызвать или действительно вызвать переход заболевания в устойчивое состояние, частичный ответ, полный ответ, повышение выживаемости без прогрессирования, повышение общей выживаемости, уменьшение опухоли, замедление роста опухоли, остановку роста опухоли или предупреждение или снижение метастазирования. В определенных случаях терапевтические способы, описанные в данном документе, можно применять в качестве поддерживающего лечения после успешного лечения или для предупреждения рецидива или метастазирования конкретной опухоли или рака. Известно, что не все индивидуумы будут отвечать в одинаковой степени, или вообще будут отвечать на данное введение терапевтического антитела, однако, даже если ответ не выявлен, такие индивидуумы тем не менее считаются прошедшими лечение.

Используемый в данном документе термин "биомаркер" представляет собой измеряемую молекулу у индивидуума, наличие которой является индикатором состояния заболевания этого индивидуума. Без ограничения биомаркеры включают, например, белки и их посттрансляционные модификации, полипептиды, нуклеиновые кислоты, ДНК, РНК, аминокислоты, жирные кислоты, липиды, стероиды, углеводы или метаболиты и метаболические промежуточные соединения аминокислот, жирных кислот, липидов, стероидов и углеводов.

Используемый в данном документе термин "показатель ИНС" относится к параметру, применяемому для количественной оценки уровней экспрессии LIF или рецептора LIF в тестируемом образце. Показатель ИНС в образце определяют посредством окрашивания образца с помощью специфического антитела к LIF или рецептору LIF с применением иммуногистохимического исследования. Каждой клетке опухоли присваивают значение уровня интенсивности, находящееся в диапазоне от 0 при отсутствии окрашивания до 3+ при наиболее интенсивном окрашивании, 2+ при умеренном окрашивании клеток и 1+ при слабом окрашивании клеток. Показатель ИНС затем можно рассчитать с помощью следующего уравнения:

$$[1 \times (\% \text{ клеток } 1+) + 2 \times (\% \text{ клеток } 2+) + 3 \times (\% \text{ клеток } 3+)]$$

Показатель ИНС может находиться в диапазоне от 1 до 300. Показатель ИНС в образце можно использовать непосредственно для проведения индикации уровней экспрессии LIF или можно сравнивать с эталонным значением показателя ИНС для определения того, будет ли индивидуум отвечать на лечение с помощью терапевтического антитела к-LIF.

Используемый в данном документе термин "иммуногистохимическое исследование" или "ИНС" относится к лабораторному тесту с использованием антител, аффинных молекул и красителей для тестирования в отношении определенных антигенов (биомаркеров) в образце ткани или клеток. Антитела могут быть связаны с ферментом или флуоресцентным красителем. ИНС можно объединять с другими красите-

лями, не предусматривающими применение антител, или способами, которые дополнительно детализируют структуру ткани или клетки, например красителями, окрашивающими ядерную или клеточную мембраны. ИНС можно осуществлять на заключенных в парафин и фиксированных формалином ткани или биоптатах. ИНС можно также осуществлять на клетках в суспензии, при этом клетки впоследствии центрифугируют или прикрепляют к предметному стеклу микроскопа или покровному стеклу. Образцы ИНС можно соответствующим образом анализировать посредством микроскопии в видимом свете или визуализации или флуоресцентной микроскопии или визуализации. Количественное определение можно осуществлять вручную или с помощью компьютерной программы (например Image J).

Используемый в данном документе термин "эталонный уровень" относится к предварительно определенному критерию, применяемому в качестве эталона для оценки значений или данных, полученных из образца, полученного от индивидуума. Эталонный уровень может представлять собой абсолютное значение; относительное значение; значение с верхним и нижним пределами; диапазон значений; усредненное значение; медианное значение; среднее значение; или значение, сравниваемое с конкретным контрольным или исходным значением. Эталонный уровень может быть основан на значении образца, полученного от индивидуума, таком как, например, значение, полученное из образца, полученного от тестируемого субъекта, но в более ранний момент времени. Эталонный уровень может быть основан на большом количестве образцов, например, из популяции субъектов подобного хронологического возраста, пола, состояния заболевания или иным образом объединенной группы, или основан на пуле образцов с включением или исключением тестируемого образца. Эталонный уровень можно также определять с применением иллюстративного количества раковых/опухолевых образцов, полученных от разных индивидуумов, пораженных раком. Эталонный уровень можно также определять с применением биологических образцов, полученных от индивидуумов, пораженных раком или заболеванием, отличным от рака. Эти биологические образцы, полученные от индивидуумов, пораженных раком или заболеванием, отличным от рака, могут включать, например, биоптаты ткани, кровь, плазму крови, сыворотку крови, образцы кала, мочи, спинномозговой жидкости, мазок из шейки матки или семенную жидкость. Иллюстративный образец может включать измерения показателей по меньшей мере 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 или больше индивидуумов или биологических образцов рака/опухоли, полученных от индивидуумов.

Процент (%) идентичности последовательностей относительно эталонной последовательности полипептида или антитела представляет собой процентную долю аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в эталонной последовательности полипептида или антитела после выравнивания последовательностей и введения гэпов при необходимости для достижения максимального процента идентичности последовательностей и без учета каких-либо консервативных замен как части идентичности последовательностей. Выравнивание с целью определения процента идентичности аминокислотных последовательностей может быть достигнуто различными известными способами, например с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Могут быть определены подходящие параметры для выравнивания последовательностей, в том числе алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Однако в данном документе значения % идентичности аминокислотных последовательностей получают с использованием компьютерной программы для сравнения последовательностей ALIGN-2. Компьютерная программа для сравнения последовательностей ALIGN-2 была разработана Genentech, Inc., а исходный код был подан вместе с пользовательской документацией в Бюро авторского права США, Вашингтон, округ Колумбия, 20559, где он зарегистрирован под регистрационным номером авторских прав США TXU510087. Программа ALIGN-2 находится в открытом доступе, и ее можно получить от Genentech, Inc., Южный Сан-Франциско, Калифорния, США, или же ее можно скомпилировать из исходного кода. Программа ALIGN-2 должна быть скомпилирована для использования в операционной системе UNIX, включая цифровую версию UNIX V4.0D. Все параметры сравнения последовательностей задаются программой ALIGN-2 и не изменяются.

В тех случаях, когда для сравнения аминокислотных последовательностей используется ALIGN-2, % идентичности аминокислотной последовательности, свойственный данной аминокислотной последовательности А, в отношении данной аминокислотной последовательности В, с ней или в сравнении с ней (что в качестве альтернативы можно перефразировать как: данная аминокислотная последовательность А, которая характеризуется или обладает определенным % идентичности аминокислотной последовательности в отношении данной аминокислотной последовательности В, с ней или в сравнении с ней) рассчитывается следующим образом: частное X/Y умножить на 100, где X представляет собой число аминокислотных остатков, учитываемых в качестве идентичных совпадений программой для выравнивания последовательностей ALIGN-2 в выравнивании А и В данной программы, и где Y представляет собой общее число аминокислотных остатков в В. Следует принимать во внимание, что если длина аминокислотной последовательности А не равна длине аминокислотной последовательности В, то % идентичности аминокислотной последовательности А в отношении В не будет равен % идентичности аминокислотной последовательности В в отношении А. Если специально не указано иное, все значения % иден-

тичности аминокислотной последовательности, используемые в данном документе, получены так, как это описано в предыдущем параграфе, с использованием компьютерной программы ALIGN-2.

Термин "эпитоп" включает любую детерминанту, способную связываться с антигенсвязывающим белком, таким как антитело. Эпитоп представляет собой область антигена, которая связывается антигенсвязывающим белком, который нацелен на этот антиген, и когда антиген представляет собой белок, включает специфические аминокислоты, которые непосредственно контактируют с антигенсвязывающим белком. Чаще всего эпитопы расположены на белках, но в некоторых случаях могут располагаться на других типах молекул, таких как сахараиды или липиды. Эпитопные детерминанты могут включать химически активные поверхностные группировки молекул, такие как аминокислоты, боковые цепи Сахаров, фосфорильные или сульфонильные группы, и могут обладать специфическими характеристиками трехмерной структуры и/или специфическими характеристиками заряда. Обычно антитела, специфические к конкретному антигену-мишени, будут предпочтительно распознавать эпитоп на антигене-мишени среди сложного комплекса белков и/или макромолекул. В определенных вариантах осуществления антитела, раскрытые в данном документе, распознают линейную последовательность аминокислот. В определенных вариантах осуществления антитела, раскрытые в данном документе, распознают конформационные (нелинейные) группы аминокислот.

Структурные атрибуты описанных в данном документе антител.

Определяющая комплементарность область ("CDR") является частью варибельной области иммуноглобулина (антитела), которая прежде всего отвечает за специфичность антигенного связывания антитела. Области CDR значительно варьируются в разных антителах, даже если антитела специфически связывают одни и те же мишень или эпитоп. Варибельная область тяжелой цепи содержит три области CDR, сокращенно именуемые VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3; и варибельная область легкой цепи содержит три области CDR, сокращенно именуемые VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3. Эти области CDR последовательно расположены в варибельной области, причем CDR1 расположена наиболее близко к N-концу, а CDR3 расположена наиболее близко к C-концу. Между CDR находятся каркасные области, которые вносят вклад в структуру и демонстрируют гораздо меньшую варибельность, чем области CDR. Варибельная область тяжелой цепи содержит четыре каркасных области, сокращенно именуемых VH-FR1, VH-FR2, VH-FR3 и VH-FR4; и варибельная область легкой цепи содержит четыре каркасных области, сокращенно именуемых VL-FR1, VL-FR2, VL-FR3 и VL-FR4. Полные полноразмерные бивалентные антитела, содержащие две тяжелые и легкие цепи, будут содержать: 12 CDR, с тремя уникальными CDR тяжелой цепи и тремя уникальными CDR легкой цепи; 16 областей FR, с четырьмя уникальными областями FR тяжелой цепи и четырьмя уникальными областями FR легкой цепи. В определенных вариантах осуществления антитела, описанные в данном документе, содержат по меньшей мере три CDR тяжелой цепи. В определенных вариантах осуществления антитела, описанные в данном документе, содержат по меньшей мере три CDR легкой цепи. В определенных вариантах осуществления антитела, описанные в данном документе, содержат по меньшей мере три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи. Точные границы аминокислотной последовательности указанной CDR или FR можно легко определить с помощью любой из ряда хорошо известных схем, включая схемы, описанные в Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (схема нумерации по "Kabat"); Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948 (схема нумерации по "Chothia"); MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), "Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography," (схема нумерации "Контакт"); Lefranc MP et al., "IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains," Dev Comp Immunol, 2003 Jan;27(1):55-77 (схема нумерации "IMGT"); и Honegger A and Plückthun A, "Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool," J Mol Biol, 2001 Jun 8;309(3):657-70, (схема нумерации "Aho"). CDR в данном документе идентифицируются среди представленных варибельных последовательностей с использованием различных систем нумерации, с использованием системы нумерации по Kabat, IMGT, по Chothia или любой их комбинации. Границы данной CDR или FR могут варьироваться в зависимости от схемы, используемой для идентификации. Например, схема по Kabat основана на структурных выравниваниях, тогда как схема по Chothia основана на структурной информации. Нумерация как для схем по Kabat, так и для схем по Chothia основана на наиболее распространенных значениях длины последовательностей области антитела со вставками, обозначенными буквами, например "30a", и делециями, возникающими в некоторых антителах. Две схемы помещают определенные вставки и делеции ("вставки/делеции") в разные положения, что дает разную нумерацию. Схема Контакт основана на анализе сложных кристаллических структур и во многих отношениях сходна со схемой нумерации по Chothia. В определенных вариантах осуществления CDR, определенные из варибельных областей, раскрытых в данном документе, включают CDR, определенные в соответствии со схемой по Chothia, Kabat, IMGT, Контакт или Aho, или любой их комбинацией.

Термин "варибельная область" или "варибельный домен" относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, который участвует в связывании антитела с антигеном. Варибельные домены тяжелой цепи и легкой цепи (VH и VL соответственно) нативного антитела обычно имеют схожие структуры, причем каждый домен содержит четыре консервативных каркасных области (FR) и три CDR (см., напри-

мер, Kindt et al. *Kuby Immunology*, 6th ed, W.H. Freeman and Co., page 91(2007)). Одного домена VH или VL может быть достаточно для придания антигенсвязывающей специфичности. Кроме того, антитела, которые связывают конкретный антиген, могут быть выделены с использованием домена VH или VL антитела, которое связывает антиген, для скрининга библиотеки комплементарных доменов VL или VH соответственно (см., например, Portolano et al., *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson et al., *Nature* 352:624-628 (1991)). В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе антитела содержат переменные области крысиного происхождения. В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе антитела содержат CDR крысиного происхождения. В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе антитела содержат переменные области мышиного происхождения. В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе антитела содержат CDR мышиного происхождения.

В CDR могут быть внесены изменения (например, замены), например, для повышения аффинности антитела. Такие изменения могут быть внесены в кодоны, кодирующие CDR, с высокой скоростью мутаций в ходе соматического созревания (см. например, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)), и полученный вариант может быть протестирован на аффинность связывания. Созревание аффинности (например, с использованием ПЦР с ошибающейся полимеразой, перестановки цепей, рандомизации CDR или олигонуклеотид-направленного мутагенеза) можно использовать для улучшения аффинности антитела (см., например, Hoogenboom et al. *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (2001)). Остатки CDR, вовлеченные в связывание антигена, могут быть специфически идентифицированы, например, с использованием аланин-сканирующего мутагенеза или моделирования (см., например, Cunningham and Wells *Science*, 244:1081-1085 (1989)). CDR-H3 и CDR-L3, в частности, часто становятся мишенью. Альтернативно или дополнительно кристаллическую структуру комплекса антиген-антитело анализируют для определения точек контакта между антителом и антигеном. Такие контактные остатки и соседние остатки могут быть мишенью или могут быть исключены как кандидаты на замену. Варианты могут быть проверены, чтобы определить, имеют ли они требуемые свойства.

В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе антитела содержат константную область в дополнение к переменной области. Константная область тяжелой цепи (C_H) содержит четыре домена, сокращенно именуемые C_H1, C_H2, C_H3 и C_H4, расположенные на С-конце полипептида полной тяжелой цепи, со стороны С-конца переменной области. Константная область легкой цепи (C_L) существенно меньше, чем C_H, и расположена на С-конце полипептида полной легкой цепи, со стороны С-конца переменной области. Константная область является высококонсервативной и содержит разные изоформы, которые связаны с несколькими отличающимися функциями и свойствами. В определенных вариантах осуществления константная область не обязательна для связывания антитела с антигеном-мишенью. В определенных вариантах осуществления константные области антитела, как тяжелой, так и легкой цепей, не обязательны для связывания антитела. В определенных вариантах осуществления в описанных в данном документе антителах отсутствуют одна или несколько константных областей легкой цепи, константных областей тяжелой цепи или обеих цепей. Большинство моноклональных антител относятся к изоформе IgG, который дополнительно подразделяют на четыре подкласса: IgG₁, IgG₂, IgG₃ и IgG₄. В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе антитела предусматривают любой подкласс IgG. В определенных вариантах осуществления подкласс IgG предусматривает IgG₁. В определенных вариантах осуществления подкласс IgG предусматривает IgG₂. В определенных вариантах осуществления подкласс IgG предусматривает IgG₃. В определенных вариантах осуществления подкласс IgG предусматривает IgG₄.

Антитела содержат область кристаллизующегося фрагмента (область Fc), которая отвечает за связывание с комплементом и рецепторами Fc. Область Fc содержит области C_H2, C_H3 и C_H4 молекулы антитела. Область Fc антитела отвечает за активацию комплемента и за антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC). Область Fc также вносит вклад в период полужизни антитела в сыворотке крови. В определенных вариантах осуществления область Fc терапевтических антител, описанных в данном документе, содержит одну или несколько аминокислотных замен, которые способствуют комплемент-опосредованному лизису клеток. В определенных вариантах осуществления область Fc терапевтических антител, описанных в данном документе, содержит одну или несколько аминокислотных замен, которые способствуют ADCC. В определенных вариантах осуществления область Fc терапевтических антител, описанных в данном документе, содержит одну или несколько аминокислотных замен, которые снижают эффективность комплемент-опосредованного лизиса клеток. В определенных вариантах осуществления область Fc терапевтических антител, описанных в данном документе, содержит одну или несколько аминокислотных замен, которые повышают степень связывания антитела с рецептором Fc. В определенных вариантах осуществления рецептор Fc включает FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32), FcγRIIA (CD16a), FcγRIIB (CD16b) или любую их комбинацию. В определенных вариантах осуществления область Fc терапевтических антител, описанных в данном документе, содержит одну или несколько аминокислотных замен, которые увеличивают период полужизни антитела в сыворотке крови. В определенных вариантах осуществления одна или несколько аминокислотных замен, которые увеличивают

время полужизни терапевтического антитела в сыворотке крови, повышают аффинность антитела к неонатальному рецептору Fc (FcRn).

Антитела, применимые в клинических условиях, часто "гуманизируют" для снижения иммуногенности у индивидуумов-людей. Гуманизированные антитела повышают безопасность и эффективность терапии моноклональными антителами. Одним из распространенных способов гуманизации является получение моноклонального антитела у любого подходящего животного (например, мыши, крысы, хомяка) и замена константной области на человеческую константную область; сконструированные таким образом антитела называются "химерными". Другой распространенный способ представляет собой "прививание CDR", при котором отличные от человеческих V-FR заменяют человеческими V-FR. В способе прививания CDR все остатки за исключением области CDR имеют человеческое происхождение. В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе антитела являются гуманизированными. В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе антитела являются химерными. В определенных вариантах осуществления к описанным в данном документе антителам привиты CDR.

Способы определения лечения с помощью терапевтического антитела к LIF Описанные в данном документе способы включают лечение индивидуума с помощью терапевтического антитела к LIF, если уровень биомаркера превышает эталонный уровень в образце, полученном от индивидуума. Образец может включать образец крови, образец плазмы крови, образец сыворотки крови, образец мочи, образец кала или образец ткани, такой как биоптат ткани из подозреваемой или известной опухоли. Биомаркер может включать LIF, рецептор LIF, маркер клетки макрофага типа II (M2), маркер регуляторной Т-клетки, активированной Т-клетки, "обученной" антигеном Т-клетки, цитотоксической Т-клетки, иммуносупрессивный цитокин, или иммуносупрессивный хемокин, или фосфорилированный STAT3, или любую другую иммуномодулирующую молекулу. Уровни биомаркеров можно определять с помощью любой из широко применяемых методик молекулярной или клеточной биологии, таких как без ограничения: количественное определение мРНК с помощью полуколичественной ПЦР, цифровой ПЦР, ПЦР в реальном времени или секвенирования РНК; или количественное определение белка с помощью вестерн-блоттинга, проточной цитометрии, массовой цитометрии, ELISA, иммунофлуоресцентного анализа или гомогенных количественных анализов белка (например, AlphaLISA®). В определенных вариантах осуществления биомаркер определяют посредством иммуногистохимического исследования с применением антитела, специфического к определенному биомаркеру. Иммуногистохимическое исследование можно осуществлять на биоптате или образце крови, полученном от индивидуума. С применением иммуногистохимического исследования можно определять показатель ИНС для определенного белка и сравнивать с эталонным уровнем или контрольным образцом. Кроме того, для принятия решения о лечении можно определять уровни белка, мРНК или ДНК комбинаций биомаркеров.

В определенных вариантах осуществления биомаркер представляет собой LIF. В определенных вариантах осуществления индивидуум, получавший лечение с помощью антител по настоящему изобретению, был выбран для лечения как имеющий LIF-положительную опухоль/LIF-положительный рак. В определенных вариантах осуществления опухоль является LIF-положительной или продуцирует повышенные уровни LIF. В определенных вариантах осуществления LIF-положительностью определяют посредством сравнения с эталонным значением или установленными патологическими критериями. В определенных вариантах осуществления LIF-положительная опухоль экспрессирует LIF в количестве, которое в более чем 2, 3, 5, 10, 100 раз или больше превышает количество LIF, которое экспрессирует не-трансформированная клетка, из которой произошла опухоль. В определенных вариантах осуществления опухоль приобрела эктопическую экспрессию LIF.

Уровни белка LIF можно определять количественно или полуколичественно с применением иммуногистохимического исследования. В определенных вариантах осуществления показатель ИНС для LIF можно рассчитать в образце, полученном от индивидуума, и если показатель ИНС составляет или превышает приблизительно 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240 или 250, то индивидууму вводят терапевтическое антитело к LIF. В определенных вариантах осуществления терапевтическое антитело представляет собой h5D8 или его антигенсвязывающий фрагмент. В определенных вариантах осуществления образец представляет собой образец ткани или образец биоптата ткани. В определенных вариантах осуществления процентную долю LIF-положительных клеток можно определять в образце, полученном от индивидуума, и если процентная доля LIF-положительных клеток превышает 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 или 80%, то индивидууму вводят терапевтическое антитело к LIF. В определенных вариантах осуществления терапевтическое антитело представляет собой h5D8 или его антигенсвязывающий фрагмент. В определенных вариантах осуществления образец представляет собой образец ткани или образец биоптата ткани. Эталонный уровень показателя ИНС для LIF получают из уровней, наблюдаемых в популяции, состоящей из по меньшей мере N образцов. В определенных вариантах осуществления N равняется или составляет более 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 или больше. В определенных вариантах осуществления образец включает виды рака подобного типа (например, определение эталонного уровня для конкретного рака) или все виды рака (например, определение эталонного уровня для всех

видов рака). Разные типы рака могут характеризоваться разными эталонными уровнями, что указывает на повышенный шанс успешного лечения с помощью h5D8, таким образом, показатель ИНС для LIF может быть специфическим в отношении определенного вида рака. В определенных вариантах осуществления показатель ИНС для LIF является специфическим в отношении любого или нескольких из немелкоклеточного рака легкого, рака яичника, рака почки, рака мочевого пузыря, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака урогенитального тракта, гинекологического рака, рака желудочно-кишечного тракта, рака эндокринной системы, мультиформной глиобластомы, рака молочной железы, меланомы, колоректального рака, рака желчного протока, рака шейки матки, рака эндометрия и плоскоклеточной карциномы головы и шеи.

Уровни белка LIF можно определять количественно или полуколичественно с применением анализа на основе ELISA. В определенных вариантах осуществления количество белка LIF можно определять в образце, полученном от индивидуума, и если количество белка превышает 1 пикограмм/миллилитр (пг/мл), 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 пг/мл, то индивидууму вводят терапевтическое антитело к LIF. В определенных вариантах осуществления терапевтическое антитело представляет собой h5D8 или его антигенсвязывающий фрагмент. В определенных вариантах осуществления количество белка LIF можно определять в образце, полученном от индивидуума, и если количество белка превышает 100 пг/мл), 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 пг/мл, 1 нанограмм/миллилитр (нг/мл), 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 нг/мл, то индивидууму вводят терапевтическое антитело к LIF. В определенных вариантах осуществления терапевтическое антитело представляет собой h5D8 или его антигенсвязывающий фрагмент. В определенных вариантах осуществления количество белка LIF можно определять в образце, полученном от индивидуума, и если количество белка превышает 100 пикограмм/миллилитр (пг/мл), 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 пг/мл, 1 нанограмм/миллилитр (нг/мл), 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 нг/мл, то индивидууму вводят терапевтическое антитело к LIF. В определенных вариантах осуществления терапевтическое антитело представляет собой h5D8 или его антигенсвязывающий фрагмент. В определенных вариантах осуществления образец представляет собой образец крови, образец плазмы крови или образец сыворотки крови. Эталонный уровень по ELISA получают из уровней, наблюдаемых в популяции из по меньшей мере N образцов. В определенных вариантах осуществления N равняется или составляет более 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 или больше. В определенных вариантах осуществления образец включает виды рака подобного типа (например, определение эталонного уровня для конкретного рака) или все виды рака (например, определение эталонного уровня для всех видов рака). Разные типы рака могут характеризоваться разными эталонными уровнями, что указывает на повышенный шанс успешного лечения с помощью h5D8, таким образом, эталонный уровень LIF по ELISA может быть специфическим в отношении определенного вида рака. В определенных вариантах осуществления эталонный уровень LIF по ELISA является специфическим в отношении любого или нескольких из немелкоклеточного рака легкого, рака яичника, рака почки, рака мочевого пузыря, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака урогенитального тракта, гинекологического рака, рака желудочно-кишечного тракта, рака эндокринной системы, мультиформной глиобластомы, рака молочной железы, меланомы, колоректального рака, рака желчного протока, рака шейки матки, рака эндометрия и плоскоклеточной карциномы головы и шеи.

Уровни мРНК LIF можно определять количественно или полуколичественно с применением ПЦР в реальном времени или секвенирования РНК. В определенных вариантах осуществления можно определять уровень мРНК LIF, и если уровень мРНК LIF превышает уровень, соответствующий 25-, 30-, 35-, 40-, 45-, 50-, 55-, 60-, 65-, 70- или 75-му процентилю, то индивидууму вводят терапевтическое антитело к LIF. В определенных вариантах осуществления терапевтическое антитело представляет собой h5D8 или его антигенсвязывающий фрагмент. Эталонный уровень по процентилю относится к уровням мРНК, наблюдаемым в популяции из по меньшей мере N образцов. В определенных вариантах осуществления N равняется или составляет более 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 или больше. В определенных вариантах осуществления образец включает виды рака подобного типа (например, определение эталонного уровня для конкретного рака) или все виды рака (например, определение эталонного уровня для всех видов рака). Разные типы рака могут характеризоваться разными эталонными уровнями, что указывает на повышенный шанс успешного лечения с помощью h5D8, таким образом, эталонный уровень мРНК LIF может быть специфическим в отношении определенного вида рака. В определенных вариантах осуществления эталонный уровень мРНК LIF является специфическим в отношении любого или нескольких из немелкоклеточного рака легкого, рака яичника, рака почки, рака мочевого пузыря, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака урогенитального тракта, гинекологического рака, рака желудочно-кишечного тракта, рака эндокринной системы, мультиформной глиобластомы, рака молочной железы, меланомы, колоректального рака, рака желчного протока, рака шейки матки, рака эндометрия и плоскоклеточной карциномы головы и шеи.

LIF передает сигналы через связывание с рецептором LIF и gp130. В определенных вариантах осуществления антитела, раскрытые в данном документе, являются применимыми для лечения опухолей или видов рака, которые экспрессируют рецептор LIF (CD 118) либо непосредственно на раковой клетке, либо на миелодных клетках, ассоциированных с опухолью (например, макрофагах или супрессорных

клетках миелоидного происхождения), клетках стромы (фибробластах, ассоциированных с раком) или эндотелиальных клетках. Макрофагами, ассоциированными с опухолью, могут быть специфические иммуносупрессивные макрофаги, такие как макрофаги типа II (M2).

В определенных вариантах осуществления биомаркер представляет собой рецептор LIF. В определенных вариантах осуществления индивидуум, получавший лечение с помощью антител по настоящему изобретению, был выбран для лечения как имеющий опухоль, положительную по рецептору LIF/рак, положительный по рецептору LIF. В определенных вариантах осуществления индивидуум, получавший лечение с помощью антител по настоящему изобретению, был выбран для лечения как имеющий инфильтраты, положительные по рецептору LIF, в участках опухоли, что оценивается, например, с помощью ИНС, проточной цитометрии или количественного определения мРНК. Такие инфильтраты могут включать иммуномодулирующие клетки, такие как макрофаги, ассоциированные с опухолью, макрофаги типа II, супрессорные клетки миелоидного происхождения, полученные из опухоли полиморфоядерные супрессорные клетки миелоидного происхождения (PMN-MDSC).

В определенных вариантах осуществления антитела, раскрытые в данном документе, являются применимыми для лечения опухолей или видов рака, при которых экспрессируется рецептор LIF. Опухоль, положительная по рецептору LIF, может быть определена посредством гистопатологического анализа или проточной цитометрии и в определенных вариантах осуществления включает клетку, которая связывает антитело к рецептору LIF с более чем 2x, 3x, 4x, 5x, 10x или большей силой по сравнению с изотипическим контролем. В определенных вариантах осуществления опухоль приобрела эктопическую экспрессию рецептора LIF. В определенном варианте осуществления раковая клетка представляет собой раковую стволовую клетку. В определенном варианте осуществления опухоль или рак, положительные по рецептору LIF, могут быть определены посредством иммуногистохимического исследования с использованием антитела к рецептору LIF. В определенных вариантах осуществления уровень белка или мРНК рецептора LIF определяют в ассоциации с одной или несколькими популяциями клеток, ассоциированных с иммуносупрессивным ответом. В определенных вариантах осуществления популяция клеток представляет собой миелоидные клетки, клетки-макрофаги, клетки M2, нейтрофилы, супрессорные клетки миелоидного происхождения, опухолевые клетки M-MDSC или опухолевые клетки PMN-MDSC.

Уровни белка рецептора LIF можно определять количественно или полуколичественно с применением иммуногистохимического исследования. ИНС-анализ в отношении рецептора LIF может быть на основе рецептора LIF, экспрессирующегося на всех клетках в образце, на всех клетках иммунной системы в образце, всех клетках миелоидного происхождения в образце или всех макрофагах в образце. В определенных вариантах осуществления показатель ИНС для рецептора LIF можно рассчитать в образце, полученном от индивидуума, и если показатель ИНС составляет или превышает приблизительно 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240 или 250, то индивидууму вводят терапевтическое антитело к LIF. В определенных вариантах осуществления терапевтическое антитело представляет собой h5D8 или его антигенсвязывающий фрагмент. В определенных вариантах осуществления образец представляет собой образец ткани или образец биоптата ткани. В определенных вариантах осуществления процентную долю клеток, положительных по рецептору LIF, можно определять в образце, полученном от индивидуума, и если процентная доля клеток, положительных по рецептору LIF, превышает 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 или 80%, то индивидууму вводят терапевтическое антитело к LIF. В определенных вариантах осуществления терапевтическое антитело представляет собой h5D8 или его антигенсвязывающий фрагмент. В определенных вариантах осуществления образец представляет собой образец ткани или образец биоптата ткани. Эталонный уровень показателя ИНС для рецептора LIF получают из уровней, наблюдаемых в популяции, состоящей из по меньшей мере N образцов. В определенных вариантах осуществления N равняется или составляет более 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 или больше. В определенных вариантах осуществления образец включает виды рака подобного типа (например, определение эталонного уровня для конкретного рака) или все виды рака (например, определение эталонного уровня для всех видов рака).

Разные типы рака могут характеризоваться разными эталонными уровнями, что указывает на повышенный шанс успешного лечения с помощью h5D8, таким образом, показатель ИНС для рецептора LIF может быть специфическим в отношении определенного вида рака. В определенных вариантах осуществления показатель ИНС для рецептора LIF является специфическим в отношении любого или нескольких из немелкоклеточного рака легкого, рака яичника, рака почки, рака мочевого пузыря, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака уrogenитального тракта, гинекологического рака, рака желудочно-кишечного тракта, рака эндокринной системы, мультиформной глиобластомы, рака молочной железы, меланомы, колоректального рака, рака желчного протока, рака шейки матки, рака эндометрия и плоскоклеточной карциномы головы и шеи.

Уровни белка рецептора LIF можно определять количественно или полуколичественно с применением анализа на основе проточной цитометрии. В определенных вариантах осуществления уровень белка рецептора LIF можно определять в образце, полученном от индивидуума, и если количество белка превышает 1,5x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x по сравнению с контрольным антителом (например, изоти-

пический контроль), то индивидууму вводят терапевтическое антитело к LIF. В определенных вариантах осуществления терапевтическое антитело представляет собой h5D8 или его антигенсвязывающий фрагмент. В определенных вариантах осуществления образец представляет собой образец крови, образец плазмы крови или образец сыворотки крови. Эталонный уровень по проточной цитометрии получают из уровней, наблюдаемых в популяции, состоящей из по меньшей мере N образцов. В определенных вариантах осуществления N равняется или составляет более 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 или больше. В определенных вариантах осуществления образец включает виды рака подобного типа (например, определение эталонного уровня для конкретного рака) или все виды рака (например, определение эталонного уровня для всех видов рака). Разные типы рака могут характеризоваться разными эталонными уровнями, что указывает на повышенный шанс успешного лечения с помощью h5D8, таким образом, эталонный показатель LIF по проточной цитометрии может быть специфическим в отношении определенного вида рака. В определенных вариантах осуществления эталонный уровень LIF по проточной цитометрии является специфическим в отношении любого или нескольких из немелкоклеточного рака легкого, рака яичника, рака почки, рака мочевого пузыря, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака уrogenитального тракта, гинекологического рака, рака желудочно-кишечного тракта, рака эндокринной системы, мультиформной глиобластомы,

рака молочной железы, меланомы, колоректального рака, рака желчного протока, рака шейки матки, рака эндометрия и плоскоклеточной карциномы головы и шеи.

Уровни мРНК рецептора LIF можно определять количественно или полуколичественно с применением ПЦР в реальном времени или секвенирования РНК. В определенных вариантах осуществления можно определять уровень мРНК рецептора LIF, и если уровень мРНК рецептора LIF превышает уровень, соответствующий 25-, 30-, 35-, 40-, 45-, 50-, 55-, 60-, 65-, 70- или 75-му перцентилю, то индивидууму вводят терапевтическое антитело к LIF. В определенных вариантах осуществления терапевтическое антитело представляет собой h5D8 или его антигенсвязывающий фрагмент. Эталонный уровень по перцентилю относится к уровням мРНК, наблюдаемым в популяции из по меньшей мере N образцов. В определенных вариантах осуществления N равняется или составляет более 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 или больше. В определенных вариантах осуществления образец включает виды рака подобного типа (например, определение эталонного уровня для конкретного рака) или все виды рака (например, определение эталонного уровня для всех видов рака). Разные типы рака могут характеризоваться разными эталонными уровнями, что указывает на повышенный шанс успешного лечения с помощью h5D8, таким образом, эталонный уровень мРНК LIF может быть специфическим в отношении определенного вида рака. В определенных вариантах осуществления эталонный уровень мРНК LIF является специфическим в отношении любого или нескольких из немелкоклеточного рака легкого, рака яичника, рака почки, рака мочевого пузыря, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака уrogenитального тракта, гинекологического рака, рака желудочно-кишечного тракта, рака эндокринной системы, мультиформной глиобластомы, рака молочной железы, меланомы, колоректального рака, рака желчного протока, рака шейки матки, рака эндометрия и плоскоклеточной карциномы головы и шеи.

Дополнительные биомаркеры, описанные в данном документе и применимые в способах лечения индивидуума с помощью терапевтического антитела к LIF, включают иммуносупрессивные биомаркеры. В данном документе показано, что LIF и рецептор LIF являются важными для передачи сигнала в различных типах иммуномодулирующих клеток и, таким образом, иммуносупрессивные биомаркеры могут служить в качестве индикаторов успеха потенциального лечения. Эти биомаркеры можно использовать отдельно или объединять с определением уровней LIF и рецептора LIF. В определенных вариантах осуществления, если уровень белка, мРНК или ДНК иммуносупрессивного биомаркера превышает эталонный уровень, то индивидууму вводят терапевтическое антитело к LIF. В определенных вариантах осуществления терапевтическое антитело представляет собой h5D8 или его антигенсвязывающий фрагмент. В определенных вариантах осуществления, если уровень белка, мРНК или ДНК иммуносупрессивного биомаркера превышает эталонный уровень, и уровень LIF превышает эталонный уровень, то индивидууму вводят терапевтическое антитело к LIF. В определенных вариантах осуществления терапевтическое антитело представляет собой h5D8 или его антигенсвязывающий фрагмент. В определенных вариантах осуществления, если уровень белка, мРНК или ДНК иммуносупрессивного биомаркера превышает эталонный уровень, и уровень рецептора LIF превышает эталонный уровень, то индивидууму вводят терапевтическое антитело к LIF. В определенных вариантах осуществления терапевтическое антитело представляет собой h5D8 или его антигенсвязывающий фрагмент.

В определенных вариантах осуществления комбинацию всех трех из LIF, рецептора LIF и иммуносупрессивного биомаркера можно использовать для отбора индивидуума для лечения. Важные иммуномодулирующие и иммуносупрессивные биомаркеры по настоящему изобретению включают биомаркеры, которые ассоциированы с регуляторными Т-клетками, активированными Т-клетками, "обученными" антигеном Т-клетками, цитотоксическими Т-клетками, и их соответствующие продукты функциональной активности, включая хемокины и цитокины, высвобожденные макрофагами, ассоциированными с опухолью или присутствующими в микроокружении опухоли; маркеры супрессорных клеток миелоидного

индивидууму вводят терапевтическое антитело к LIF. В определенных вариантах осуществления пациента выбирают для лечения, если уровни CD163 превышают эталонный уровень. В определенных вариантах осуществления, если уровень CD163 превышает 1,5x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x по сравнению с контрольным антителом (например, изотипическим контролем), то индивидууму вводят терапевтическое антитело к LIF. В определенных вариантах осуществления пациента выбирают для лечения, если уровни PF4 превышают эталонный уровень. В определенных вариантах осуществления, если уровень PF4 превышает 1,5x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x по сравнению с контрольным антителом (например, изотипическим контролем), то индивидууму вводят терапевтическое антитело к LIF. В определенных вариантах осуществления пациента выбирают для лечения, если уровни CTSK превышают эталонный уровень. В определенных вариантах осуществления, если уровень CTSK превышает 1,5x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x по сравнению с контрольным антителом (например, изотипическим контролем), то индивидууму вводят терапевтическое антитело к LIF. В определенных вариантах осуществления пациента выбирают для лечения, если уровни ARG1 превышают эталонный уровень. В определенных вариантах осуществления, если уровень ARG1 превышает 1,5x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x по сравнению с контрольным антителом (например, изотипическим контролем), то индивидууму вводят терапевтическое антитело к LIF. Уровни белка иммуносупрессивных биомаркеров можно определять с помощью вестерн-блоттинга, ELISA, проточной цитометрии или ИНС; уровни мРНК иммуносупрессивных биомаркеров можно определять с помощью количественной ПЦР или секвенирования РНК. В определенных вариантах осуществления терапевтическое антитело представляет собой h5D8 или его антигенсвязывающий фрагмент. В определенных вариантах осуществления, если уровень иммуносупрессивного биомаркера, описанного в данном документе, превышает эталонный уровень, пациента выбирают для лечения с помощью терапевтического антитела к LIF. В определенных вариантах осуществления, если уровень иммуносупрессивного биомаркера превышает эталонный уровень, и уровень LIF превышает эталонный уровень, то индивидууму вводят терапевтическое антитело к LIF. В определенных вариантах осуществления, если уровень иммуносупрессивного биомаркера превышает эталонный уровень, и уровень рецептора LIF превышает эталонный уровень, то индивидууму вводят терапевтическое антитело к LIF. В определенных вариантах осуществления комбинацию всех трех из LIF, рецептора LIF и иммуносупрессивного биомаркера можно использовать для отбора индивидуума для лечения.

Дополнительные биомаркеры, описанные в данном документе и применимые в способах определения лечения индивидуума с помощью терапевтического антитела к LIF, включают маркеры передачи сигнала LIF. В определенных вариантах осуществления маркер передачи сигнала LIF представляет собой фосфорилированный STAT3. В определенных вариантах осуществления пациента выбирают для лечения, если уровни фосфорилированного STAT3 превышают эталонный уровень. В определенных вариантах осуществления, если уровень pSTAT3 превышает 1,5x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x по сравнению с контрольным антителом (например, изотипическим контролем), то индивидууму вводят терапевтическое антитело к LIF. В определенных вариантах осуществления терапевтическое антитело представляет собой h5D8 или его антигенсвязывающий фрагмент.

Терапевтические антитела к LIF.

Антитело 5D8, описанное в данном документе, было получено от крыс, иммунизированных ДНК, кодирующей человеческий LIF. Исходная версия крысиного антитела обозначена как r5D8, гуманизованная версия обозначена как h5D8.

5D8.

Описанные в данном документе антитела были получены от крыс, иммунизированных ДНК, кодирующей человеческий LIF. Одно такое антитело (5D8) было клонировано и секвенировано и содержит CDR (с применением комбинации способов нумерации CDR по Kabat и LMGT) со следующими аминокислотными последовательностями: VH-CDR1, соответствующая SEQ ID NO: 1 (GFTFSHAWMH), VH-CDR2, соответствующая SEQ ID NO: 4 (QLKAKSDDYATYYAESVKG), VH-CDR3, соответствующая SEQ ID NO: 6 (TCWEWDLDF), VL-CDR1, соответствующая SEQ ID NO: 9 (RSSQSLDSDGHTYLN), VL-CDR2, соответствующая SEQ ID NO: 11 (SVSNLES), и VL-CDR3, соответствующая SEQ ID NO: 13 (MQATHAPPYT). Данное антитело гуманизировали посредством прививания CDR, и его гуманизованный вариант обозначен как h5D8. Области V_H и V_L представлены под SEQ ID NO: 15 и 19.

В определенных вариантах осуществления в данном документе описано терапевтическое антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее VH-CDR1, которая на по меньшей мере 80% или 90% идентична последовательности, представленной под SEQ ID NO: 1 (GFTFSHAWMH), VH-CDR2, которая на по меньшей мере 80, 90 или 95% идентична последовательности, представленной под SEQ ID NO: 4 (QLKAKSDDYATYYAESVKG), и VH-CDR3, которая на по меньшей мере 80% или 90% идентична последовательности, представленной под SEQ ID NO: 6 (TCWEWDLDF). В определенных вариантах осуществления в данном документе описано терапевтическое антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее VL-CDR1, которая на по меньшей мере 80% или 90% идентична последовательности, представленной под SEQ ID NO: 9 (RSSQSLDSDGHTYLN), VL-CDR2, которая на по меньшей мере 80% идентична последовательности, представленной под SEQ ID NO: 11 (SVSNLES), и VL-CDR3, которая на по меньшей мере 80 или 90% идентична последовательности, представленной под SEQ ID NO: 13

(MQATHAPPYT). В определенных вариантах осуществления в данном документе описано терапевтическое антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее VH-CDR1, представленную под SEQ ID NO: 1 (GFTFSHAWMH), VH-CDR2, представленную под SEQ ID NO: 4 (QIKAKSDDYATYYAESVKG), VH-CDR3, представленную под SEQ ID NO: 6 (TCWEWDLDF), VL-CDR1, представленную под SEQ ID NO: 9 (RSSQSLLDSGDGHTYLN), VL-CDR2, представленную под SEQ ID NO: 11 (SVSNLES), и VL-CDR3, представленную под SEQ ID NO: 13 (MQATHAPPYT). Определенные консервативные аминокислотные замены предусмотрены в аминокислотных последовательностях CDR по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления антитело содержит CDR, которые отличаются от аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 1, 4, 6, 9, 11 и 13, по 1, 2, 3 или 4 аминокислотам. В определенных вариантах осуществления антитело содержит CDR, которые отличаются от аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 1, 4, 6, 9, 11 и 13, по 1, 2, 3 или 4 аминокислотам и не влияют на аффинность связывания более чем на 10%, 20% или 30%. В определенных вариантах осуществления антитела, которые специфически связывают LIF, содержат одну или несколько человеческих каркасных областей тяжелой цепи.

В определенных вариантах осуществления в данном документе описано терапевтическое антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее аминокислотную последовательность VH-CDR1, которая на по меньшей мере 80% или 90% идентична последовательности, представленной под SEQ ID NO: 1 (GFTFSHAWMH), аминокислотную последовательность VH-CDR2, которая на по меньшей мере 80, 90 или 95% идентична последовательности, представленной под SEQ ID NO: 4 (QIKAKSDDYATYYAESVKG), и аминокислотную последовательность VH-CDR3, которая на по меньшей мере 80% или 90% идентична последовательности, представленной под SEQ ID NO: 8 (TSWEWDLDF). В определенных вариантах осуществления в данном документе описано терапевтическое антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее аминокислотную последовательность VL-CDR1, которая на по меньшей мере 80% или 90% идентична последовательности, представленной под SEQ ID NO: 9 (RSSQSLLDSGDGHTYLN), аминокислотную последовательность VL-CDR2, которая на по меньшей мере 80% идентична последовательности, представленной под SEQ ID NO: 11 (SVSNLES), и аминокислотную последовательность VL-CDR3, которая на по меньшей мере 80% или 90% идентична последовательности, представленной под SEQ ID NO: 13 (MQATHAPPYT). В определенных вариантах осуществления в данном документе описано терапевтическое антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее аминокислотную последовательность VH-CDR1, представленную под SEQ ID NO: 1 (GFTFSHAWMH), аминокислотную последовательность VH-CDR2, представленную под SEQ ID NO: 4 (QIKAKSDDYATYYAESVKG), аминокислотную последовательность VH-CDR3, представленную под SEQ ID NO: 8 (TSWEWDLDF), аминокислотную последовательность VL-CDR1, представленную под SEQ ID NO: 9 (RSSQSLLDSGDGHTYLN), аминокислотную последовательность VL-CDR2, представленную под SEQ ID NO: 11 (SVSNLES), и аминокислотную последовательность VL-CDR3, представленную под SEQ ID NO: 13 (MQATHAPPYT). Определенные консервативные аминокислотные замены предусмотрены в аминокислотных последовательностях CDR по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления антитело содержит CDR, которые отличаются от аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 1, 4, 8, 9, 11 и 13, по 1, 2, 3 или 4 аминокислотам. В определенных вариантах осуществления антитело содержит CDR, которые отличаются от аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 1, 4, 8, 9, 11 и 13, по 1, 2, 3 или 4 аминокислотам и не влияют на аффинность связывания более чем на 10, 20 или 30%.

В определенных вариантах осуществления в данном документе описано терапевтическое антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее вариабельную область гуманизированной тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 14, 15 или 17. В определенных вариантах осуществления в данном документе описано терапевтическое антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее вариабельную область гуманизированной тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 14, 15 и 17. В определенных вариантах осуществления в данном документе описано терапевтическое антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее вариабельную область гуманизированной легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под любым из SEQ ID NO: 18-21. В определенных вариантах осуществления в данном документе описано терапевтическое антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее вариабельную область гуманизированной легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 18-21. В определенных вариантах осуществления антитело специфически связывает человеческий LIF.

В определенных вариантах осуществления в данном документе описано терапевтическое антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее вариабельную область гуманизированной тяжелой

нокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 23; и гуманизованную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 27. В определенных вариантах осуществления в данном документе описано терапевтическое антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее гуманизованную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 23; и гуманизованную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 27.

В определенных вариантах осуществления в данном документе описано терапевтическое антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее гуманизованную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 39; и гуманизованную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 27. В определенных вариантах осуществления в данном документе описано терапевтическое антитело, которое специфически связывает LIF, содержащее гуманизованную тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 39; и гуманизованную легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 27.

Эпитопы, связываемые терапевтически применимыми антителами к LIF В данном документе описан уникальный эпитоп человеческого LIF, который при его связывании подавляет биологическую активность LIF (например, фосфорилирование STAT3), и подавляет рост опухоли *in vivo*, и вызывает терапевтический эффект. Терапевтическое антитело по настоящему изобретению может представлять собой терапевтическое антитело, которое не содержит CDR из h5D8, но связывается с тем же или сходным эпитопом (аминокислотными остатками), что и h5D8. Сходный эпитоп представляет собой эпитоп, который связывается в пределах области связывания указанного эпитопа. Описанный в данном документе эпитоп состоит из двух прерывистых участков аминокислот (от остатка 13 до остатка 32 и от остатка 120 до остатка 138 LIF человека), которые присутствуют в двух различных топологических доменах (альфа-спирали А и С) человеческого белка LIF. Данное связывание представляет собой комбинацию слабого (ван-дер-ваальсовы силы), умеренного (водородные связи) и сильного (солевой мостик) взаимодействий. В определенных вариантах осуществления контактный остаток представляет собой остаток на LIF, который образует водородную связь с остатком на антителе к LIF. В определенных вариантах осуществления контактный остаток представляет собой остаток на LIF, который образует солевой мостик с остатком на антителе к LIF. В определенных вариантах осуществления контактный остаток представляет собой остаток на LIF, который взаимодействует посредством ван-дер-ваальсовых сил с остатком на антителе к LIF и находится на расстоянии в пределах по меньшей мере 5, 4 или 3 ангстрем от него. Терапевтическое антитело может связывать этот эпитоп, связывать меньшую часть этого эпитопа или перекрываться с этим эпитопом и может использоваться для анализа, описанного в данном документе.

В определенных вариантах осуществления терапевтическое антитело, описанное в данном документе, представляет собой выделенное антитело, которое связывает любые один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать, восемнадцать, девятнадцать или двадцать из следующих остатков: A13, I14, R15, H16, P17, C18, H19, N20, Q25, Q29, Q32, D120, R123, S127, N128, L130, C131, C134, S135 или H138 из SEQ ID NO: 40. В определенных вариантах осуществления в данном документе описано выделенное антитело, которое связывает все следующие остатки: A13, I14, R15, H16, P17, C18, H19, N20, Q25, Q29, Q32, D120, R123, S127, N128, L130, C131, C134, S135 или H138 из SEQ ID NO: 40. В определенных вариантах осуществления в данном документе описано выделенное антитело, которое связывает все следующие остатки: A13, I14, R15, H16, P17, C18, H19, N20, Q25, Q29, Q32, D120, R123, S127, N128, L130, C131, C134, S135 или H138 из SEQ ID NO: 40. В определенных вариантах осуществления антитело связывает только те остатки, которые участвуют в сильных или умеренных взаимодействиях с антителом. В определенных вариантах осуществления антитело связывает только те остатки, которые участвуют в сильных взаимодействиях с антителом. В определенном варианте осуществления антитело взаимодействует со спиральями А и С в LIF. В определенном варианте осуществления антитело блокирует взаимодействие LIF с gp130.

Показания к применению.

В определенных вариантах осуществления раскрытые в данном документе терапевтические антитела ингибируют передачу сигналов LIF в клетках. В определенных вариантах осуществления значение IC_{50} для биологического ингибирования антителом в условиях сывороточного голодания в клетках U-251 меньше или равно приблизительно 100, 75, 50, 40, 30, 20, 10, 5 или 1 нмоль/л. В определенных вариантах

осуществления значение IC_{50} для биологического ингибирования антителом в условиях сывороточного голодания в клетках U-251 меньше или равно приблизительно 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 или 100 нмоль/л.

В определенных вариантах осуществления в данном документе раскрыты антитела, применимые для лечения рака или опухоли. В определенных вариантах осуществления рак включает опухоли молочной железы, сердца, легкого, тонкой кишки, толстой кишки, селезенки, почки, мочевого пузыря, головы, шеи, яичника, предстательной железы, мозга, поджелудочной железы, кожи, кости, костного мозга, крови, тимуса, матки, яичка и печени. В определенных вариантах осуществления опухоли, которые можно лечить с помощью антител по настоящему изобретению, включают аденому, аденокарциному, ангиосаркому, астроцитому, эпителиальную карциному, герминому, глиобластому, глиому, гемангиоэндотелиому, гемангиосаркому, гематому, гепатобластому, лейкоз, лимфому, медуллобластому, меланому, нейробластому, остеосаркому, ретинобластому, рабдомиосаркому, саркому и/или тератому. В определенных вариантах осуществления опухоль/рак выбраны из группы, состоящей из акральная лентигинозной меланомы, актинического кератоза, аденокарциномы, аденоидно-кистозной карциномы, аденом, аденосаркомы, аденосквамозной карциномы, астроцитарных опухолей, карциномы бартолиновой железы, базальноклеточной карциномы, карциномы бронхиальной железы, капиллярного карциноида, карциномы, карциносаркомы, холангиокарциномы, хондросаркомы, цистаденомы, опухоли эндодермального синуса, гиперплазии эндометрия, саркомы стромы эндометрия, эндометриоидной аденокарциномы, эндиметриальной саркомы, саркомы Юинга, очаговой узловой гиперплазии, гастриномы, опухолей из клеток зародышевой линии, глиобластомы, глюкагономы, гемангиобластомы, гемангиоэндотелиомы, гемангиомы, аденомы печени, аденоматоза печени, гепатоцеллюлярной карциномы, инсулинита, интраэпителиального новообразования, интраэпителиального плоскоклеточного новообразования, инвазивной плоскоклеточной карциномы, крупноклеточной карциномы, липосаркомы, карциномы легкого, лимфобластного лейкоза, лимфоцитарного лейкоза, лейомиосаркомы, меланомы, злокачественной меланомы, злокачественной мезотелиальной опухоли, шванномы, медуллобластомы, медуллоэпителиомы, мезотелиомы, мукоэпидермоидной карциномы, миелоидного лейкоза нейробластомы, нейроэпителиальной аденокарциномы, узловой меланомы, остеосаркомы, карциномы яичника, папиллярной серозной аденокарциномы, опухолей гипофиза, плазматитомы, псевдосаркомы, карциномы предстательной железы, легочной бластомы, почечно-клеточной карциномы, ретинобластомы, рабдомиосаркомы, саркомы, серозной карциномы, плоскоклеточной карциномы, мелкоклеточной карциномы, карциномы мягких тканей, соматостатин-секретирующей опухоли, плоскоклеточной карциномы, недифференцированной карциномы, увеальной меланомы, веррукозной карциномы, карциномы влагалища/вульвы, опухоли, секретирующей вазоактивный интестинальный полипептид (ВИПомы), и опухоли Вильмса. В определенных вариантах осуществления опухоль/рак, подлежащие лечению с помощью одного или нескольких антител по настоящему изобретению, включают рак головного мозга, рак головы и шеи, колоректальную карциному, острый миелоидный лейкоз, пре-B-клеточный острый лимфобластный лейкоз, рак мочевого пузыря, астроцитому, предпочтительно астроцитому II, III или IV степени, глиобластому, мультиформную глиобластому, мелкоклеточный рак и немелкоклеточный рак, предпочтительно немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого, метастатическую меланому, андроген-независимый метастатический рак предстательной железы, андроген-зависимый метастатический рак предстательной железы, аденокарциному предстательной железы и рак молочной железы, предпочтительно протоковый рак молочной железы и/или карциному молочной железы. В определенных вариантах осуществления рак, подлежащий лечению с помощью антител по настоящему изобретению, включает глиобластому. В определенных вариантах осуществления рак, подлежащий лечению с помощью одного или нескольких антител по настоящему изобретению, включает рак поджелудочной железы. В определенных вариантах осуществления рак, подлежащий лечению с помощью одного или нескольких антител по настоящему изобретению, включает рак яичника. В определенных вариантах осуществления рак, подлежащий лечению с помощью одного или нескольких антител по настоящему изобретению, включает рак легкого. В определенных вариантах осуществления рак, подлежащий лечению с помощью одного или нескольких антител по настоящему изобретению, включает рак предстательной железы. В определенных вариантах осуществления рак, подлежащий лечению с помощью одного или нескольких антител по настоящему изобретению, включает рак толстой кишки. В определенных вариантах осуществления рак, подлежащий лечению, включает глиобластому, рак поджелудочной железы, рак яичника, рак толстой кишки, рак предстательной железы или рак легкого. В определенном варианте осуществления рак является рефрактерным к другому лечению. В определенном варианте осуществления рак, который лечат, является рецидивирующим. В определенном варианте осуществления рак представляет собой рецидивирующие/рефрактерные глиобластому, рак поджелудочной железы, рак яичника, рак толстой кишки, рак предстательной железы, рак урогенитального тракта, гинекологический рак, рак желудочно-кишечного тракта, рак эндокринной системы или рак легкого. В определенных вариантах осуществления рак включает распространенную солидную опухоль, глиобластому, рак желудка, рак кожи, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичка, рак щитовидной железы, колоректальный рак, рак желчного протока, рак шейки матки, рак эндометрия, рак головы и шеи, рак печени, рак почки, рак пищевода, рак яичника, рак

толстой кишки, рак легкого, лимфому или рак мягких тканей. В определенных вариантах осуществления рак включает немелкоклеточный рак легкого, эпителиальную карциному яичника или аденокарциному поджелудочной железы. В определенных вариантах осуществления рак включает распространенную солидную опухоль.

Терапевтические способы.

В определенных вариантах осуществления терапевтические антитела можно вводить любым путем, подходящим для введения фармацевтических композиций, содержащих антитела, таким как, например, подкожный, интраперитонеальный, внутривенный, внутримышечный, внутриопухолевый или интрацеребральный и т.д. В определенных вариантах осуществления антитела вводят внутривенно. В определенных вариантах осуществления антитела вводят согласно подходящей схеме введения, например, раз в неделю, два раза в неделю, раз в месяц, два раза в месяц и т.д. В определенных вариантах осуществления антитела вводят один раз в три недели. Антитела можно вводить в любом терапевтически эффективном количестве. В определенных вариантах осуществления терапевтически приемлемое количество составляет от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг. В определенных вариантах осуществления терапевтически приемлемое количество составляет от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 40 мг/кг. В определенных вариантах осуществления терапевтически приемлемое количество составляет от приблизительно 5 мг/кг до приблизительно 30 мг/кг. Терапевтическое антитело можно вводить в фиксированной дозе независимо от веса или массы индивидуума, которому вводят антитело h5D8. Антитело h5D8 можно вводить в фиксированной дозе независимо от веса или массы индивидуума, которому вводят терапевтическое антитело, при условии, что масса индивидуума составляет по меньшей мере приблизительно 37,5 кг. Фиксированная доза терапевтического антитела для введения может составлять от приблизительно 75 мг до приблизительно 2000 мг. Фиксированная доза терапевтического антитела для введения может составлять от приблизительно 225 мг до приблизительно 2000 мг, от приблизительно 750 мг до приблизительно 2000 мг, от приблизительно 1125 мг до приблизительно 2000 мг или от приблизительно 1500 мг до приблизительно 2000 мг. Фиксированная доза терапевтического антитела для введения может составлять приблизительно 75 мг. Фиксированная доза терапевтического антитела для введения может составлять приблизительно 225 мг. Фиксированная доза терапевтического антитела для введения может составлять приблизительно 750 мг. Фиксированная доза терапевтического антитела для введения может составлять приблизительно 1125 мг. Фиксированная доза терапевтического антитела для введения может составлять приблизительно 1500 мг. Фиксированная доза терапевтического антитела для введения может составлять приблизительно 2000 мг.

Предполагаются и другие дозировки терапевтического антитела. Фиксированная доза терапевтического антитела для введения может составлять приблизительно 50, 100, 150, 175, 200, 250, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, 775, 800, 825, 850, 875, 900, 925, 950, 975, 1000, 1025, 1050, 1075, 1100, 1150, 1175, 1200, 1225, 1250, 1275, 1300, 1325, 1350, 1375, 1400, 1425, 1450, 1475, 1525, 1550, 1575, 1600, 1625, 1650, 1675, 1700, 1725, 1750, 1775, 1800, 1825, 1850, 1875, 1900, 1925, 1950, 1975, 2025, 2050, 2075 или 2100 мг. Любую из этих доз можно вводить один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели или один раз в четыре недели.

Терапевтическое антитело можно вводить в дозе исходя из веса или массы тела индивидуума, которому вводят терапевтическое антитело. Скорректированная по весу тела доза терапевтического антитела для введения может составлять от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 25 мг/кг. Скорректированная по весу тела доза терапевтического антитела для введения может составлять от приблизительно 3 мг/кг до приблизительно 25 мг/кг, от приблизительно 10 мг/кг до приблизительно 25 мг/кг, от приблизительно 15 мг/кг до приблизительно 25 мг/кг или от приблизительно 20 мг/кг до приблизительно 25 мг/кг. Скорректированная по весу тела доза h5D8 для введения может составлять приблизительно 1 мг/кг. Скорректированная по весу тела доза терапевтического антитела для введения может составлять приблизительно 3 мг/кг. Скорректированная по весу тела доза терапевтического антитела для введения может составлять приблизительно 10 мг/кг. Скорректированная по весу тела доза терапевтического антитела для введения может составлять приблизительно 15 мг/кг. Скорректированная по весу тела доза терапевтического антитела для введения может составлять приблизительно 20 мг/кг. Скорректированная по весу тела доза терапевтического антитела для введения может составлять приблизительно 25 мг/кг.

Любую из доз, подробно описанных в данном документе, можно вводить в/в в течение периода времени, составляющего по меньшей мере приблизительно 60 мин; однако этот период может несколько варьироваться в зависимости от условий, относящихся к каждому отдельному введению.

Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, носители и разбавители.

В определенных вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению вводят в виде суспензии в стерильном растворе. В определенных вариантах осуществления раствор содержит физиологически приемлемую концентрацию соли (например, NaCl). В определенных вариантах осуществления раствор содержит от приблизительно 0,6 до 1,2% NaCl. В определенных вариантах осуществления раствор содержит от приблизительно 0,7 до 1,1% NaCl. В определенных вариантах осуществления раствор содержит от приблизительно 0,8 до 1,0% NaCl. В определенных вариантах осуществления высококонцентрированный исходный раствор антитела можно разбавить в приблизительно 0,9% NaCl. В опреде-

ленных вариантах осуществления раствор содержит приблизительно 0,9% NaCl. В определенных вариантах осуществления раствор дополнительно содержит один или несколько из следующих компонентов: буферы, например, ацетатный, цитратный, гистидиновый, сукцинатный, фосфатный, бикарбонатный и гидроксиметиламинометановый (Tris); поверхностно-активные вещества, например полисорбат 80 (Tween 80), полисорбат 20 (Tween 20), полисорбат и полоксамер 188; полиол/дисахарид/полисахариды, например, глюкозу, декстрозу, маннозу, маннит, сорбит, сахарозу, трегалозу и декстран 40; аминокислоты, например гистидин, глицин или аргинин; антиоксиданты, например аскорбиновую кислоту, метионин; и хелатирующие средства, например EGTA или EDTA. В определенных вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению транспортируют/хранят в лиофилизированном виде и восстанавливают перед введением. В определенных вариантах осуществления лиофилизированные составы на основе антител содержат объемобразующее средство, такое как маннит, сорбит, сахароза, трегалоза и декстран 40. В определенном варианте осуществления антитела к LIF по настоящему изобретению можно транспортировать и хранить в виде концентрированного исходного раствора, подлежащего разбавлению в месте использования для лечения. В определенных вариантах осуществления исходный раствор содержит приблизительно 25 мМ гистидина, приблизительно 6% сахарозы, приблизительно 0,01% полисорбата и приблизительно 20 мг/мл антитела к LIF. В определенных вариантах осуществления показатель pH раствора составляет приблизительно 6,0. В определенных вариантах осуществления состав, вводимый индивидууму, представляет собой водный раствор, содержащий приблизительно 25 мМ гистидина, приблизительно 6% сахарозы, приблизительно 0,01% полисорбата 80 и приблизительно 20 мг/мл антитела h5D8. В определенных вариантах осуществления показатель pH раствора составляет приблизительно 6,0.

Примеры

Следующие иллюстративные примеры представляют варианты осуществления композиций и способов, описанных в данном документе, и никоим образом не предназначены для ограничения.

Пример 1. Получение крысиных антител, специфических к LIF.

КДНК, кодирующую аминокислоты 23-202 человеческого LIF, клонировали в экспрессионные плазмиды (Aldevron GmbH, Фрайбург, Германия). Группы лабораторных крыс (Wistar) иммунизировали путем внутрикожного введения частиц золота, покрытых ДНК, с использованием ручного устройства для бомбардировки частицами ("генной пушки"). Экспрессию на клеточной поверхности временно трансфицированных клеток НЕК подтверждали с использованием антител к метке, распознающих метку, присоединенную к N-концу белка LIF. Образцы сыворотки крови собирали после серий иммунизаций и тестировали посредством проточной цитометрии на клетках НЕК, временно трансфицированных вышеупомянутыми экспрессионными плаزمидами. Антителопродуцирующие клетки выделяли и подвергали слиянию с клетками миеломы мыши (Ag8) в соответствии со стандартными процедурами. Гибридомы, продуцирующие антитела, специфические к LIF, идентифицировали путем скрининга с помощью проточной цитометрии, как это описано выше. Осадки положительных клеток гибридомы получали с использованием средства для стабилизации и защиты клеточной РНК (RNAlater, № по кат. AM7020, ThermoFisher Scientific) и дополнительно обрабатывали для секвенирования переменных доменов антител.

Пример 2. Получение мышинных антител, специфических к LIF.

КДНК, кодирующую аминокислоты 23-202 человеческого LIF, клонировали в экспрессионные плазмиды (Aldevron GmbH, Фрайбург, Германия). Группы лабораторных мышей (NMRI) иммунизировали путем внутрикожного введения частиц золота, покрытых ДНК, с использованием ручного устройства для бомбардировки частицами ("генной пушки"). Экспрессию на клеточной поверхности временно трансфицированных клеток НЕК подтверждали с использованием антител к метке, распознающих метку, присоединенную к N-концу белка LIF. Образцы сыворотки крови собирали после серий иммунизаций и тестировали посредством проточной цитометрии на клетках НЕК, временно трансфицированных вышеупомянутыми экспрессионными плазмидами. Антителопродуцирующие клетки выделяли и подвергали слиянию с клетками миеломы мыши (Ag8) в соответствии со стандартными процедурами. Гибридомы, продуцирующие антитела, специфические к LIF, идентифицировали путем скрининга с помощью проточной цитометрии, как это описано выше. Осадки положительных клеток гибридомы получали с использованием средства для стабилизации и защиты клеточной РНК (RNAlater, № по кат. AM7020, ThermoFisher Scientific) и дополнительно обрабатывали для секвенирования переменных доменов антител.

Пример 3. Гуманизация крысиных антител, специфических к LIF.

Один клон (5D8), полученный в результате иммунизации крыс, выбрали для последующей гуманизации. Гуманизацию проводили с использованием стандартных методов прививания CDR. Области тяжелой цепи и легкой цепи клонировали из гибридомы 5D8 с использованием стандартных методик молекулярного клонирования и секвенировали по методу Сэнгера. Затем проводили поиск BLAST переменных последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи человека, и 4 последовательности из каждой выбрали в качестве акцепторных каркасов для гуманизации. Эти акцепторные каркасы подвергали деиммунизации для удаления эпитопов Т-клеточного ответа. CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и легкой цепи 5D8 клонировали в 4 разных акцепторных каркаса тяжелой цепи (H1-H4) и в 4 разных акцепторных каркаса легкой цепи (L1-L4). Затем все 16 разных антител тестировали на: экспрессию в клетках CHO-S (Selexis); ингибирование LIF-индуцированного фосфорилирования STAT3; и аффинность связывания по-

средством поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Данные по экспериментам обобщены в табл. 1.

Таблица 1. Сводные данные по гуманизации 5D8

Комбинация тяжелой цепи и легкой цепи	Ингибирование LIF-индуцированного pSTAT3 согласно фиг. 1	Аффинность по SPR, K_{D1} (пМ)	Экспрессия (мкг/мл)
H0L0	+++	133±46	393
H1L1	-	н. п.	627
H1L2	+++	55±23	260
H1L3	+++	54±31	70
H1L4	-	н. п.	560
H2L1	-	н. п.	369
H2L2	+++	52±22	392
H2L3	++	136±19	185
H2L4	-	н. п.	78
H3L1	н. п.	н. п.	Экспрессия отсутствует
H3L2	н. п.	н. п.	Экспрессия отсутствует
H3L3	н. п.	н. п.	Экспрессия отсутствует
H3L4	н. п.	н. п.	Экспрессия отсутствует
H4L1	-	н. п.	259
H4L2	++	913±308	308
H4L3	+		252
H4L4	-	н. п.	186

н. п. - не проверяли; H0L0 - химерное антитело с полными переменными областями тяжелой и легкой цепей крысы.

Характеристики экспрессии трансфицированных клеток сравнивали в колбах Эрленмейера (посев 3×10^5 клеток/мл, объем культуры 200 мл) в ходе культивирования с подпиткой после 10 дней культивирования клеток. На данном этапе клетки собирали и секретируемое антитело очищали с использованием колонки с белком А, а затем определяли количественно. Наблюдали экспрессию всех гуманизированных антител за исключением тех, которые содержали тяжелую цепь H3. Переменные области H2 и L2 показали хорошие результаты по сравнению с другими переменными областями (SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 19).

Ингибирование LIF-индуцированного фосфорилирования STAT3 по тирозину 705 определяли посредством вестерн-блоттинга. Клетки глиомы U251 высевали в 6-луночные планшеты при плотности 100000 клеток/луночка. Клетки культивировали в полной среде в течение 24 ч перед любой обработкой, а после этого клетки подвергали сывороточному голоданию в течение 8 ч. После этого клетки инкубировали в течение ночи с указанными антителами в концентрации 10 мкг/мл. После обработки белки выделяли с использованием буфера для лизиса для анализа радиоиммунопреципитации (RIPA), содержащего ингибиторы фосфатаз и протеаз, количественно определяли (BCA-protein assay, Thermo Fisher Scientific) и использовали в вестерн-блоттинге. Для вестерн-блоттинга мембраны блокировали в течение 1 ч в 5% обезжиренном сухом молоке -TBST и инкубировали с первичным антителом в течение ночи (p-STAT3, № по каталогу 9145, Cell Signaling или STAT3, № по каталогу 9132, Cell Signaling) или 30 мин (β -актин-пероксидаза, № по каталогу A3854, Sigma-Aldrich). Затем мембраны промывали в TBST, инкубировали со вторичным антителом и снова промывали. Белки детектировали по хемилюминесценции (SuperSignal Substrate, № по каталогу 34076, Thermo Fisher Scientific). Данные результаты показаны на фиг. 1. Чем темнее полоса pSTAT3, тем меньше ингибирование. Ингибирование было высоким в дорожках, обозначенных 5D8 (негуманизированное крысиное антитело), А (H0L0), С (H1L2), D (H1L3) и G (H2L2); ингибирование было умеренным в H (H2L3), O (H4L2) и P (H4L3); ингибирование отсутствовало в В (H1L1), E (H1L4), F (H2L1), I (H2L4), N (H4L1) и Q (H4L4).

Затем антитела, которые показали ингибирование LIF-индуцированного фосфорилирования STAT3,

анализировали посредством SPR для определения аффинности связывания. Вкратце, связывание гуманизированных антител А (H0L0), С (H1L2), D (H1L3) и G (H2L2), H (H2L3) и O (H4L2) со связанным по аминокгруппе hLIF выявляли в анализе с использованием прибора Biacore™ 2002. Кинетические константы и показатели аффинности определяли путем математической аппроксимации сенсограмм (модель взаимодействия Ленгмюра [A+B=AB]) среди всех сенсограмм, полученных на всех поверхностях сенсорного чипа при шести концентрациях лиганда. Для расчета кинетических констант и показателей аффинности использовали кривые наилучшей аппроксимации (минимальное значение χ^2) для каждой концентрации. См. табл. 1.

Поскольку в экспериментальной модели в качестве аналитов использовали двухвалентные антитела, сенсограммы с наилучшей аппроксимацией также анализировали на основе модели аппроксимации двухвалентного аналита [A+B=AB; AB+B=AB₂], чтобы получить более подробное представление о механизме связывания мишени гуманизированными антителами. Анализ кинетических сенсограмм с использованием модели аппроксимации двухвалентного аналита [A+B=AB; AB+B=AB₂] подтвердил ранжирование образцов mAb по относительной аффинности.

Гуманизированное 5D8, содержащее H2 и L2, выбрали для более детального анализа из-за его высокой аффинности связывания и высокого выхода из перидической культуры.

Пример 4. Гуманизация клона 5D8 улучшает связывание с LIF.

Клон H2L2 (h5D8) выбрали для дальнейшего анализа и посредством SPR сравнивали связывание с исходным крысиным 5D8 (r5D8) и мышинным клоном 1B2. Антитело 1B2 представляет собой ранее описанное мышинное антитело к LIF, депонированное в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen GmbH (DSM ACC3054) и включенное в целях сравнения. Рекомбинантный человеческий LI, выделенный из клеток E.coli и HEK-293 соответственно, использовали в качестве лигандов. LIF от человека или из E.coli ковалентно связывали с поверхностью оптических сенсорных чипов Biacore с использованием химии иммобилизации по аминокгруппе, и показатели аффинности связывания рассчитывали на основе кинетических констант.

Материалы и способы.

Человеческий LIF из E.coli получили от Millipore, ссылка в каталоге LIF 1010; человеческий LIF из клеток HEK-293 получили от ACRO Biosystems, ссылка в каталоге LIF-H521b. LIF иммобилизовали на сенсорных чипах с использованием набора Biacore Amine Coupling Kit (BR-1000-50; GE-Healthcare, Уппсала, Швеция). Образцы анализировали на приборе Biacore™ 2002 с использованием оптических сенсорных чипов CM5 (BR-1000-12; GE-Healthcare, Уппсала, Швеция). Буфер Biacore HBS-EP использовали в ходе выполнения циклов (BR-1001-88; GE-Healthcare, Уппсала, Швеция). Кинетический анализ сенсограмм связывания проводили с использованием программы BIAevaluation 4.1. Кинетические константы и показатели аффинности определяли путем математической аппроксимации сенсограмм (модель взаимодействия Ленгмюра [A+B=AB]) среди всех сенсограмм, полученных на всех поверхностях сенсорного чипа при возрастающих концентрациях аналита. Сенсограммы также анализировали на основе модели аппроксимации сенсограммы двухвалентного аналита [A+B=AB; AB+B=AB₂], включая компонентный анализ, чтобы произвести оценку вклада двухвалентного аналита в определенные аффинности антитела к мишени по Ленгмюру (например, вклад в avidность). Для расчета кинетических констант и показателей аффинности использовали кривые наилучшей аппроксимации (минимальное значение χ^2) для каждой концентрации. Краткое изложение данных экспериментов аффинности показано в табл. 2 (человеческий LIF, полученный в E.coli) и табл. 3 (человеческий LIF, полученный в клетках HEK 293).

Таблица 2

Улучшенное связывание 5D8 после гуманизации	K _D [пМ]	
	hLIF (<i>E. coli</i>)	Аппроксимация сенсограммы по Ленгмюру 1:1
Мышиное антитело 1B2	400±210	1500±200
r5D8 (крысиное)	130±30	780±130
h5D8 (гуманизированное)	26±14	82±25

Таблица 3

Улучшенное связывание 5D8 после гуманизации	K _D [пМ]	
	hLIF (НЕК 293)	Аппроксимация сенсограммы по Ленгмюру 1:1
Мышиное антитело 1B2	320±150	3900±900
r5D8 (крысиное)	135±100	410±360
h5D8 (гуманизированное)	13±6	63±30

Модель аппроксимации сенсограммы Ленгмюра 1:1 из этой серии экспериментов показывает, что гуманизированное антитело 5D8 (h5D8) связывалось с LIF человека с аффинностью, которая в ~10-25 раз больше, чем аффинность у мышиного 1B2 мыши и r5D8.

Затем антитело h5D8 тестировали с LIF нескольких видов с использованием SPR. Кинетику связывания h5D8 по SPR проверяли для рекомбинантных аналитов LIF, полученных от разных видов и систем экспрессии: человеческого LIF (*E.coli*, клетки НЕК293); мышинный LIF (клетки *E.coli*, CHO); крысиный LIF (*E.coli*); LIF макака-крабоеда (дрожжи, клетки НЕК293).

Материалы и способы.

Антитело h5D8 иммобилизовывали на поверхности сенсорного чипа нековалентным Fc-специфическим захватом. Рекомбинантный Ig(Fc)-специфический белок A/G *S. aureus* использовали в качестве захватывающего средства, обеспечивающего стерически однородную и гибкую презентацию антитела к LIF анализам LIF. Источники аналитов LIF следующие: человеческий LIF человека (из *E.coli*; ссылка в каталоге Millipore LIF 1050); человеческий LIF (из клеток НЕК, ACRO Biosystems LIF-H521); мышинный LIF (*E.coli*; Millipore № по кат. NF-LIF2010); мышинный LIF (из клеток CHO; ReproKine № по каталогу RCP09056); LIF обезьяны (дрожжи Kingfisher Biotech № по каталогу RP1074Y); LIF обезьяны, продуцируемый в клетках НЕК-293. В целом h5D8 проявлял связывание с LIF нескольких видов. Краткое изложение данных по эксперименту аффинности показано в табл. 4.

Таблица 4

Широкая видовая реактивность гуманизированного 5D8	Аппроксимация сенсограммы по Ленгмюру 1:1		
	Среднее значение K _d (1/М с) [10 ⁵]	Среднее значение K _d (1/с) [10 ⁻⁵]	Среднее значение K _D [пМ]
Человеческий LIF (<i>E. coli</i>)	8,5 ± 0,7	7,2 ± 0,7	86 ± 9
Человеческий LIF (НЕК-293)	5,5 ± 0,02	3,1 ± 0,7	56 ± 13
Мышиный LIF (<i>E. coli</i>)	21,4 ± 3,7	5,7 ± 1,0	27 ± 6
Мышиный LIF (клетки CHO)	6,5 ± 0,7	1,1 ± 0,3	17 ± 4
LIF макака-крабоеда (дрожжи)	6,3 ± 0,8	5,4 ± 0,7	89 ± 10
LIF макака-крабоеда (НЕК-293)	2,4 ± 0,2	3,3 ± 0,3	134 ± 6

Пример 5. Гуманизированный клон 5D8 ингибирует LIF-индуцированное фосфорилирование STATS *in vitro*.

Чтобы определить биологическую активность h5D8, гуманизированные и исходные версии тестировали на модели клеточной культуры активации LIF. На фиг. 2А показано, что гуманизированный клон демонстрировал повышенное ингибирование фосфорилирования STAT3 (Тур 705), когда клеточную линию глиомы инкубировали с LIF человека. На фиг. 2В показан эксперимент с той же моделью, что и на фиг. 2А, повторенный с разными разведениями антитела h5D8.

Способы.

Клетки глиомы U251 высевали в 6-луночные планшеты при плотности 150000 клеток/луночка. Клетки культивировали в полной среде в течение 24 ч перед любой обработкой. После этого клетки обрабатывали в течение ночи путем инкубации с антителом r5D8 к LIF или антителом h5D8 к LIF в концентрации 10 мкг/мл или не обрабатывали (контрольные клетки).

После обработки белки выделяли с использованием буфера для лизиса для анализа радиоиммунопреципитации (RIPA), содержащего ингибиторы фосфатаз и протеаз, количественно определяли (BCA-protein assay, Thermo Fisher Scientific) и использовали в вестерн-блоттинге. Для вестерн-блоттинга мембраны блокировали в течение 1 ч в 5% обезжиренном молоке - TBST и инкубировали с первичным антителом в течение ночи (p-STAT3, № по каталогу 9145, Cell Signaling или STAT3, № по каталогу 9132, Cell Signaling) или 30 минут (β -актин-пероксидаза, № по каталогу A3854, Sigma-Aldrich). Затем мембраны промывали в TBST, при необходимости инкубировали со вторичным антителом и снова промывали. Белки детектировали по хемилюминесценции (SuperSignal Substrate, № по каталогу 34076, Thermo Fisher Scientific).

Пример 6. Значение IC_{50} при обработке антителом h5D8 на эндогенные уровни LIF в клетках U-251.

Также определили, что для биологического ингибирования h5D8 в условиях сывороточного голодания в клетках U-251 IC_{50} составляет всего 490 пикомоль/л (фиг. 3А). См. репрезентативные результаты на фиг. 3А и 3В и в табл. 5.

Таблица 5

Происхождение клеточной линии	Название клеточной линии	Обработка	IC_{50} (нМ)				IC_{90} (нМ)	Ингибирование JAK (%)
			n=1	n=2	Среднее значение	SD		
Условие эндогенного LIF							Среднее значение	Среднее значение
GBM	U251	h5D8	0,78	0,54	0,66	0,12	4,1	84%
		r5D8	1,6	1,5	1,4	0,15	8,5	86%
1,2	1,4							

Способы.

Клетки U-251 высевали из расчета 600000 клеток на 6-сантиметровую чашку (на одно условие). Клетки обрабатывали с использованием h5D8 в соответствующей концентрации (титре) в течение ночи при температуре 37°C в условиях сывороточного голодания (0,1% FBS). В качестве положительного контроля для pSTAT3 использовали рекомбинантный LIF (R&D №7734-LF/CF) для стимуляции клеток при 1,79 нМ в течение 10 мин при 37°C. В качестве отрицательного контроля для pSTAT3 использовали ингибитор JAK I (Calbiochem №420099) при 1 мкМ в течение 30 мин при 37°C. Затем клетки собирали на льду для получения лизатов в соответствии с протоколами наборов Meso Scale Discovery Multi-Spot Assay System Total STAT3 (№ по кат. K150SND-2) и Phospho-STAT3 (Tyr705) (№ по кат. K150SVD-2) для измерения уровней белка, определяемых с помощью MSD Meso Sector S600.

Пример 7. Дополнительные антитела, которые специфически связываются с человеческим LIF человека.

Идентифицировали другие клоны крысиного антитела (10G7 и 6B5), которые специфически связывают человеческий LIF, и краткое изложение их характеристик связывания приведено ниже в табл. 6, клон 1B2 служит для сравнения.

Способы.

Кинетический анализ связывания в режиме реального времени выполняли для mAb 1B2, 10G7 и 6B5 к LIF, иммобилизованных на поверхности оптических сенсорных чипов.

CM5, с применением рекомбинантных белков-мишеней LIF [человеческий LIF (E.coli); Millipore № по кат. LIF 1010 и человеческий LIF (клетки HEK293); ACRO Biosystems № по кат. LIF-H521b] в качестве аналитов.

Кинетические константы и показатели аффинности получали путем математической аппроксимации сенсограммы с использованием модели связывания Ленгмюра 1:1 с применением глобальных алгоритмов (одновременная аппроксимация наборов сенсограмм), а также алгоритмов аппроксимации одной кривой. Достоверность глобальных аппроксимаций оценивали с помощью анализа k_{obs} .

Таблица 6

Измерение аффинности дополнительных антител к LIF		Аппроксимация сенсограммы по Ленгмюру 1:1		
Аналит	Клон	Среднее значение (1/М с)	Среднее значение K_a (1/с)	Среднее значение K_D [нМ]
Человеческий LIF (<i>E. coli</i>)	1B2	$1,1 \pm 0,4E5$	$1,1 \pm 0,3E-3$	$9,7 \pm 1,4$
Человеческий LIF (НЕК-293)	1B2	$2,0 \pm 0,04E6$	$1,4 \pm 0,2E-3$	$0,7 \pm 0,03$
Человеческий LIF (<i>E. coli</i>)	10G7	$7,9 \pm 5,8E4$	$6,0 \pm 2,3E-4$	$12,6 \pm 9,5$
Человеческий LIF (НЕК-293)	10G7	$3,6 \pm 1,75E5$	$3,1 \pm 0,5E-4$	$1,1 \pm 0,6$
Человеческий LIF (<i>E. coli</i>)	6B5	н. п.	н. п.	н. п.
Человеческий LIF (НЕК-293)	6B5	$3,6 \pm 1,7E5$	$3,1 \pm 0,5E-4$	62 ± 6

Пример 8. Дополнительные антитела к LIF ингибируют LIF-индуцированное фосфорилирование STAT3 in vitro.

Дополнительные клоны тестировали на их способность ингибировать LIF-индуцированное фосфорилирование STAT3 в культуре клеток. Как показано на фиг. 4, клоны 10G7 и ранее подробно описанный r5D8 проявляли высокое ингибирование LIF-индуцированного фосфорилирования STAT3 по сравнению с клоном 1B2. Поликлональные антисыворотки к LIF (поз.) включили в качестве положительного контроля. Хотя 6B5 не показывал ингибирования, это можно объяснить возможным отсутствием связывания 6B5 с негликозилированным LIF, который использовали в данном эксперименте.

Способы.

Полученные от пациента клетки глиомы высевали в 6-луночные планшеты при плотности 150000 клеток/луночка. Клетки культивировали в среде GBM, которая состояла из среды Neurobasal (Life Technologies), дополненной B27 (Life Technologies), пенициллином/стрептомицином и факторами роста (20 нг/мл EGF и 20 нг/мл FGF-2 [PeproTech]) в течение 24 ч перед любой обработкой. На следующий день клетки обрабатывали с использованием рекомбинантного LIF, продуцируемого в *E. coli*, или с использованием смеси рекомбинантного LIF с указанными антителами в течение 15 мин (конечная концентрация 10 мкг/мл для антител и 20 нг/мл рекомбинантного LIF), или не обрабатывали. После обработки белки выделяли с использованием буфера для лизиса для анализа радиоиммунопреципитации (RIPA), содержащего ингибиторы фосфатаз и протеаз, количественно определяли (BCA-protein assay, Thermo Fisher Scientific) и использовали в вестерн-блоттинге. Для вестерн-блоттинга мембраны блокировали в течение 1 ч в 5% обезжиренном молоке - TBST и инкубировали с первичным антителом в течение ночи (p-STAT3, № по каталогу 9145, Cell Signaling) или 30 мин (β -актин-пероксидаза, № по каталогу A3854, Sigma-Aldrich). Затем мембраны промывали в TBST, при необходимости инкубировали со вторичным антителом и снова промывали. Белки детектировали по хемилюминесценции (SuperSignal Substrate, № по каталогу 34076, Thermo Fisher Scientific).

Пример 9. LIF высоко сверхэкспрессируется при нескольких типах опухолей.

Проводили иммуногистохимический анализ нескольких типах опухолей человека для определения степени экспрессии LIF. На фиг. 5 показано, что LIF характеризуется высоким уровнем экспрессии при мультиформной глиобластоме (GBM), немелкоклеточном раке легкого (NSCLC), раке яичника, колоректальном раке (CRC) и опухолях поджелудочной железы.

Пример 10. Гуманизированный клон h5D8 ингибирует рост опухоли в мышинной модели немелкоклеточной карциномы легкого.

Для определения способности гуманизированного клона 5D8 ингибировать LIF-положительный рак in vivo данное антитело тестировали в мышинной модели немелкоклеточной карциномы легкого (NSCLC). На фиг. 6 показано уменьшение роста опухоли у мышей, обработанных данным антителом, по сравнению с отрицательным контролем в виде среды-носителя.

Способы.

Клеточную линию немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) KLN205 с высокими уровнями LIF

инфицировали лентивирусом для стабильной экспрессии гена люциферазы светлячка с целью для мониторинга биolumинесценции *in vivo*. Для создания мышинной модели 5×10^5 клеток немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) KLN205 ортотопически имплантировали в левое легкое иммунокомпетентным сингенным мышам DBA/2 в возрасте 8 недель посредством межреберной пункции. Мышей обрабатывали контролем в виде среды-носителя или с использованием 15 или 30 мг/кг антитела h5D8 интраперитонеально два раза в неделю и рост опухоли контролировали посредством биolumинесценции. Для визуализации биolumинесценции мышам интраперитонеально вводили 0,2 мл 15 мг/мл D-люциферина под 1-2% ингаляционным наркозом изофлураном. Сигналы биolumинесценции контролировали с использованием системы IVIS серии 2000 (Xenogen Corp., Аламеда, Калифорния, США), состоящей из высокочувствительной охлаждаемой CCD-камеры. Программное обеспечение Living Image (Xenogen Corp.) использовали для сопоставления данных визуализации и интеграции общих сигналов биolumинесценции в каждой области, отмеченной рамкой. Данные анализировали с использованием общего потока фотонов (фотоны/секунда) в представляющих интерес областях (ROI). Результаты демонстрируют, что лечение с использованием антитела h5D8 способствует регрессии опухоли. Данные представлены в виде среднего значения \pm SEM.

Пример 11. h5D8 ингибирует рост опухоли в мышинной модели мультиформной глиобластомы.

В ортотопической модели опухоли GBM с использованием линии клеток U251 человека, экспрессирующих люциферазу, r5D8 значительно уменьшал объемы опухоли у мышей, которым вводили 300 мкг r5D8 и h5D8 путем интраперитонеальной инъекции два раза в неделю. Результаты данного исследования показаны на фиг. 7А (количественное определение на 26 день после обработки). Данный эксперимент также проводили с использованием мышей, которых обрабатывали с использованием 200 мкг или 300 мкг гуманизированного h5D8, и результаты показали статистически значимое уменьшение опухоли через 7 дней обработки.

Способы.

Клетки U251, стабильно экспрессирующие люциферазу, собирали, промывали в PBS, центрифугировали при 400g в течение 5 мин, ресуспендировали в PBS и подсчитывали с использованием автоматического цитометра (Countess, Invitrogen). Клетки хранили на льду для поддержания оптимальной жизнеспособности. Мышей анестезировали путем интраперитонеального введения кетамина (Ketolar50®)/ксилацина (Rompun®) (75 и 10 мг/кг соответственно). Каждую мышь осторожно помещали в стереотаксическое устройство и иммобилизовывали. Волосы с головы удаляли кремом для депиляции, а кожу головы рассекали скальпелем, чтобы обнажить череп. С помощью сверла осторожно сделали небольшой разрез в координатах 1,8 мм латеральнее и 1 мм впереди от места соединения ламбдовидного и стреловидного швов. 5 мкл клеток инокулировали с использованием шприца Hamilton 30G в правое полосатое тело на глубине 2,5 мм. Разрез на голове закрывали тканевым клеем Hystoacryl (Braun) и мышам вводили подкожный анальгетик мелоксикам (Metacam®) (1 мг/кг). Конечное количество клеток, имплантированных каждой мышью, составляло 3×10^5 .

Мышей обрабатывали два раза в неделю посредством интраперитонеального введения h5D8. Обработку начинали в день 0 сразу после инокуляции опухолевых клеток. Мыши получили в общей сложности 2 дозы h5D8 или контроля в виде среды-носителя.

Вес тела и объем опухоли. Вес тела измеряли 2 раза в неделю, а рост опухоли количественно определяли по биolumинесценции в день 7 (Xenogen IVIS Spectrum). Для количественной оценки активности биolumинесценции *in vivo* мышей вводили в наркоз изофлураном и интраперитонеально вводили субстрат, представляющий собой люциферин (PerkinElmer) (167 мкг/кг).

Размер опухоли, определяемый по биolumинесценции (Xenogen IVIS Spectrum), оценивали в день 7. Рассчитывали отдельные показатели по опухолям и среднее значение \pm SEM для каждой группы обработки. Статистическую значимость определяли с использованием непарного непараметрического U-критерия Манна-Уитни.

Пример 12. h5D8 ингибирует рост опухоли в мышинной модели рака яичника.

Эффективность r5D8 оценивали в двух других сингенных моделях опухоли. В ортотопической модели опухоли яичника ID8 антитело r5D8 при интраперитонеальном введении 300 мкг два раза в неделю значительно подавляло рост опухоли, что измеряли по объему брюшной полости (фиг. 8А и 8В). Результаты на фиг. 8С показывают, что антитело h5D8 также уменьшало объем опухоли в дозе 200 мкг и выше.

Способы.

Клетки ID8 культивировали в модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM) (Gibco, Invitrogen), дополненной 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) (Gibco, Invitrogen), 40 ед/мл пеницилина и 40 мкг/мл стрептомицина (PenStrep) (Gibco, Invitrogen) и 0,25 мкг/мл плазмодина (Invivogen).

Клетки ID8 собирали, промывали в PBS, центрифугировали при 400g в течение 5 мин и ресуспендировали в PBS. Клетки хранили на льду для поддержания оптимальной жизнеспособности, и 200 мкл клеточной суспензии вводили интраперитонеально с помощью иглы 27G. Конечное количество клеток, имплантированных мышам, составляло 5×10^6 .

Мышей обрабатывали два раза в неделю посредством и/п введения h5D8 в разных дозах, как указа-

но. Вес тела измеряли 2 раза в неделю, а прогрессирование опухоли контролировали путем измерения обхвата живота с использованием штангенциркуля (Fisher Scientific).

Пример 13. r5D8 ингибирует рост опухоли в мышинной модели колоректального рака.

У мышей с подкожными опухолями толстой кишки CT26 антитело r5D8 (вводимое 300 мкг интраперитонеально два раза в неделю) значительно подавляло рост опухоли (фиг. 9А и 9В).

Способы.

Клетки CT26 культивировали в среде Мемориального института Розуэлла Парка (RPMI [Gibco, Invitrogen]), дополненной 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), 40 ед/мл пенициллина и 40 мкг/мл стрептомицина (PenStrep) и 0,25 мкг/мл плазмоцина.

Клетки CT26 (8×10^5) трипсинизировали, промывали PBS, центрифугировали при 400g в течение 5 мин и ресуспендировали в 100 мкл PBS. Клетки хранили на льду для избежания гибели клеток. Клетки CT26 вводили мышам путем подкожной инъекции с использованием иглы 27G.

300 мкг r5D8 или контроль в виде среды-носителя вводили мышам посредством интраперитонеальной инъекции два раза в неделю, начиная с дня 3 после имплантации клеток CT26.

Вес тела и объем опухолей измеряли три раза в неделю. Объем опухоли измеряли штангенциркулем (Fisher Scientific).

Пример 14. r5D8 уменьшает воспалительную инфильтрацию в моделях опухолей.

В ортотопической модели GBM U251 экспрессия CCL22, маркера M2-поляризованных макрофагов, была значительно снижена в опухолях, обработанных r5D8, что показано на фиг. 10А. Данный результат также подтвердили на физиологически релевантной модели органотипической культуры срезов ткани с применением r5D8, в которой три образца, полученные от пациентов, продемонстрировали значительное снижение экспрессии CCL22 и CD206 (MRC1) (также маркера макрофагов M2) после обработки, что показано на фиг. 10В (сравните MRC1 и CCL22 в верхнем ряду, контроле, и в нижнем, с обработкой). Кроме того, r5D8 также уменьшает количество CCL22⁺ макрофагов M2 в сингенных опухолях ID8 (фиг. 10С) и CT26 (фиг. 10D) у иммунокомпетентных мышей.

Пример 15. r5D8 увеличивает количество немиелоидных эффекторных клеток.

Чтобы исследовать дополнительные иммунные механизмы, оценивали влияние r5D8 на Т-клетки и другие немиелоидные эффекторные иммунные клетки в микроокружении опухоли. В сингенной модели ортотопической опухоли ID8 яичника обработка с использованием r5D8 приводила к увеличению количества внутриопухолевых NK-клеток и увеличению общего количества и количества активированных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, что показано на фиг. 11А. Аналогично в сингенной модели опухоли CT26 толстой кишки антитело r5D8 увеличивало количество внутриопухолевых NK-клеток, увеличивало количество CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток и имело тенденцию к снижению количества CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Т-регуляторных клеток, что показано на фиг. 11В. Тенденцию к уменьшению количества CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Т-регуляторных клеток также наблюдали в сингенной модели ортотопической опухоли KLN205 после обработки с использованием r5D8, что показано на фиг. 11С. В соответствии с требованием наличия Т-клеток для опосредования эффективности истощение CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток в модели CT26 ингибировало противоопухолевую эффективность r5D8, что показано на фиг. 12.

Способы истощения Т-клеток.

Клетки CT26 культивировали в культуральной среде RPMI (Gibco, Invitrogen), дополненной 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS [Gibco, Invitrogen]), 40 ед/мл пенициллина и 40 мкг/мл стрептомицина (PenStrep [Gibco, Invitrogen]) и 0,25 мкг/мл плазмоцина (Invivogen). Клетки CT26 (5×10^5) собирали, промывали PBS, центрифугировали при 400g в течение 5 мин и ресуспендировали в 100 мкл PBS. Клетки хранили на льду для избежания гибели клеток. Клетки CT26 вводили мышам в оба бока путем подкожной инъекции с использованием шприца 27G. Мышей обрабатывали два раза в неделю посредством интраперитонеального введения r5D8, как указано в дизайне исследования. Контроль в виде среды-носителя (PBS), крысиное r5D8 и/или антитело к CD4 и антитело к CD8 вводили мышам посредством интраперитонеальной инъекции (IP) два раза в неделю, как указано в дизайне исследования. Все виды обработок антителами использовали одновременно.

Пример 16. Кристаллическая структура h5D8 в комплексе с человеческим LIF.

Кристаллическую структуру h5D8 расшифровали с разрешением 3,1 ангстрем, чтобы определить эпитоп на LIF, с которым связывалось h5D8, и определить остатки h5D8, которые участвуют в связывании. Структура сокристалла показала, что N-концевая петля LIF расположена в центре между переменными областями легкой и тяжелой цепей h5D8 (фиг. 13А). Кроме того, h5D8 взаимодействует с остатками спирали А и С LIF, образуя прерывистый конформационный эпитоп. Связывание обусловлено несколькими солевыми мостиками, Н-связями и ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями (табл. 7, фиг. 13В). Эпитоп h5D8 на LIF охватывает область взаимодействия с gp130. См. Boulanger, M.J., Bankovich, A.J., Kortemme, T., Baker, D. & Garcia, K.C. Convergent mechanisms for recognition of divergent cytokines by the shared signaling receptor gp130. *Molecular cell* 12, 577-589 (2003). Результаты обобщены ниже в табл. 7 и изображены на фиг. 13.

Таблица 7

Краткие сведения о рентгеновской кристаллической структуре h5D8 в комплексе с человеческим LIF		
Остаток LIF (эпитоп)	Тип взаимодействия	Остаток h5D8 (парагоп, нумерация согласно Кабату)
Ala13	VDW	L-Tyr49, L-Asn53
Ile14-O	HB	L-Ser50-OG
Ile	VDW	L-His30, L-Tyr32, L-Tyr49, L-Ser50
		H-Trp97
Arg15-NE	SB	L-Glu55-OE1, L-Glu55-OE2
Arg15-NH1	SB	L-Glu55-OE1, L-Glu55-OE2
Arg15-NH2	SB	L-Glu55-OE1, L-Glu55-OE2
Arg15-O	HB	L-Asn34-ND2
Arg15	VDW	L-Asn34, L-Leu46, L-Tyr49, L-Glu55, L-Ser56
		H-Glu96, H-Trp97, H-Asp98, H-Leu99, H-Asp101
His16-NE2	SB	H-Asp101-OD2
His16	VDW	L-Tyr32, L-Asn34, L-Met89
		H-Trp95, H-Glu96, H-Trp97, H-Asp101
Pro17	VDW	L-Tyr32, L-Ala91
		H-Trp97
Cys18	VDW	L-Tyr32
		H-Trp33, H-Trp97
His19-NE2	SB	H-Glu96-OE1, H-Glu96-OE2
His19	VDW	H-His31, H-Trp33, H-Glu96
Asn20-OD1	HB	H-Lys52-NZ
Asn20-ND2	HB	H-Asp53-OD1
Asn20	VDW	H-Trp33, H-Lys52, H-Asp53
Gln25-NE2	HB	H-Asp53-OD2
Gln25	VDW	H-His31, H-Ser52C, H-Asp53
Gln29	VDW	H-His31
Gln32	VDW	H-Lys52B
Asp120-OD2	HB	H-Ser30-OG
Asp120	VDW	H-Thr28, H-Ser30
Arg123-NE	HB	H-Thr28-OG
Arg123	VDW	H-Thr28
Gly124	VDW	H-His31
Leu125	VDW	H-His31
Ser127-OG	HB	H-Asp98-OD2
Ser127-O	HB	H-Trp97-NE1
Ser127	VDW	H-His31, H-Trp97, H-Asp98
Asn128-OD1	HB	H-His31-NE2
Asn128	VDW	H-His31
Leu130	VDW	H-Trp97
Cys131	VDW	H-Trp97
Cys134	VDW	H-Trp97
Ser135-O	HB	L-His30-NE2
Ser135	VDW	L-His30
His138	VDW	L-His30

VDW, ван-дер-ваальсовы силы, низкоэнергетическая связь; HB, водородная связь (средняя энергетическая связь); SB, солевой мостик (высокоэнергетическая связь).

Способы.

LIF временно экспрессировали в клетках HEK 293S (Gnt I⁻), и его очищали с использованием аффинной хроматографии Ni-NTA с последующей гель-фильтрационной хроматографией в 20 mM трис, pH 8,0 и 150 mM NaCl. Рекombинантный Fab h5D8 временно экспрессировали в клетках HEK 293F, и его очищали с использованием аффинной хроматографии KappaSelect с последующей катионообменной хроматографией. Очищенные Fab h5D8 и LIF смешивали при молярном соотношении 1:2,5 и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин перед дегликозилированием с использованием EndoH. Затем для очистки комплекса использовали гель-фильтрационную хроматографию. Комплекс концентрировали до 20 мг/мл и подготавливали для испытаний по кристаллизации с использованием скрининговых тестов с разреженными матрицами. Кристаллы образовались при 4°C в условиях, предусматривающих 19% (об./об.) изопропанола, 19% (вес./об.) PEG 4000, 5% (об./об.) глицерина, 0,095M цитрата натрия, pH 5,6. Кристалл дифрагировал с разрешением 3,1 Å на канале излучения 08ID-1 синхротрона Canadian Light Source (CLS). Данные собирали, обрабатывали и масштабировали с помощью XDS согласно Kabsch et al. Xds. Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography 66, 125-132 (2010). Структуры определяли посредством молекулярного замещения с применением Phaser согласно McCoy et al. Phaser crystallographic software. J Appl Crystallogr 40, 658-674 (2007). Выполнили несколько итераций построения и уточнения модели с использованием Coot и phenix.refine до тех пор, пока структуры не приблизились к приемлемым R_{work} и R_{free}. См. Emsley et al. Features and development of Coot. Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography 66, 486-501 (2010) и Adams et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography 66, 213-221 (2010) соответственно. Фигуры строили в PyMOL (система молекулярной графики PyMOL, версия 2.0, Schrodinger, LLC).

Пример 17. h5D8 характеризуется высокой специфичностью к LIF.

Целью было протестировать связывание h5D8 с другими представителями семейства LIF для определения специфичности связывания. При использовании анализа Octet96 связывание h5D8 с человеческим LIF примерно в 100 раз больше, чем связывание с LIF, представителем семейства IL-6 с наивысшей гомологией, онкостатином (OSM), когда оба белка продуцируются в E.coli. Если оба белка продуцируются в системе млекопитающего, h5D8 не проявляет связывание с OSM. Данные обобщены в табл. 8.

Таблица 8

Сводные данные по показателям аффинности h5D8 к цитокинам, определенным с использованием анализа Octet			
	KD [M]	kon [1/M c]	kdis [1/c]
h5D8 + huLIF (E. coli)	4,3E-10 +/- 2,0E-11	3,1E+05 +/- 3,1E+03	1,3E-04 +/- 5,8E-06
h5D8 + huLIF (из системы млекопитающего)	1,3E-09 +/- 7,2E-11	1,2E+05 +/- 1,3E+03	1,5E-04 +/- 8,5E-06
h5D8 + huOSM (E. coli)	3,6E-08 +/- 1,4E-09	8,5E+04 +/- 3,1E+03	3,1E-03 +/- 4,1E-05
h5D8 + huOSM (из системы млекопитающего)	C. o.	C. o.	C. o.
h5D8 + huIL-6 (E. coli)	C. o.	C. o.	C. o.

C. o. - связывание отсутствует.

Способы.

Эксперименты по связыванию с использованием Octet: реагенты использовали и готовили в соответствии с инструкциями производителя. Эксперимент по определению базовых кинетических параметров проводили с использованием программного обеспечения Octet Data Acquisition версии 9.0.0.26 следующим образом: Настройка сенсоров/программы: i) уравнивание (60 с); ii) загрузка (15 с); iii) исходный уровень (60 с); iv) связывание (180 с) и v) диссоциация (600 с).

Аффинность h5D8 к цитокинам согласно Octet: эксперимент по определению базовых кинетических параметров проводили с использованием программного обеспечения Octet Data Acquisition версии 9.0.0.26 следующим образом: биосенсоры Amine Reactive 2ndGeneration Biosensors (AR2G) гидратировали в воде в течение не менее 15 мин. Конъюгацию по аминокислотной группе h5D8 с биосенсорами проводили в соответствии с техническим примечанием ForteBio Technical Note 26 (см. ссылки) с использованием набора Amine Coupling Second Generation Kit. Стадии погружения выполняли при 30°C, 1000 об/мин следующим образом: i) 60 с уравнивания в воде; ii) 300 с активации в 20 mM ECD, 10 mM сульфо-NHS в воде; iii) 600 с иммобилизации 10 мкг/мл h5D8 в 10 mM ацетате натрия, pH 6,0; iv) 300 с гашения в 1M

этаноламине, pH 8,5; v) 120 с на исходном уровне в воде. Затем проводили эксперименты по определению кинетических параметров со следующими стадиями погружения и считывания при 30°C, 1000 об/мин: vi) 60 с на исходном уровне в 1X кинетическом буфере; vii) 180 с связывания соответствующих серийных разведений цитокина в 1X кинетическом буфере; viii) 300 с диссоциации в 1X кинетическом буфере; ix) три цикла регенерации/нейтрализации с чередованием 10 мМ глицина, pH 2,0 и 1X кинетического буфера соответственно (5 с в каждом для 3 циклов). После регенерации биосенсоры повторно использовали для последующих анализов связывания.

Рекомбинантный человеческий LIF, продуцируемый в клетках млекопитающих, получили от ACROBiosystems (LIF-H521b); рекомбинантный человеческий OSM, продуцируемый в клетках млекопитающих, получили от R & D (8475-OM/CF); и рекомбинантный человеческий OSM, продуцируемый в клетках *E. coli*, получили от R & D (295-OM-050/CF).

Пример 18. Кристаллическая структура fab h5D8.

Определили пять кристаллических структур Fab h5D8 в широком спектре химических условий. Высокие разрешения данных структур указывают на то, что конформации остатков CDR связаны с незначительной гибкостью и очень похожи в различных химических средах. Уникальной особенностью данного антитела является присутствие неканонического цистеина в положении 100 варибельной области тяжелой цепи. Структурный анализ показывает, что цистеин является непарным и в значительной степени недоступен для растворителя.

Fab H5D8 получали посредством расщепления его IgG папаином с последующей очисткой с использованием стандартных методик аффинной, ионообменной и эксклюзионной хроматографии. Кристаллы получали с использованием методов диффузии из паровой фазы, и они позволили определить пять кристаллических структур с разрешением от 1,65 до 2,0 Å. Все структуры расшифровали и отнесли к одной и той же кристаллографической пространственной группе и с аналогичными размерами элементарной ячейки (P212121, a~53,8 Å, b~66,5 Å, c~143,3 Å) несмотря на условия кристаллизации в диапазоне пяти различных уровней pH: 5,6, 6,0, 6,5, 7,5 и 8,5. Таким образом, эти кристаллические структуры позволяют сравнивать трехмерное расположение Fab h5D8 без препятствий из-за артефактов упаковки кристаллов и в широком спектре химических условий.

Электронную плотность выявляли для всех остатков определяющей комплементарности области (CDR), которые впоследствии моделировали. Следует отметить, что LCDR1 и HCDR2 приняли удлиненные конформации, которые вместе с неглубокими областями LCDR3 и HCDR3 образовывали полость связывания в центре паратопа (фиг. 14A). Эти пять структур были очень похожи по всем остаткам, со среднеквадратичным отклонением всех атомов в диапазоне от 0,197 до 0,327 Å (фиг. 14A). Эти результаты указывают на то, что конформации остатков CDR поддерживаются в различных химических средах, включающих уровни pH от 5,6 до 8,5 и ионную силу от 150 мМ до 1М. Анализ электростатической поверхности паратопа h5D8 показал, что положительно и отрицательно заряженные области в равной степени способствовали гидрофильным свойствам без преобладающих гидрофобных участков. h5D8 имеет необычную особенность в виде неканонического цистеина в основании HCDR3 (Cys100). Во всех пяти структурах этот свободный цистеин упорядочен и не вызывает перестановку дисульфидных связей. Кроме того, он не модифицируется добавлением Cys (цистеинилированием) или глутатиона (глутатиолированием) и взаимодействует за счет ван-дер-ваальсовых сил (расстояния 3,5-4,3 Å) с атомами основной и боковой цепей Leu4, Phe27, Trp33, Met34, Glu102 и Leu105 тяжелой цепи (фиг. 14B). И наконец, Cys100 представляет собой преимущественно скрытый структурный остаток, который, по-видимому, участвует в обеспечении конформации CDR1 и HCDR3. Таким образом, маловероятно, что он будет характеризоваться реактивностью по отношению к другим цистеинам, как это наблюдается по гомогенному расположению этой области в пяти кристаллических структурах.

Способы.

H5D8-1 IgG получили от Catalent Biologics и составили в 25 мМ гистидина, 6% сахарозы, 0,01% полисорбата 80 при pH 6,0. Производили активную замену буфера составленного IgG на буфер PBS с использованием концентратора MWCO 10K (Millipore) перед расщеплением с использованием 1:100 мкг папаина (Sigma) в течение 1 часа при 37°C в PBS, 1,25 мМ EDTA, 10 мМ цистеина. Расщепленный папаином IgG пропускали через колонку с белком А (GE Healthcare) с использованием хроматографической системы AKTA Start (GE Healthcare). Элюат из колонки с белком А, который содержал Fab h5D8, извлекали и осуществляли замену буфера на 20 мМ ацетат натрия, pH 5,6, используя концентратор MWCO 10K (Millipore). Полученный образец загружали в катионообменную колонку Mono S (GE Healthcare) с использованием хроматографической системы AKTA Pure (GE Healthcare). Элюирование градиентом 1М хлорида калия привело к преобладающему пику Fab h5D8, который извлекли, концентрировали и очищали до однородности по размеру с использованием колонки для гель-фильтрации Superdex 200 Increase (GE Healthcare) в 20 мМ трис-HCl, 150 мМ хлориде натрия при pH 8,0. Высокую чистоту Fab h5D8 подтвердили с помощью SDS-PAGE в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях.

Очищенный Fab h5D8 концентрировали до 25 мг/мл, используя концентратор 10K MWCO (Milli-

pore). Дозатор Орух 4 (Douglas Instruments) использовали для модели экспериментов по кристаллизации с диффузией в паровой фазе с коммерческими скрининговыми тестами с разреженными матрицами с 96 условиями JCSG TOP96 (реагенты Rigaku) и MCSG-1 (Anatrace) при температуре 20°C. Кристаллы получали и собирали через четыре дня в следующих пяти условиях кристаллизации: 1) 0,085М цитрата натрия, 25,5% (вес./об.) PEG 4000, 0,17М ацетата аммония, 15% (об./об.) глицерина, pH 5,6; 2) 0,1М MES, 20% (вес./об.) PEG 6000, 1М хлорида лития, pH 6,0; 3) 0,1М MES, 20% (вес./об.) PEG 4000, 0,6М хлорида натрия, pH 6,5; 4) 0,085М HEPES натрия, 17% (вес./об.) PEG 4000, 8,5% (об./об.) 2-пропанола, 15% (об./об.) глицерина, pH 7,5; и 5) 0,08 Мтрис, 24% (вес./об.) PEG 4000, 0,16М хлорида магния, 20% (об./об.) глицерина, pH 8,5. Перед мгновенным замораживанием в жидком азоте к маточным растворам, содержащим кристаллы, добавляли 5-15% (об./об.) глицерина или 10% (об./об.) этиленгликоля при необходимости. Кристаллы подвергались рентгеновскому синхротронному излучению на канале 23-ID-D синхротрона Advanced Photon Source (Чикаго, Иллинойс, США) и дифрактограммы регистрировали на детекторе Pilatus3 6М. Данные обрабатывали с использованием XDS, а структуры определяли путем молекулярного замещения с использованием Phaser. Уточнение проводили в PHENIX с итеративным построением модели в Coot. Фигуры строили в PyMOL. Все программное обеспечение было доступно в SGrid.

Пример 19. Мутации цистеина 100 в h5D8 сохраняют связывание.

Анализ h5D8 выявил свободный остаток цистеина в положении 100 (C100) в вариабельной области тяжелой цепи. Варианты H5D8 получали путем замены C100 каждой природной аминокислотой для определения характеристик связывания с и аффинности к человеческим и мышинным LIF. Связывание характеризовали посредством ELISA и анализа Octet. Результаты обобщены в табл. 9. Кривые EC50 для ELISA показаны на фиг. 15 (фиг. 15А, человеческий LIF, и фиг. 15В, мышинный LIF).

Таблица 9

Сводные данные по показателям аффинности, определенным посредством анализа Octet, и показателям EC50, определенным посредством ELISA				
Мутация	Аффинность/ k_D (М)		EC50 связывания (нМ)	
	Человеческий LIF	Мышинный LIF	Человеческий LIF	Мышинный LIF
C100	<1,0E-12 ± 2,252E-11	9,946E-11 ± 8,272E-12	0,09878	0,1605
C100S	8,311E-10 ± 5,886E-11	2,793E-09 ± 5,925E-11	н.д.	н.д.
C100Q	3,87E-09 ± 1,55E-10	2,84E-09 ± 4,85E-11	10,18	26,33
C100N	5,59E-09 ± 1,01E-10	6,68E-09 ± 9,8E-11	13,18	45,87
C100E	2,67E-09 ± 4,64E-11	4,1E-09 ± 7,56E-11	7,179	25,3
C100D	2,02E-09 ± 8,08E-11	6,49E-09 ± 7,16E-11	11,89	22,88
C100T	4,36E-10 ± 2,1E-11	1,02E-09 ± 1,77E-11	5,575	8,753
C100G	2,49E-09 ± 4,2E-11	3,33E-09 ± 5,42E-11	21,94	40,17
C100P	2,74E-10 ± 2,97E-10	<1,0E-12 ± 7,64E-10	34,44	101,9
C100A	<1,0E-12 ± 2,713E-11	<1,0E-12 ± 1,512E-11	0,6705	0,9532
C100V	<1,0E-12 ± 1,805E-11	<1,0E-12 ± 8,086E-12	0,2785	0,3647
C100L	<1,0E-12 ± 1,963E-11	1,998E-10 ± 1,055E-11	0,454	0,547
C100I	<1,0E-12 ± 1,424E-11	3,361E-11 ± 7,545E-12	0,299	0,3916
C100M	1,155E-09 ± 3,400E-11	2,676E-09 ± 2,449E-11	0,7852	1,563
C100F	4,376E-09 ± 1,127E-10	1,147E-08 ± 9,099E-11	8,932	21,53
C100Y	1,444E-08 ± 1,159E-09	2,514E-08 ± 2,047E-09	н.д.	н.д.
C100W	2,508E-08 ± 7,036E-09	4,819E-08 ± 4,388E-09	н.д.	н.д.
C100H	1,304E-10 ± 1,416E-10	4,284E-09 ± 1,231E-10	8,254	н.д.
C100K	7,477E-08 ± 1,581E-09	6,053E-08 ± 2,589E-09	н.д.	н.д.
C100R	1,455E-07 ± 6,964E-09	5,142E-08 ± 3,247E-09	н.д.	н.д.

Способы.

ELISA: связывание вариантов C100 h5D8 с человеческим и мышинным LIF определяли посредством ELISA. Рекомбинантный человеческий или мышинный белок LIF вносили в 384-луночные планшеты Maxisorp в концентрации 1 мкг/мл и оставляли на ночь при 4°C. Планшеты блокировали с использованием 1х блокирующего буфера в течение 2 ч при комнатной температуре. Добавляли титры каждого варианта h5D8 C100 и давали возможность связаться в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты

трижды промывали с использованием PBS+0,05% Tween-20. Добавляли конъюгированные с HRP анти-тела к IgG человека и давали возможность связываться в течение 30 мин при комнатной температуре. Планшеты трижды промывали с использованием PBS+0,05% Tween-20 и проявляли с использованием 1x субстрата TMB. Реакцию останавливали с помощью 1M HCl и измеряли оптическую плотность при 450 нм. Построение фигур и нелинейный регрессионный анализ выполняли с помощью Graphpad Prism.

Octet RED96: аффинность вариантов C100 h5D8 к человеческому и мышинному LIF определяли по BLI с использованием системы Octet RED96. Варианты C100 h5D8 загружали на биосенсоры к Fc человека в концентрации 7,5 мкг/мл после 30-секундного выдерживания на исходном уровне в 1x кинетическом буфере. Титры человеческого или мышинного белка LIF связывали с загруженными биосенсорами в течение 90 секунд и давали им возможность диссоциировать в 1x кинетическом буфере в течение 300 секунд. KD рассчитывали с помощью программного обеспечения для анализа данных с использованием глобальной модели аппроксимации 1:1.

Пример 20. h5D8 блокирует связывание LIF с gp130 in vitro.

Чтобы определить, предотвращает ли h5D8 связывание LIF с LIFR, провели анализ молекулярного связывания с использованием платформы Octet RED 96. H5D8 загружали на биосенсоры АНС путем захвата антителом к Fc человека. Затем биосенсоры погружали в LIF и, как и предполагали, наблюдали связывание (фиг. 16А, средняя треть). Впоследствии биосенсоры погружали в различные концентрации LIFR. Наблюдали дозозависимое связывание (фиг. 16А, правая треть). Контрольный эксперимент продемонстрировал, что данное связывание было LIF-специфичным (не показано) и не было следствием неспецифического взаимодействия LIFR с h5D8 или с биосенсорами.

Чтобы дополнительно охарактеризовать связывание h5D8 и LIF, провели серию экспериментов по связыванию с помощью ELISA. H5D8 и LIF предварительно инкубировали и затем вносили в планшеты, покрытые либо рекомбинантным человеческим (hLIFR), либо gp130. Отсутствие связывания между комплексом h5D8/LIF и покрывающим субстратом может указывать на то, что h5D8 каким-то образом нарушает связывание LIF с рецептором. Кроме того, также использовали контрольные антитела, которые либо не связывают LIF (изотипический контроль, обозначен (-)), либо связывают LIF в известных сайтах связывания (B09 не конкурирует ни с gp130, ни с LIFR за связывание LIF; r5D8 является крысиной исходной версией h5D8). Результаты ELISA продемонстрировали, что комплекс h5D8/LIF был способен связывать hLIFR (как и комплекс r5D8/LIF), указывая на то, что эти антитела не препятствовали связыванию LIF/LIFR (фиг. 16А). И наоборот, комплекс h5D8/LIF (и комплекс r5D8/LIF) не был способен связывать рекомбинантный gp130 человека (фиг. 16В). Это указывает на то, что сайт связывания gp130 на LIF затрагивается, если LIF связан с h5D8.

Пример 21. Экспрессия LIF и LIFR в тканях человека.

Проводили количественную ПЦР в режиме реального времени со множеством разных типов тканей человека, чтобы определить уровни экспрессии LIF и LIFR. Средние уровни экспрессии, показанные на фиг. 17А и 17В, представлены в копиях на 100 нг общего количества РНК. Большинство тканей экспрессировали не менее 100 копий на 100 нг общего количества РНК. Экспрессия мРНК LIF была наиболее высокой в жировой ткани человека (брыжейке подвздошной кишки [1]), ткани кровеносных сосудов (хороидном сплетении [6] и брыжеечных сосудах [8]) и ткани пуповины [68]; и наиболее низкой в тканях головного мозга (коре [20] и черной субстанции [28]). Экспрессия мРНК LIFR была наиболее высокой в жировой ткани человека (брыжейке подвздошной кишки [1]), ткани кровеносных сосудов (легочных сосудах [9]), ткани мозга [11-28] и ткани щитовидной железы [66]; и наиболее низкой в РВМС [31]. Уровни экспрессии мРНК LIF и LIFR в тканях макака-крабоеда были подобны уровням, наблюдаемым в тканях человека, где экспрессия LIF была высокой в жировой ткани, и экспрессия LIFR была высокой в жировой ткани и низкой в РВМС (данные не показаны).

Нумерация тканей на фиг. 17А и 17В следующая: 1 - жировая ткань (брыжейка подвздошной кишки); 2 - надпочечник; 3 - мочевого пузырь; 4 - мочевого пузырь (треугольник); 5 - кровеносный сосуд (мозговой: средняя мозговая артерия); 6 - кровеносный сосуд (хороидное сплетение); 7 - кровеносный сосуд (коронарная артерия); 8 - кровеносный сосуд (брыжеечный (толстая кишка)); 9 - кровеносный сосуд (легочный); 10 - кровеносный сосуд (почечный); 11 - головной мозг (миндалины); 12 - головной мозг (хвостатое ядро); 13 - головной мозг (мозжечок); 14 головной мозг - (кора: передняя поясная извилина); 15 - головной мозг (кора: задняя поясная извилина); 16 - головной мозг (кора: латеральная лобная область); 17 - головной мозг (кора: медиальная лобная область); 18 - головной мозг (кора: затылочная область); 19 - головной мозг (кора: теменная область); 20 - головной мозг (кора: височная область); 21 - мозг (дорсальное ядро шва); 22 - головной мозг (гиппокамп); 23 - головной мозг (гипоталамус: передний); 24 - головной мозг (гипоталамус: задний); 25 - головной мозг (голубое пятно); 26 - головной мозг (продолговатый мозг); 27 - головной мозг (прилежащее ядро); 28 - головной мозг (черная субстанция); 29 - молочная железа; 30 - слепая кишка; 31 - мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС); 32 - ободочная кишка; 33 - ганглии задних корешков (DRG); 34 - двенадцатиперстная кишка; 35 - фаллопиева труба; 36 - желчный пузырь; 37 - сердце (левое предсердие); 38 - сердце (левый желудочек); 39 - подвздошная кишка; 40 - тощая кишка; 41 - почка (кора); 42 - почка (мозговое вещество); 43 - почка (лоханка); 44 - печень (паренхима); 45 - печень (бронх: первичный); 46 - печень (бронх: третичный); 47 - легкое (паренхима); 48

- лимфатический узел (миндалины); 49 - мышца (скелетная); 50 - пищевод; 51 - яичник; 52 - поджелудочная железа; 53 - шишковидная железа; 54 - гипофиз; 55 - плацента; 56 - предстательная железа; 57 - прямая кишка; 58 - кожа (крайняя плоть); 69 - спинной мозг; 60 - селезенка (паренхима); 61 - желудок (антральный отдел); 62 - желудок (тело); 63 - желудок (дно); 64 - желудок (пилорический канал); 65 - яичко; 66 - щитовидная железа; 67 - трахея; 68 - пуповина; 69 - мочеточник; 70 - матка (шейка); 71 - матка (миометрий); 72 - семявыводящий проток.

Пример 22. Выбор дозы, поэтапное увеличение доз и введение фиксированных доз.

Ниже описаны выбор дозы антитела к LIF, поэтапное увеличение доз и введение фиксированных доз. Для оценки безопасности h5D8 применяли мышей и макаков-крабоедов.

Никаких побочных эффектов, связанных с лечением, не наблюдали в 4-недельных исследованиях токсичности по стандарту GLP на мышах и обезьянах, которые еженедельно получали в/в дозу, составляющую не более 100 мг/кг. Таким образом, наиболее высокая неопасная токсическая доза (HNSTD) составляет >100 мг/кг, а уровень отсутствия наблюдаемых побочных эффектов (NOAEL) был установлен равным 100 мг/кг в/в для обоих видов в условиях исследований. Дозировку масштабировали для установления эквивалентной дозы для человека (HED). Для оценки HED был адаптирован подход масштабирования на основе площади поверхности тела (BSA). На основании этих токсикологических исследований по стандарту GLP рассчитывали максимальную рекомендуемую начальную дозу (MRSD) так, как показано ниже:

- 0,81 мг/кг в/в HED от мышиноного NOAEL с 10-кратным коэффициентом безопасности;
- >10 мг/кг в/в на основании 1/10 опасной токсической дозы у мышей;
- 3,2 мг/кг HED в/в от NOAEL макака-крабоеда с 10-кратным коэффициентом безопасности;
- > 16,7 мг/кг в/в на основе 1/6 HNSTD.

Исходя из результатов токсикологических исследований и при использовании консервативного подхода к популяции пациентов с распространенным раком в исследовании фазы 1, с помощью этих данных была подтверждена MRSD, составляющая 1 мг/кг (или фиксированная доза 75 мг) в/в.

Также при установлении MRSD была учтена фармакологически активная доза (PAD). Исходя из фармакологических, PK данных и данных по стабилизации уровня LIF на фармакологических мышинных моделях, доступных на сегодняшний день, для оценки PAD применяли следующий подход. Исходя из зависимости ответа от дозы в мышинной модели ксенотрансплантата U251, в качестве оптимальной эффективной дозы приняли дозу приблизительно 300 мкг и/п два раза в неделю; этот уровень дозы был связан с минимальным уровнем в сыворотке крови перед последней дозой, составлявшим приблизительно 230 мкг/мл. Было получено доказательство того, что максимальная стабилизация уровней LIF в сыворотке крови в данной модели достигалась при этой дозе 300 мкг, что также подтверждалось данными по стабилизации уровня LIF в сыворотке крови в исследовании токсичности по стандарту GLP у мышей при дозах 10, 30 и 100 мг/кг. С применением PK модели, основанной на 2-компарментной модели, экстраполированной к PK данным от обезьян и масштабированной для людей, было установлено, что клиническая доза 1500 мг каждые 3 недели будет обеспечивать значение $S_{\text{минимальная}}$, составляющее приблизительно 500 мкг/мл. Аналогично, минимальная эффективная доза 20 мкг дважды в неделю в этой мышинной модели ксенотрансплантата U251 была связана с минимальным уровнем в сыворотке крови перед последней дозой, составлявшим приблизительно 20 мкг/мл; было получено доказательство того, что при этой дозе 20 мкг достигалось лишь приблизительно 50% максимальной стабилизации уровня LIF в сыворотке крови, что подтверждалось свидетельством минимальной стабилизации уровня LIF при дозе 0,5 мг/кг в/в в исследовании PK-переносимости на мышах. Клиническая доза 75 мг каждые 3 недели будет обеспечивать значение $S_{\text{минимальная}}$, составляющее приблизительно 25 мкг/мл. Дополнительные PK-PD данные (стабилизация уровня LIF), доступные от мышинных сингенных моделей, подтверждали PAD, полученную в мышинной модели ксенотрансплантата U251.

Таким образом, на основании как токсикологических данных у мышей и обезьян, так и данных минимальной эффективной дозы в мышинной модели ксенотрансплантата, в качестве подходящей принимали начальную дозу, составляющую 75 мг в/в. Максимальная клиническая доза, составляющая от 1500 до 2000 мг, была подтверждена токсикологическими данными. Подход с введением фиксированных доз являлся подходящим, исходя из наблюдений линейной PK у животных моделей в сочетании с отсутствием неблагоприятных результатов, связанных с исследуемым препаратом.

Пример 23. Экспрессия LIF при различных видах рака.

Установление лечения на основании уровней LIF независимо от типа рака было бы осуществимым способом, если бы имела место гетерогенность экспрессии LIF при различных типах рака. На фиг. 18 показано, что определенные виды рака характеризуются более высокой частотой проявления высоких уровней мРНК LIF. Даже среди видов рака, характеризующихся относительно высокой частотой проявления низкого уровня экспрессии LIF, имеется подгруппа индивидуумов, которым лечение с помощью антитела к LIF принесет пользу.

Способ.

Данные по секвенированию РНК получали из хранилища Атлас ракового генома для 7769 образцов в 22 категориях. Экспрессию транскриптов LIF разграничивали на высокую, средне-высокую, средне-

низкую и низкую на основе верхнего, верхне-среднего, ниже-среднего и нижнего квартиля экспрессии LIF, рассчитанных для всех образцов.

Пример 24. Экспрессия LIF коррелирует с хемокинами регуляторных Т-клеток при различных видах рака.

Ранее было указано, что ингибирование LIF обладает эффектом снижения численности популяций иммуносупрессивных макрофагов (например, макрофагов M2) в мышинных и человеческих моделях *ex vivo* (фиг. 10A-10D) и снижения численности регуляторных CD4+ Т-клеток в мышинной модели NSCLC (фиг. 11C), и инфильтрации. Таким образом, виды рака, которые характеризуются высоким уровнем как LIF, так и хемокинов регуляторных Т-клеток или секретируемых миелоидными клетками или макрофагами M2 хемокинов, могут определять подгруппу индивидуумов с высокой вероятностью ответа на лечение с помощью антитела к LIF. Регуляторные Т-клетки представляют собой иммуносупрессивные CD4+ клетки, а макрофаги M2 являются макрофагами, которые поддерживают противовоспалительное иммуносупрессивное окружение в тканях, по сравнению с макрофагами M1, которые поддерживают провоспалительное окружение. На фиг. 19A-19D показана корреляция экспрессии мРНК LIF и мРНК различных хемокинов регуляторных Т-клеток, а именно CCL7 (фиг. 19A), CCL2 (фиг. 19B), CCL3 (фиг. 19A) и CCL22 (фиг. 19A). Подобным образом, на фиг. 20A показана корреляция между экспрессией мРНК LIF и мРНК, определяющими сигнатуру макрофага M2. Это обеспечивает основу для отделения популяции индивидуумов с экспрессией LIF (даже тех, у которых низкий или средне-низкий уровень LIF) как тех, кто потенциально будет отвечать на терапевтическое антитело к LIF, если присутствует иммуносупрессивная сигнатура (например, на основе экспрессии маркеров M2, хемокинов регуляторных Т-клеток или маркеров регуляторных Т-клеток).

Значительную положительную корреляцию между LIF и CCL2, CD163 и CD206 наблюдали как при анализе наборов данных TCGA при GBM человека, так и при раке яичника (фиг. 20B). Корреляции между LIF и CXCL9 не наблюдали (данные не показаны), но относительно низкие уровни мРНК CXCL9 выявили в опухолях. Данные результаты подтвердили на уровне белка путем анализа когорты из 20 пациентов с GBM и проведения иммуногистохимического анализа опухолей на LIF, CXCL9, CCL2, CD163 и CD206. Наблюдали сильную положительную корреляцию между LIF и CCL2, CD 163 и CD206 (фиг. 20C). CXCL9 экспрессировался в изолированных кластерах клеток, что объясняет низкие уровни мРНК CXCL9, присутствующие в опухолях. Следует отметить, что CXCL9 продемонстрировал обратную корреляцию с LIF при GBM человека (фиг. 20C).

CXCL9 и CCL2 являлись хемокинами, критически важными для инфильтрации опухоли CD8 Т-клетками и привлечения TAM и Treg соответственно. Подтвердили регуляцию CXCL9 и CCL2 по нейтрализации LIF в TAM (CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C⁺) (фиг. 20D) Иммуноокрашивание и выделение TAM продемонстрировало, что CXCL9, CCL2, CD206 и CD163 главным образом экспрессировались в TAM (фиг. 20E), и обработка антителом к LIF (h5D8) регулировала их экспрессию (фиг. 20D, 20E). CXCR3 (рецептор CXCL9), CCR2 (рецептор CCL2) и LIFR экспрессировались в TAM и CD8⁺ Т-клетках (фиг. 20F).

Мышиные модели с нокаутом по CXCL9 и CCL2 (CXCL9^{-/-}, CCL2^{-/-}) использовали для тестирования значимости регуляции CXCL9 и CCL2 для онкогенной функции LIF. Опухоли в этих мышинных моделях обрабатывали с использованием блокирующих антител к CXCL9 и CCL2. Примечательно, что противопухольный ответ на ингибирование LIF был ослаблен у мышей CXCL9^{-/-}, но не у мышей CCL2^{-/-} (фиг. 20G). Аналогично, нейтрализующее антитело к CXCL9, но не антитело к CCL2 ослабляло противораковый ответ на антитело к LIF (h5D8) (фиг. 20G). Эти результаты продемонстрировали, что основным медиатором ответа на антитело к LIF (h5D8) был CXCL9. Как и ожидалось, блокада CXCL9 уменьшала инфильтрацию опухоли CD8⁺ Т-клетками в ответ на антитела к LIF (h5D8) (фиг. 20H).

Чтобы подтвердить, что LIF регулирует инфильтрацию опухоли иммунными клетками посредством репрессии CXCL9 в опухолях от настоящих онкологических пациентов, из образцов GBM, недавно полученных от пациентов, создавали органотипические культуры тканей. Эти органотипические модели позволяют кратковременно культивировать срезы опухолей, которые сохраняют строение ткани и строму (включая иммунные клетки) опухоли пациента. Органотипические культуры тканей, полученные от 3 пациентов, опухолевые клетки которых экспрессировали высокие уровни LIF (фиг. 20I). Все 3 культуры характеризовались высоким уровнем инфильтрации TAM, выявленным по маркеру Iba1, и большинство TAM экспрессировало CCL2, CD163 и CD206. Примечательно, что 3-дневная обработка органотипической культуры нейтрализующим антителом к LIF способствовала снижению экспрессии CCL2, CD163 и CD206 и повышению экспрессии CXCL9 (фиг. 20I).

Подобно приведенному выше наблюдению в случае макрофагов человека, обработанных антителом к LIF (h5D8), наблюдали, что обработка антителом к LIF (h5D8) индуцировала снижение экспрессии маркеров M2 CD206 и CD163 в опухолях CT26 (фиг. 20J). Напротив, обработка антителом к LIF (h5D8) индуцировала повышение экспрессии иммуностимулирующих маркеров M1, включая CXCL9, CXCL10 и PD-L1 (фиг. 20J). Эти результаты дополнительно расширяли также исследуя фенотипы TAM в опухолях MC38, обработанных антителом к LIF (h5D8). В то время как обработанные опухоли не демонстрируют разницы в общей частоте общих миелоидных популяций или популяций TAM, обработка антителом к LIF (h5D8) индуцировала повышение экспрессии как у части TAM, экспрессирующих MHCII, так и по-

вышение общего уровня экспрессии МНСII (фиг. 20К). Параллельное сравнение отклонения М1/М2 в моделях СТ26 и МС38 было невозможным, поскольку ТАМ МС38 не экспрессировали CD206, ключевой маркер, используемый для фенотипирования макрофагов М2 в модели СТ26. Вместе эти данные демонстрируют, что обработка антителом к LIF подавляет рост опухоли в двух независимых преклинических моделях опухоли. Анализ демонстрирует, что обработка антителом к LIF влияла на фенотипы ТАМ, но не на общие количества ТАМ или общие количества миелоидных клеток, предполагая, что наблюдаемая эффективность имеет место, вероятно, частично за счет перепрограммирования ТАМ в пользу противоопухолевого иммунитета.

Способы.

Данные по секвенированию РНК получали из хранилища Атлас ракового генома. На основе корреляции Пирсона рассчитывали ассоциацию между экспрессией LIF и различных хемокинов регуляторных Т-клеток (CCL7, CCL2, CCL3 и CCL22) для образцов опухоли при раке желчного пузыря, головного мозга, молочной железы, толстой кишки, головы и шеи, почки, легкого, меланоме, раке яичника, поджелудочной железы, предстательной железы и матки. На основе корреляции Пирсона рассчитывали ассоциацию между экспрессией LIF и транскрипционной сигнатурой, представляющей макрофагов М2, для образцов опухоли при раке желчного пузыря, головного мозга, молочной железы, толстой кишки, головы и шеи, почки, легкого, меланоме, раке яичника, поджелудочной железы, предстательной железы и матки.

Клетки лизировали для экстрагирования мРНК (RNeasy Mini или Micro Kit, Qiagen), выполняли ретро-транскрипцию (iScript Reverse Supermix от BioRad для мРНК) и выполняли qRT-PCR с использованием зондов Taqman от Applied Biosystems в соответствии с рекомендациями производителя. В случае залитых парафином срезов РНК получали с использованием набора для выделения РНК High Pure FFPE RNA isolation kit (Roche) и следуя инструкциям производителя. Реакции проводили в системе CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), а результаты выражали в виде кратности изменения, вычисленного по методу Ct, по сравнению с контрольным образцом. АКТВ мыши или человека или GAPDH использовали в качестве внутренних контролей для нормализации.

РНК анализировали на платформе Affymetrix microarray platform с использованием Mouse Gene 2.1 ST. Затем ее нормализовали на основе Robust-Microarray Average (RMA). С помощью байесовской линейной регрессии с учетом парных образцов с использованием пакета limma Bioconductor идентифицировали, что гены дифференциально экспрессировались у мышей, которых обрабатывали антителом к LIF.

В экспериментах на мышах ядра контрастно окрашивали с использованием DAPI и изображения получали с использованием конфокального лазерного сканирующего микроскопа NIKON Eclipse Ti. Количественную оценку иммунофлуоресценции проводили с помощью ImageJ, подсчитывая все или до 100 клеток, положительных по CD 11b, Iba1 или CD3, в 2-3 разных полях для каждой мыши, 3-5 мышей/группа, и вычисляли процентную долю клеток, положительных по CCL2, CD206 и CD163 в составе популяций, положительных по Iba1 (для модели GL261N) или CD68/CD11b (для модели ID8). Для CXCL9 рассчитывали процентную долю клеток, окруженных сигналом данного цитокина, в общей популяции клеток. В случае органотипических срезов количественно оценивали 3-4 поля каждого пациента (n = 3). Для иммунофлуоресценции органотипической ткани пять различных изображений по оси Z для каждого условия обрабатывали с помощью программного обеспечения Fiji-Image J. Для CD8⁺ Т-клеток вычисляли процентную долю CD8 Т-клеток во всей популяции. Данные на графиках представлены в виде среднего значения ± SEM.

Антитела для иммунофлуоресцентного анализа: CCL2 человека/мыши (Novus Biologicals; 1:200), CD11b человека/мыши (AbCam; 1:2000), Iba1 человека/мыши (Wako; 1:1000), CD68 мыши (AbCam; 1:200), CD206 человека/мыши (Abcam; 1:500), CD163 мыши (Abcam; 1:200), CXCL9 (мыши: Novus Biologicals, 1:200; человека: Thermo Fischer Scientific; 1:200) и CD8 человека (DAKO; 1:200).

Образцы GBM человека получили из университетской больницы и клинической больницы Валь де Брона. Клинический протокол был одобрен Институциональным наблюдательным советом и клинической больницей Валь де Брона (CEIC) с информированного согласия, полученного от всех субъектов.

Органотипические культуры срезов GBM получали следующим образом. После резекции хирургические образцы разрезали скальпелем на прямоугольные блоки длиной 5-10 мм и шириной 1-2 мм и по отдельности переносили в мембранные вставки для культивирования 0,4 мкм (Millipore) в 6-луночных планшетах. Перед помещением вставок в 6-луночные планшеты в каждую лунку добавляли 1,2 мл среды Neurobasal (Life Technologies), дополненной B27 (Life Technologies), пенициллином/стрептомицином (Life Technologies) и факторами роста (20 нг/мл EGF и 20 нг/мл FGF-2) (PeproTech). Культуры хранили при температуре 37°C, постоянной влажности, 95% воздуха и 5% CO₂. Через один день срезы обрабатывали крысиным блокирующим антителом к мышиному/человеческому антителу, блокирующему LIF (h5D8) (обозначенным как антитело к LIF) (полученным в лаборатории), или его соответствующим нормальным IgG (10 мкг/мл) в течение 3 дней. Для исследований блокирования CXCL9 в культуру добавляли нейтрализующее мышинное моноклональное антитело к CXCL9 человека (R&D Systems) в концентрации 1,5 мкг/мл. В некоторых случаях добавляли 0,1 нг/мл rIFN γ человека (R&D Systems) на 24 ч. Парал-

лельно с этим мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) получали из цельной крови того же пациента путем разделения по градиенту плотности на центрифуге с использованием Lymphosep (Biotest). PBMC подвергали криоконсервации в среде RPMI, дополненной 10% инактивированной FBS и 10% DMSO перед использованием. Для анализов инфильтрации иммунными клетками контрольные срезы или срезы с ингибированием LIF погружали в Matrigel (Corning) с последующим добавлением 1×10^6 PBMC в 24-луночный планшет в полной среде RPMI. Кроме того, собирали супернатанты, извлекали органотипические срезы из Matrigel, а затем обрабатывали для иммунофлуоресцентного (IF) анализа и проточной цитометрии. В некоторых условиях PBMC ресуспендировали в PBS при концентрации 10 клеток/мл и инкубировали в течение 20 мин с 5 мкМ Cell Trace CFSE (Invitrogen). После инкубации клетки промывали с использованием RPMI и добавляли в срезы, погруженные в Matrigel. Через 24 ч инвазию флуоресцентных PBMC в Matrigel оценивали под микроскопом путем подсчета мигрирующих клеток в пяти различных областях для каждого условия.

Микропрепараты депарафинизировали и гидратировали. Извлечение антигена выполняли с использованием раствора Citrate Antigen Retrieval Solution (DAKO) с pH6 или 9 в течение 10 мин, 10% пероксидазы (H_2O_2) и блокирующего раствора (2% BSA) в течение 1 ч при комнатной температуре. В качестве системы обнаружения использовали En Vision FLEX + (DAKO) в соответствии с инструкциями производителя с последующим контрастным окрашиванием гематоксилином, дегидратацией и заливкой средой (DPX). Количественную оценку окрашивания по LIF, CCL2, CD163, CD206 и CXCL9 в опухолях GBM от пациентов выражали как H-балл ($3 \times$ процент сильного окрашивания + $2 \times$ процент умеренного окрашивания + процент слабого окрашивания) в диапазоне от 0 до 300. Количественную оценку p-STAT3, Ki67, CC3 и CD8 проводили с помощью ImageJ, подсчитывая общее количество клеток в трех разных полях на мышь, пять мышей/группа, и вычисляя процент положительных клеток. Данные на графиках представлены в виде среднего значения \pm SEM.

Антитела для иммуногистохимического исследования: человеческий LIF (Atlas; 1:200), мышинный LIF (AbCam; 1:200), мышинный p-STAT3 (Cell Signaling; 1:50), мышинный Ki67 (AbCam; 1:200), мышинная расщепленная каспаза 3 (CC3) (Cell Signaling; 1:500), мышинный CD8 (Bioss; 1:200), человеческий/мышинный CCL2 (Novus Biologicals, 1:200), человеческий CXCL9 (Thermo Fischer Scientific; 1:100) и человеческий CD163 (Leica Novacastra; 1:200).

Пример 25. LIF индуцирует поляризацию макрофагов типа II (M2).

Двойная стратификация по иммуносупрессивной сигнатуре LIF является потенциально надежным способом идентификации индивидуумов, особенно склонных к ответу на терапевтическое лечение с помощью антитела к LIF. Дополнительное доказательство, подтверждающее это, показано на фиг. 21A и 21B, 22 и 23. На фиг. 21A и 21B показано, что у первичных макрофагов человека повышается экспрессия рецептора LIF после культивирования моноцитов в течение 7 дней с 50 нг/мл M-CSF. Показаны клетки, полученные от трех разных индивидуумов. На фиг. 22 и 23 дополнительно показано, что у первичных макрофагов человека повышается экспрессия маркеров поверхности макрофагов CD206 и CD 163 (фиг. 22) и секреция CCL22 (фиг. 23) после 72 часов культивирования с LIF. Примечательно, что секреция CCL22 намного более стабильна у поляризованных макрофагов M2 (фиг. 23, снизу справа). Эти данные обеспечивают механистическую связь между экспрессией LIF и наличием иммуносупрессивной сигнатуры, указывающей на то, что двойную иммуносупрессивную сигнатуру LIF для выбора лечения пациента можно применять при всех типах рака и во всех тканях.

Способ.

Макрофаги дифференцировали из периферических $CD14^+$ моноцитов человека посредством культивирования в среде RPMI-1640 с 10% FBS, инактивированной нагреванием, пенициллином/стрептомицином и 50 нг/мл M-CSF в течение 7 дней. В некоторых экспериментах после этого осуществляли культивирование в той же среде с добавлением 20 нМ LIF или PBS (для контроля), или 100 нг/мл LPS и 25 нг/мл $IFN\gamma$ (для поляризации M1) или по 20 нг/мл каждого из IL-4, IL-10 и TGFP (для поляризации M2) в течение дополнительных указанных периодов времени.

Пример 26. Экспрессия рецептора LIF на миелоидных клетках при различных видах рака.

Дополнительным подтверждением перспективы двойной иммуносупрессивной сигнатуры LIF, важной для роста опухоли и выживания рака, является то, что макрофаги, ассоциированные с опухолью человека, действительно экспрессируют рецептор LIF. На фиг. 24 и 25 показано, что макрофаги, выделенные из 3 из 4 разделенных опухолевых клеток рака яичника и рака легкого, экспрессируют рецептор LIF (фиг. 24). Кроме того, рецептор LIF экспрессируется на клеточной поверхности супрессорных клеток миелоидного происхождения, ассоциированных с опухолью, как моноцитарных супрессорных клеток миелоидного происхождения, так и полиморфоядерных супрессорных клеток миелоидного происхождения (PMN-MDSC) (фиг. 25).

Хотя в данном документе были показаны и описаны предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, специалистам в данной области техники будет очевидно, что такие варианты осуществления приведены лишь в качестве примера. Многочисленные варианты, изменения и замены будут очевидны специалистам в данной области техники без отклонения от настоящего изобретения.

Следует понимать, что различные альтернативы вариантам осуществления настоящего изобретения, описанные в данном документе, можно использовать при практической реализации настоящего изобретения.

Все публикации, заявки на патенты, выданные патенты и другие документы, упоминаемые в настоящем описании, включены в данный документ посредством ссылки в том же объеме, как если бы каждая отдельная публикация, заявка на патент, выданный патент или другой документ были конкретно и отдельно указаны как включенные в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Определения, которые содержатся в тексте, включенном посредством ссылки, исключаются в том же объеме, в котором они противоречат определениям в настоящем изобретении.

Если не определено иное, вся техническая терминология, используемая в данном документе, имеет такое же значение, которое обычно понятно специалисту в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение. Используемая в настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения форма единственного числа предусматривает определяемые объекты и во множественном числе, если из контекста явно не следует иное. Предполагается, что любое упоминание "или" в данном документе охватывает "и/или", если не указано иное.

Используемый в данном документе, если не указано иное, термин "приблизительно" относится к количеству, которое находится в пределах по меньшей мере 10% от заявленного.

Последовательности

SEQ ID NO	Последовательность
1	GFTFSHAWMH
2	GFTFSHAW
3	HAWMH
4	QIKAKSDDYATYYAESVKG
5	IKAKSDDYAT
6	TCWEWDLDF
7	WEWDLDF
8	TSWEWDLDF
9	RSSQSLDSDGHTYLN
10	QSLDSDGHTY
11	SVSNLES
12	SVS
13	MQATHAPPYT
14	EVQLVESGGGLVKGPGSLKLSCAASGFTFSHAWMHVVRQAPGKGLEWVAQ IKAKSDDYATYYAESVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTCW EWDLDFWGQGLTVTVSS

15	QVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSHAWMHWVRQAPGKGLEWVG QIKAKSDDYATYYAESVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTC WEWDLDFWGQGTMTVTVSS
16	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSHAWMHWVRQAPGKGLEWVAQ IKAKSDDYATYYAESVKGRFSISRDNAKNSLYLQMNSLRVEDTVVYYCTCW EWDLDFWGQGTTVTVSS
17	EVQLMESGGGLVKPGGSLRLSCATSGFTFSHAWMHWVRQAPGKGLEWVGQ IKAKSDDYATYYAESVKGRFTISRDDSKSTLFLQMNNLKTEDTAVYYCTCW EWDLDFWGQGTTLVTVSS
18	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLDSGDHTYLNWFQQRPGQSPRRLI YSVSNLESGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGLYYCMQATHAPPYTFGQGTKLEIK
19	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLLDSGDHTYLNWLQQRPGQPPRLIY SVSNLESGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQATHAPPYTFGQ GTKLEIK
20	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLLDSGDHTYLNWLLQKPGQPPQLLIY SVSNLESGVPNRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGLYYCMQATHAPPYTFGG GTKVEIK
21	DVVMTQSPLSQPVTLGQPASISCRSSQSLLDSGDHTYLNWLQQRPGQSPRRLI YSVSNLESGVPDRFNGSGSGTDFTLISRVEAEDVGVYYCMQATHAPPYTFG QGTKVEIK
22	MGWTLVFLFLLSVTAGVHSEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSHA WMHWVRQAPGKGLEWVAQIKAKSDDYATYYAESVKGRFTISRDDSKNTLY LQMNSLKTEDTAVYYCTCW EWDLDFWGQGTTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
23	MGWTLVFLFLLSVTAGVHSQVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSHA WMHWVRQAPGKGLEWVGQIKAKSDDYATYYAESVKGRFTISRDDSKNTLY

	LQMNSLKTEDTAVYYCTCWEWDLDFWGGQTMVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
24	MGWTLVFLFLLSVTAGVHSEVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSHA WMHWVRQAPGKGLEWVAQIKAKSDDYATYYAESVKGRFSISRDNKNSLY LQMNSLRVEDTVVYYCTCWEWDLDFWGGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
25	MGWTLVFLFLLSVTAGVHSEVQLMESGGGLVKPGGSLRLSCATSGFTFSHA WMHWVRQAPGKGLEWVGQIKAKSDDYATYYAESVKGRFTISRDDSKSTLF LQMNNLKTEDTAVYYCTCWEWDLDFWGGQTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
26	MVSSAQFLGLLLLCFQGTRCDVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLDSD GHTYLNWFQQRPGQSPRRLIYSVSNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGLYYCMQATHAPPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

27	MVSSAQFLGLLLLCFQGTRCDIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLLDSDG HTYLNWLQQRPGQPPRLIYSVSNLESGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAED VGVYYCMQATHAPPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
28	MVSSAQFLGLLLLCFQGTRCDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLLDSDG HTYLNWLLQKPGQPPQLLIYSVSNLESGVPNRFSGSGSGTDFTLKISRVEAED VGLYYCMQATHAPPYTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
29	MVSSAQFLGLLLLCFQGTRCDVVMTQSPLSQPVTLGQPASISCRSSQSLLDSD GHTYLNWLQQRPGQSPRRLIYSVSNLESGVPDRFSGSGSGTDFLSISRVEAE DVGYYCMQATHAPPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
30	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSHAWMHVVRQAPGKGLEWVAQ IKAKSDDYATYYAESVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTCW EWDLDFWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK
31	QVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSHAWMHVVRQAPGKGLEWVG QIKAKSDDYATYYAESVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTC WEWDLDFWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK

32	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSHAWMHWVRQAPGKGLEWVAQ IKAKSDDYATYYAESVKGRFSISRDNAKNSLYLQMNSLRVEDTVVYYCTCW EWDLDFWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK
33	EVQLMESGGGLVKPGGSLRLSCATSGFTFSHAWMHWVRQAPGKGLEWVGQ IKAKSDDYATYYAESVKGRFTISRDDSKSTLFLQMNNLKTEDTAVYYCTCW EWDLDFWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK
34	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLDSDGHTYLNWFQQRPGQSPRRLI YSVSNLESGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGLYYCMQATHAPPYTFG QGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC
35	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLDSDGHTYLNWLQQRPGQPPRLIY SVSNLESGVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQATHAPPYTFGQ GTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
36	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLDSDGHTYLNWLLQKPGQPPQLIY SVSNLESGVPMRFRSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGLYYCMQATHAPPYTFGG GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC

37	DVVMTQSPLSQPVTGLQGPASISCRSSQSLDSDGHTYLNWLQQRPGQSPRRLI YSVSNLESGVPDRFSGSGTDFTLSSISRVEAEDVGVYYCMQATHAPPYTFG QGTVKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC
38	QVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSHAWMHWRQAPGKGLEWVG QIKAKSDDYATYYAESVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTS WEWDLDFWGGQTMVTVSS
39	QVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSHAWMHWRQAPGKGLEWVG QIKAKSDDYATYYAESVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTS WEWDLDFWGGQTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
40	SPLPITPVNATCAIRHPCHNNLMNQIRSQLAQLNGSANALFILYYTAQGEFPF NNLDKLCGPNVDFPPFHANGTEKAKLVELYRIVVYLGTSLGNITRDQKILNP SALSLSKLNATADILRGLLSNVLCRLCSKYHVGHVDVTYGPDTSGKDVFQ KKKLGCQLLGKYKQIIAVLAQAF
41	EQLEESVGDVVKPGASLTLTCTASGFSFSGLYYMCWVRQAPGKGLEWIACI WTGSTDSTYYATWAKGRFTISKTSSTTVTLQMTSLTVADTATYFCARGGGV PGDGYALWPGTLVTVSS
42	GTELVMTQTPASVSEPVGGTVTINCQASEDISSNLVWYQQKSGQPPKLLIYD ASMLASGVPSRFKSGSGTQFTLTISDLECADGATYYCQSYVASSSYFVNG FGGGTEVV

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения индивидуума, страдающего от рака, с помощью терапевтического антитела к лейкоз-ингибирующему фактору (LIF), включающий определение того, что уровень LIF превышает эталонный уровень в биологическом образце, полученном от индивидуума, дополнительно включающий определение уровня белка иммуномодулирующей молекулы, превышающего эталонный уровень иммуномодулирующей молекулы, где иммуномодулирующая молекула выбрана из CCL7, CCL2, CCL3 и CCL22, и введение терапевтического количества антитела к LIF индивидууму, если уровень LIF выше эталонного уровня LIF и уровень белка иммуномодулирующей молекулы выше эталонного уровня иммуномодулирующей молекулы.

2. Способ по п.1, где терапевтическое антитело к LIF содержит:

- определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 2 (GFTFSHAW);
- определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 5 (IKAKSDDYAT);
- определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи иммуноглобулина (VH-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 6 (TCWEWDLDF);
- определяющую комплементарность область 1 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR1), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 10 (QSLDSDGHTY);
- определяющую комплементарность область 2 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR2), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 12 (SVS); и
- определяющую комплементарность область 3 легкой цепи иммуноглобулина (VL-CDR3), содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 13 (MQATHAPPYT).

3. Способ по п.2, где терапевтическое антитело к LIF содержит вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина, характеризующуюся по меньшей мере 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентичностью

с SEQ ID NO: 15, и вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина, характеризующуюся по меньшей мере 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 19.

4. Способ по п.3, где терапевтическое антитело к LIF содержит область тяжелой цепи иммуноглобулина, характеризующуюся по меньшей мере 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 31, и область легкой цепи иммуноглобулина, характеризующуюся по меньшей мере 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100% идентичностью с SEQ ID NO: 35.

5. Способ по любому из пп.1-4, где терапевтическое антитело к LIF представляет собой антитело IgG, содержащее две тяжелые цепи иммуноглобулина и две легкие цепи иммуноглобулина.

6. Способ по любому из пп.1-4, где терапевтическое антитело к LIF является гуманизированным.

7. Способ по любому из пп.1-6, где уровень LIF представляет собой уровень белка LIF, и определение уровня включает проведение по меньшей мере одного анализа, с помощью которого выявляют белок LIF, или получение результатов по меньшей мере одного анализа, с помощью которого выявляют белок LIF.

8. Способ по п.7, где по меньшей мере один анализ включает иммуногистохимическое исследование.

9. Способ по п.8, где эталонный уровень составляет приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30 или 35% клеток с положительным окрашиванием антителом к LIF.

10. Способ по п.8, где эталонный уровень соответствует показателю ИНС, составляющему от приблизительно 10 до приблизительно 100, или превышает его.

11. Способ по п.1, где рак выбран из перечня, состоящего из рака легкого, рака яичника, рака почки, рака мочевого пузыря, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака урогенитального тракта, гинекологического рака, рака желудочно-кишечного тракта, рака эндокринной системы, мультиформной глиобластомы, рака молочной железы, меланомы, колоректального рака, рака желчного протока, рака шейки матки, рака эндометрия, плоскоклеточной карциномы головы и шеи и их комбинаций.

12. Способ по п.11, где рак выбран из перечня, состоящего из немелкоклеточного рака легкого, мультиформной глиобластомы, эпителиальной карциномы яичника, аденокарциномы поджелудочной железы и их комбинаций.

13. Способ по любому из пп.1-12, где биологический образец включает образец крови.

14. Способ по п.13, где образец крови представляет собой плазму крови.

15. Способ по п.13, где образец крови представляет собой сыворотку крови.

16. Способ по любому из пп.1-13, где биологический образец включает образец ткани.

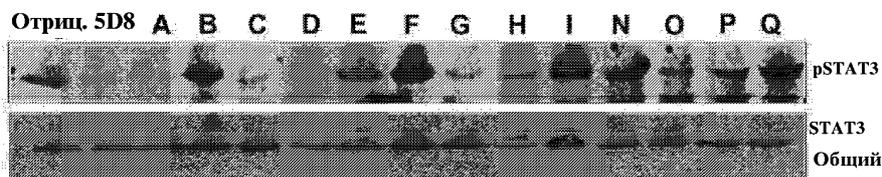
17. Способ по п.16, где биологический образец представляет собой биоптат опухоли.

18. Способ по любому из пп.1-16, где способ дополнительно включает определение уровня белка иммуномодулирующей молекулы, который ниже эталонного уровня иммуномодулирующей молекулы.

19. Способ по п.17, где иммуномодулирующая молекула выбрана из МНСII, CXCL9, CXCL10, CXCR3 и PD-L1.

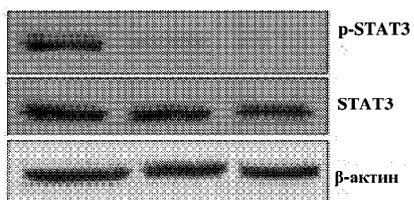
20. Способ по любому из пп.1-18, где способ дополнительно предусматривает определение уровня маркера макрофагов типа II (M2), превышающего эталонный уровень белка маркера макрофагов типа II (M2).

21. Способ по п.19, где маркер M2 выбран из перечня, состоящего из CD206, CD163, PF4, CTSK и ARG1.

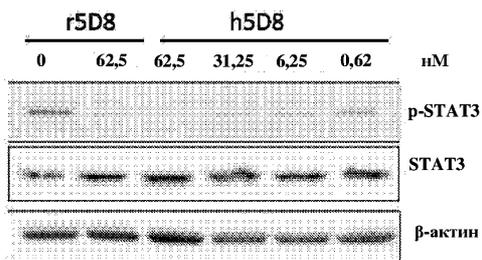


Фиг. 1

Отриц. 5D8 h5D8

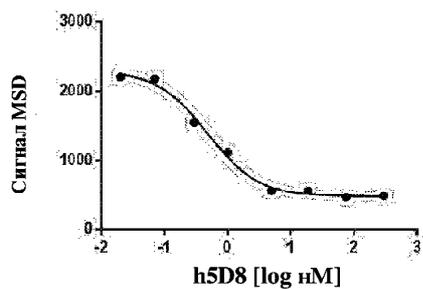


А

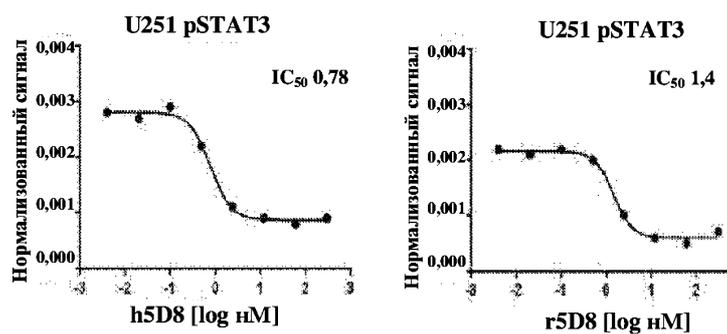


В

Фиг. 2А, В

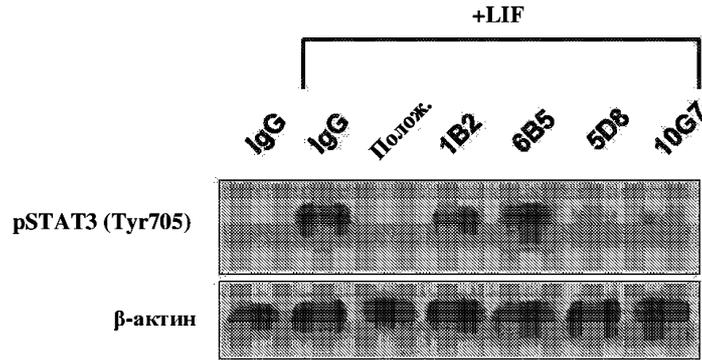


А

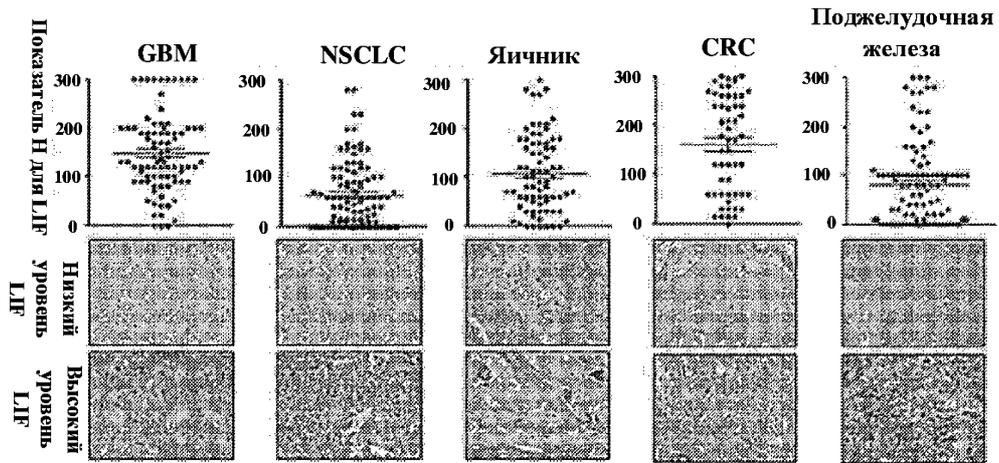


В

Фиг. 3А, В

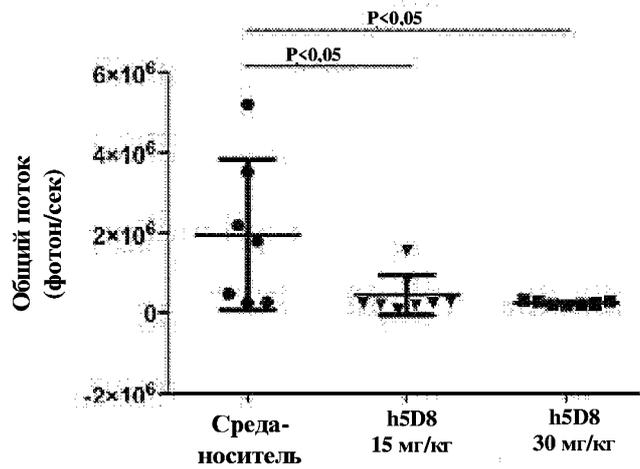


Фиг. 4

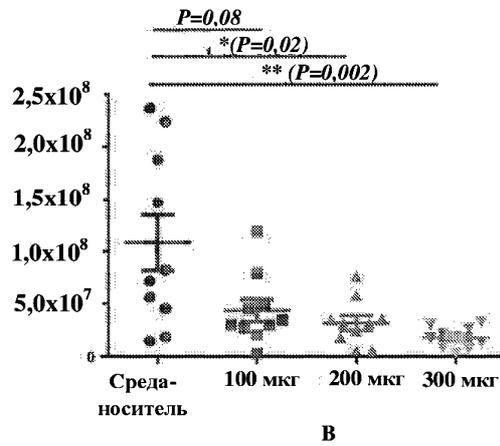
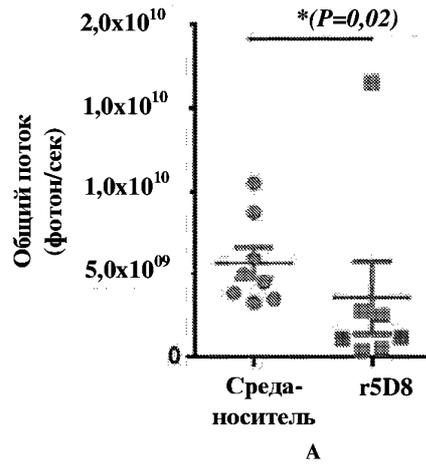


Фиг. 5

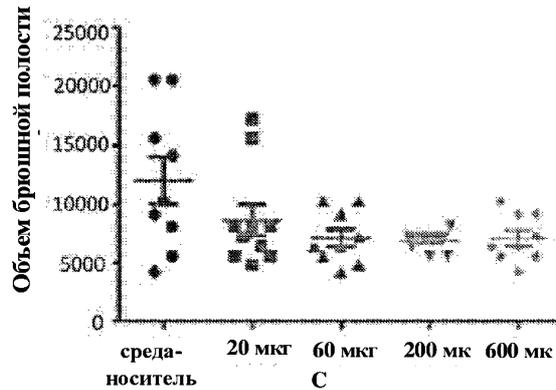
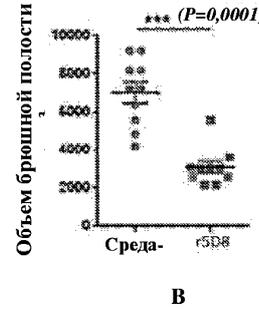
**Объем опухоли
(30 дней после хирургического
вмешательства)**



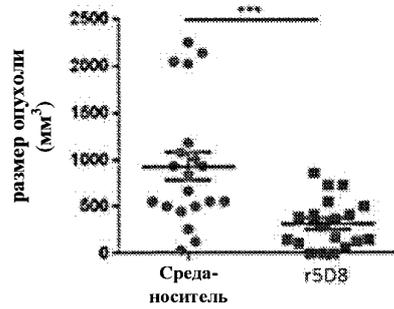
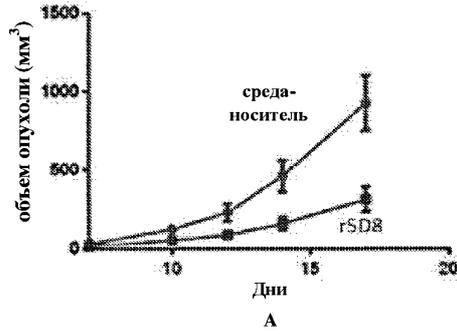
Фиг. 6



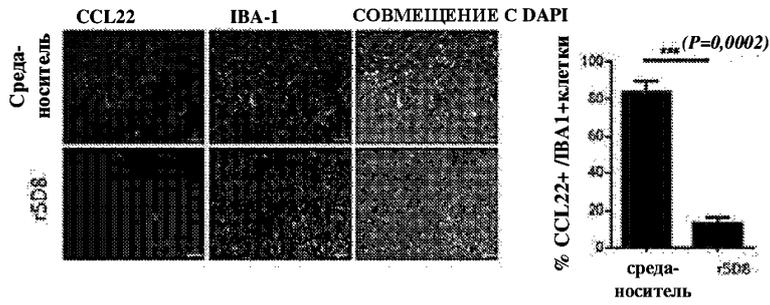
Фиг. 7А, В



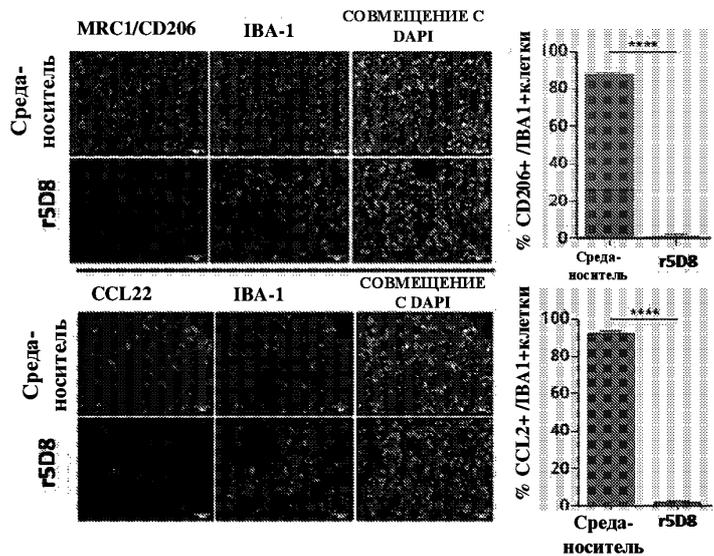
Фиг. 8А-С



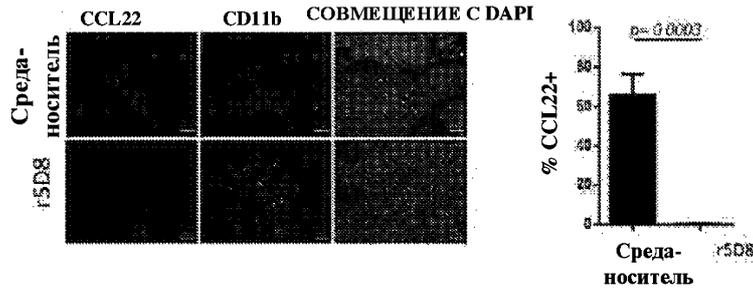
Фиг. 9А, В



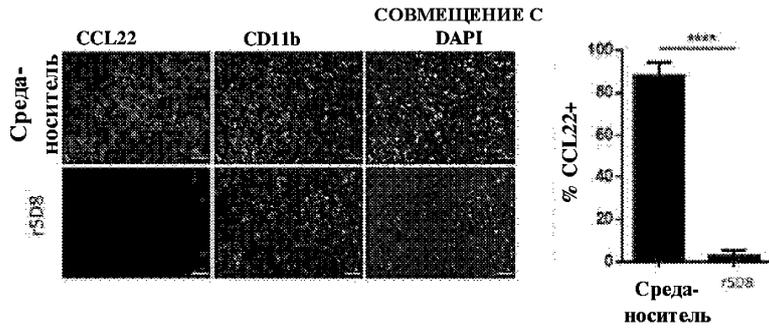
Фиг. 10А



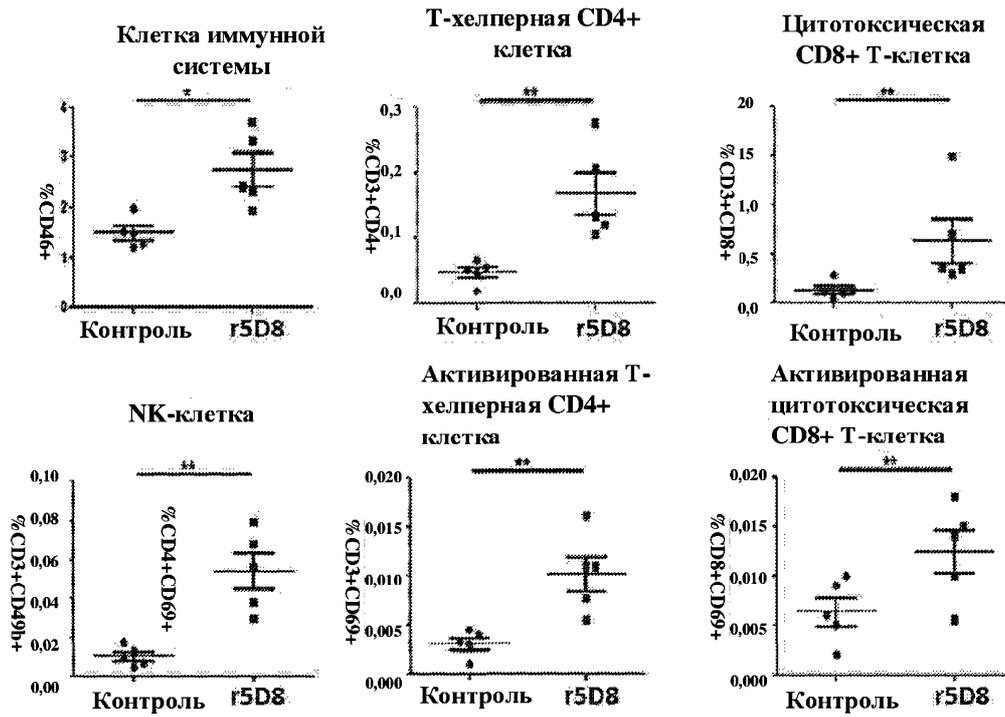
Фиг. 10В



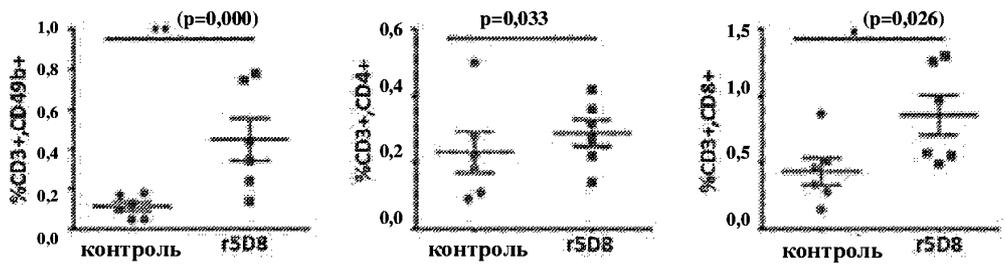
Фиг. 10С



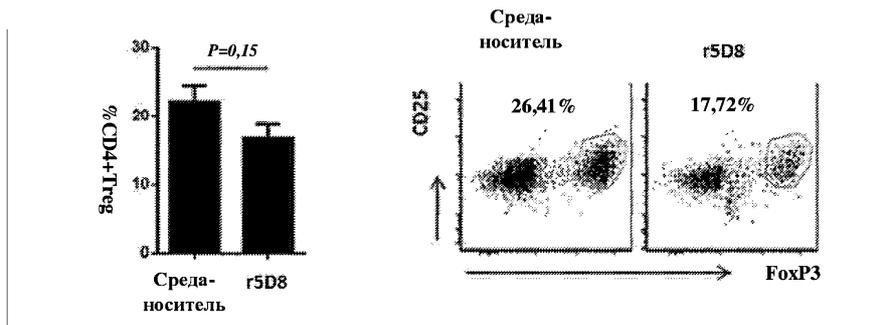
Фиг. 10D



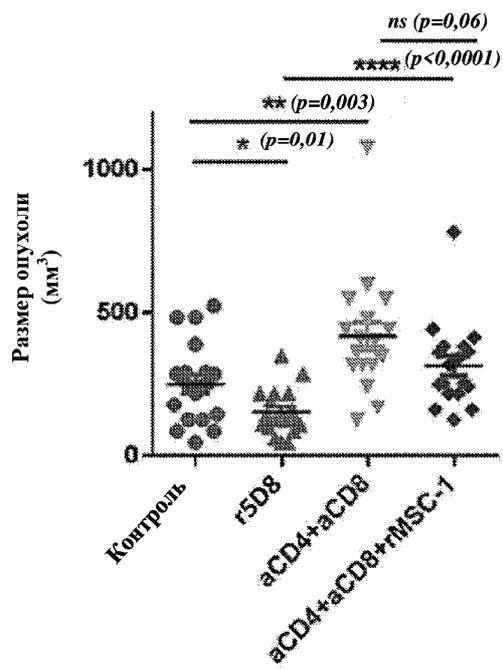
Фиг. 11А



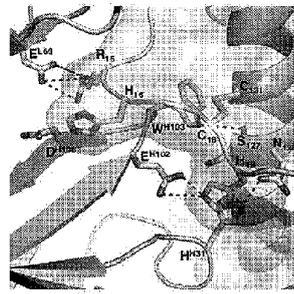
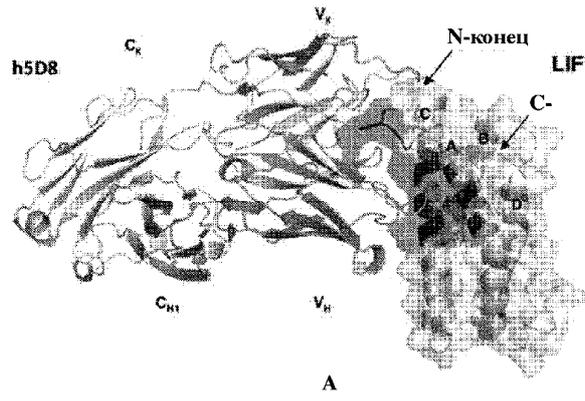
Фиг. 11В



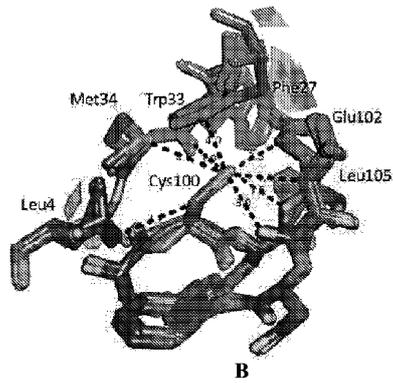
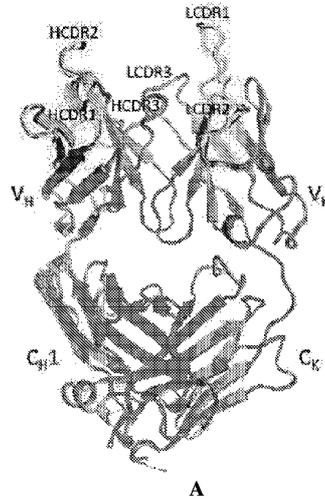
Фиг. 11С



Фиг. 12

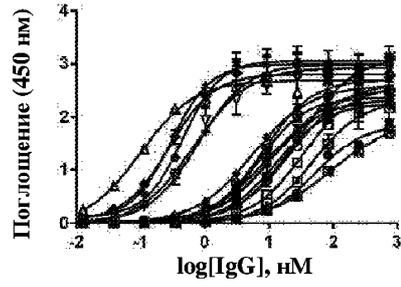


Фиг. 13А, В



Фиг. 14А, В

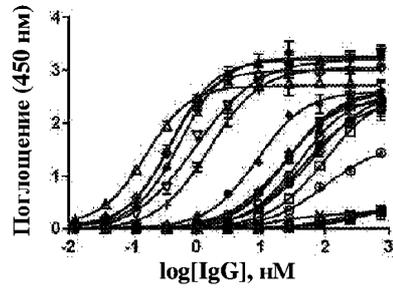
Человеческий LIF



А

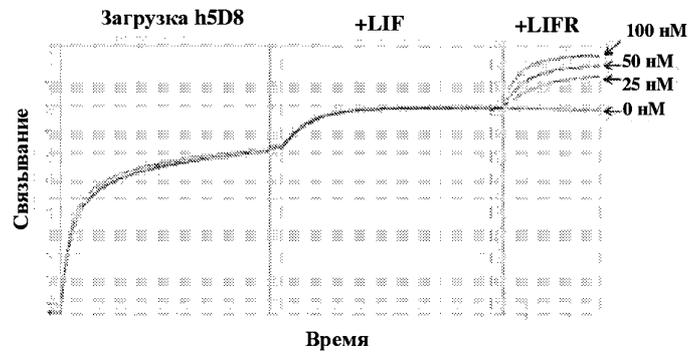
- ▲ C100
- C100Q
- C100N
- ▲ C100E
- ▼ C100D
- ◆ C100T
- ◇ C100G
- C100P
- ▽ C100A
- ◆ C100V
- ▲ C100L
- ◆ C100I
- ◆ C100M
- ◆ C100F
- ◆ C100Y
- C100W
- ◆ C100H
- C100K
- ◆ C100R

Мышиный LIF

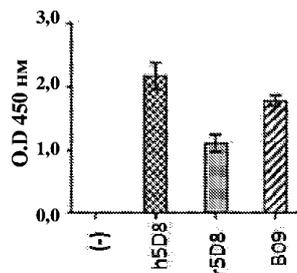


В

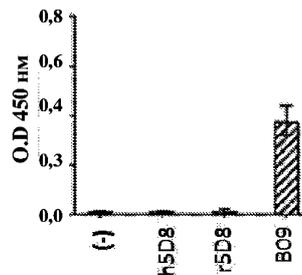
Фиг. 15А, В



А

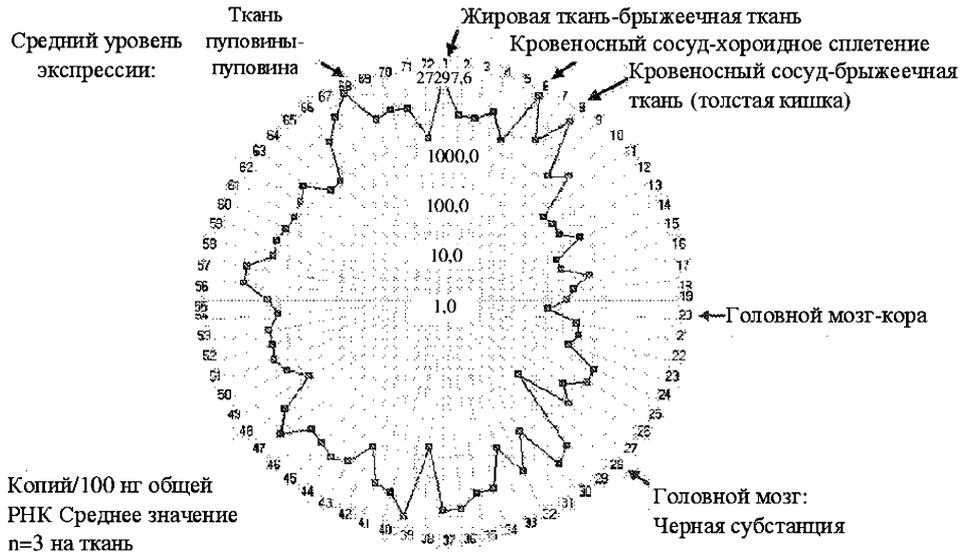


В

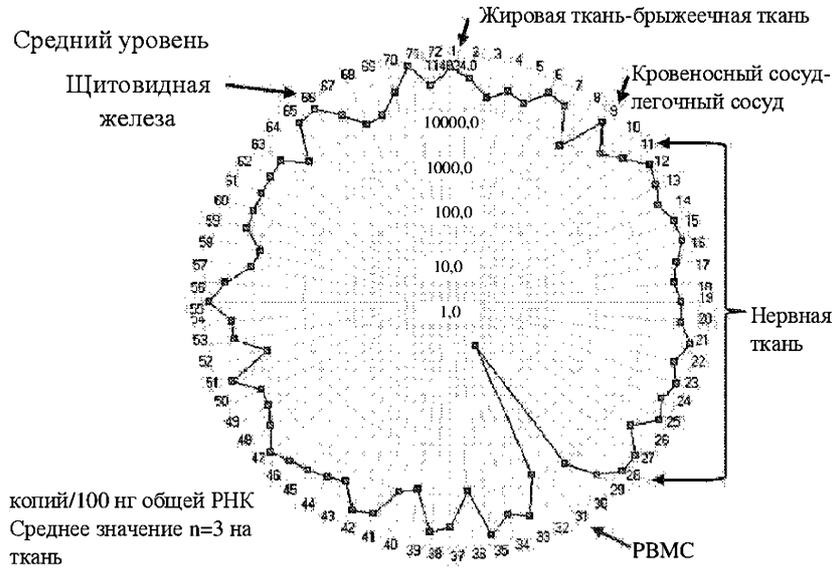


С

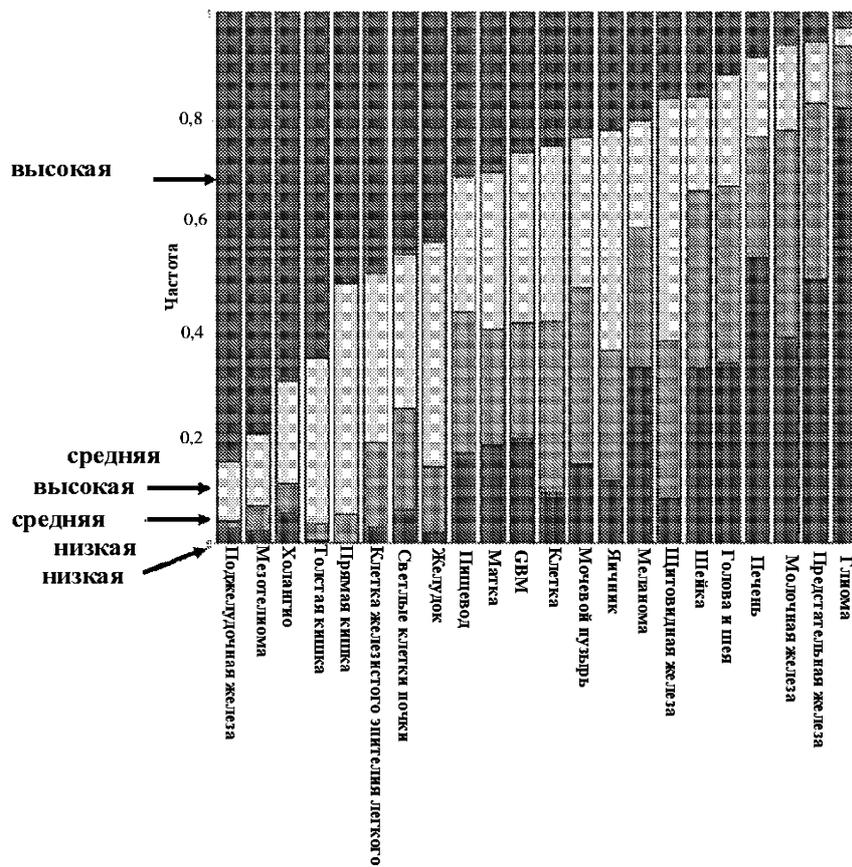
Фиг. 16А-С



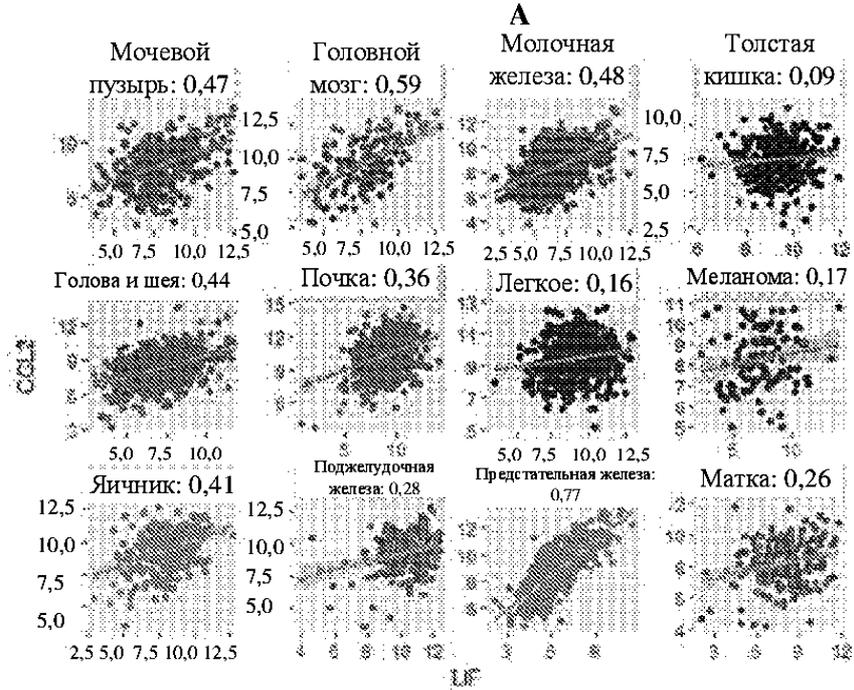
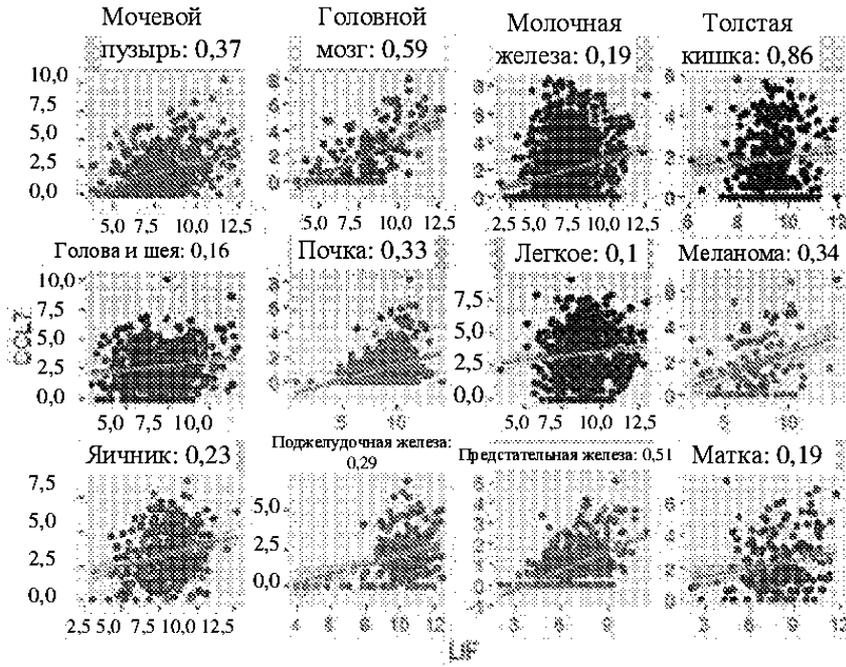
Фиг. 17А



Фиг. 17В

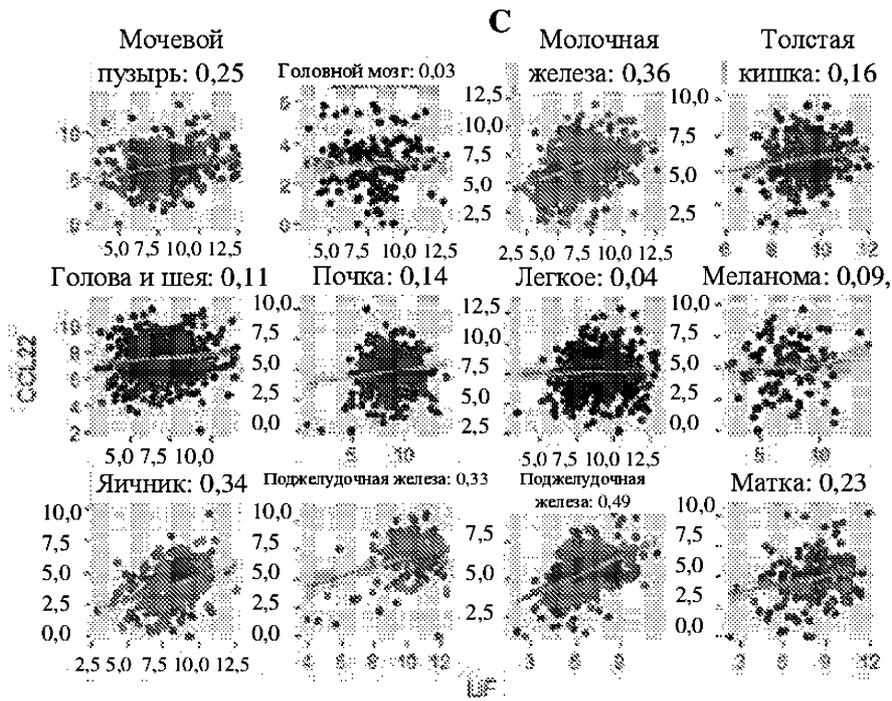
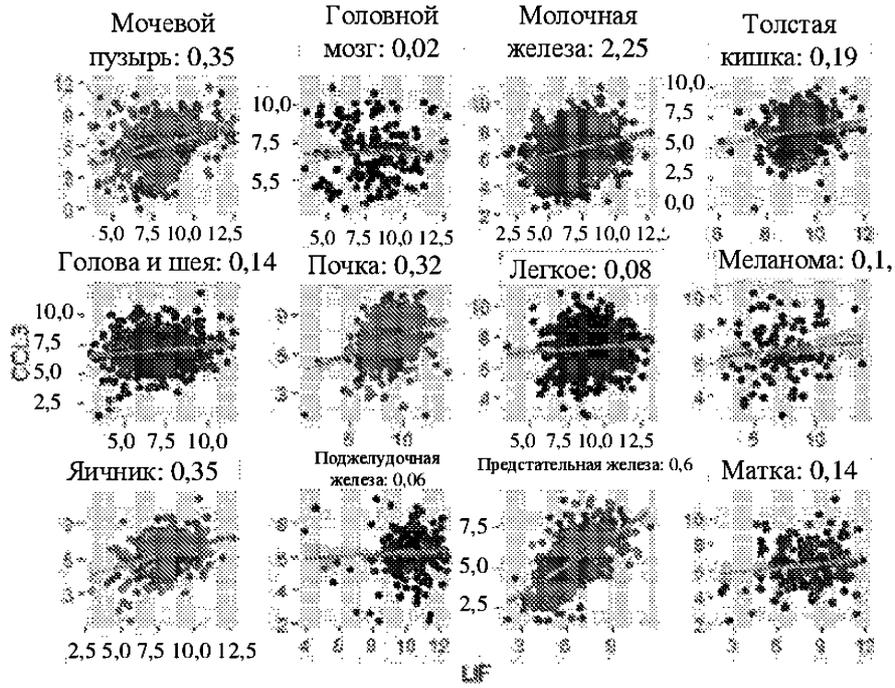


Фиг. 18

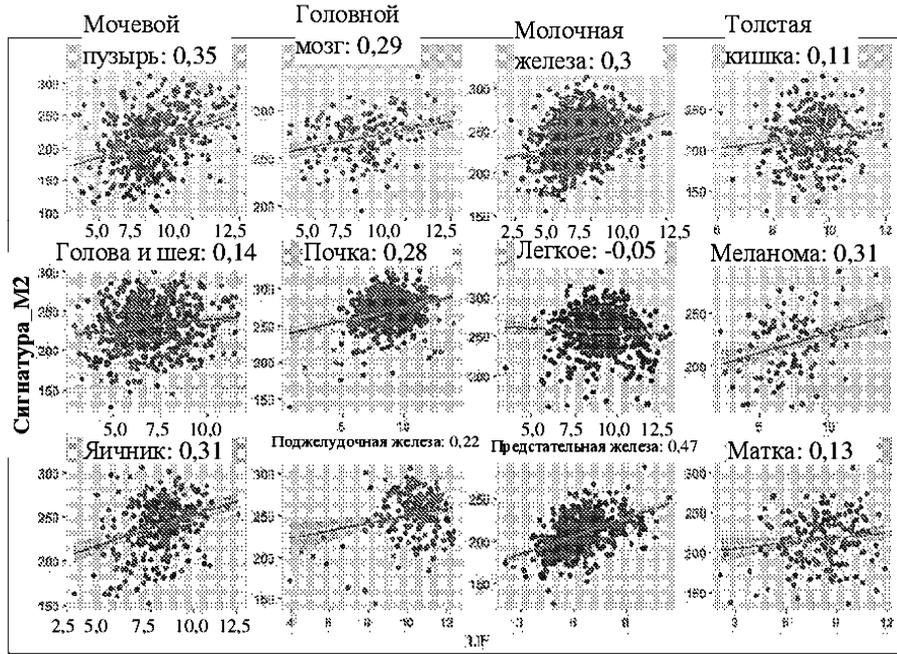


В

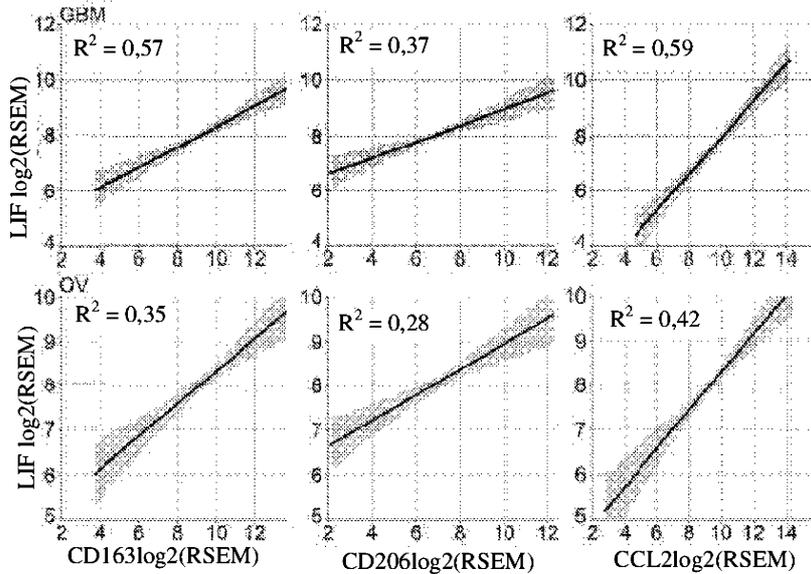
Фиг. 19А, В



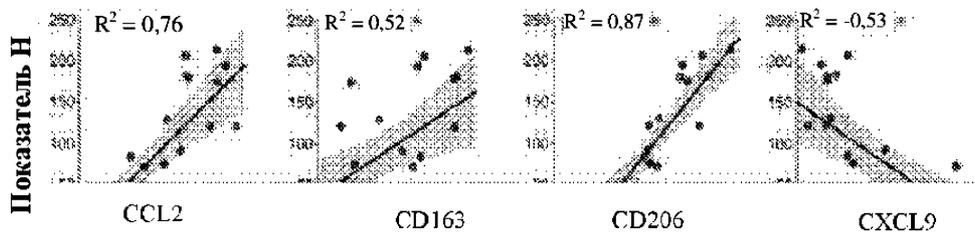
D
Фиг. 19C, D



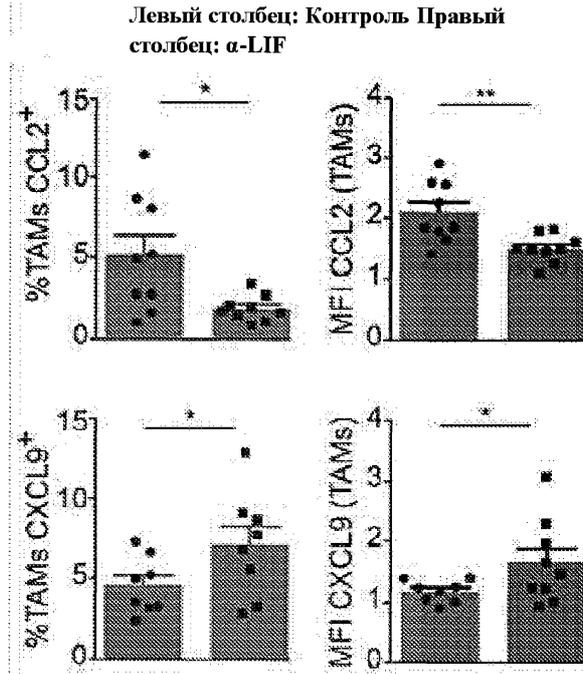
Фиг. 20А



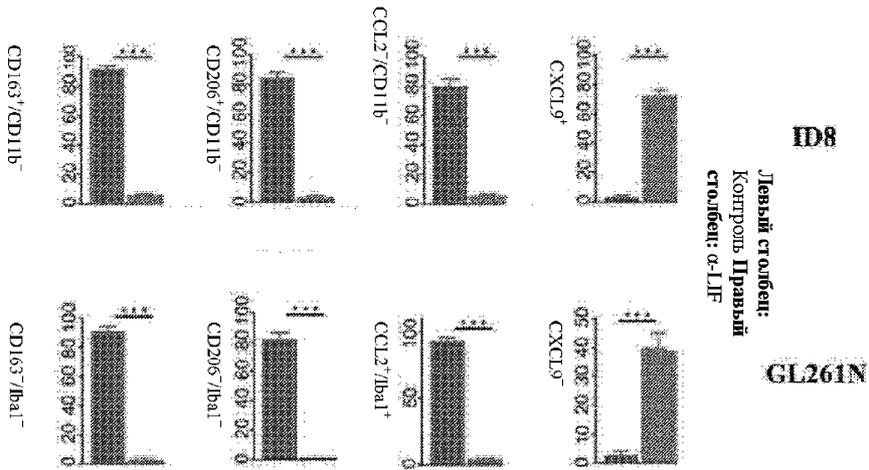
Фиг. 20В



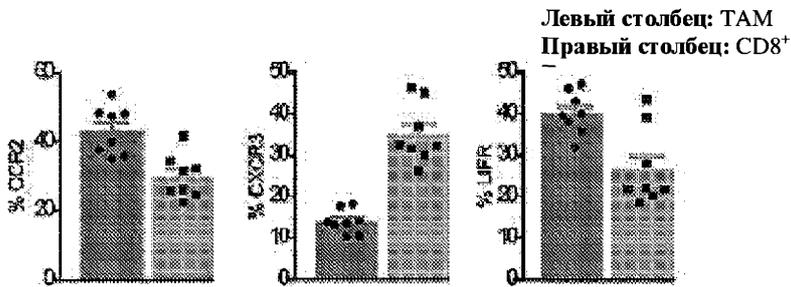
Фиг. 20С



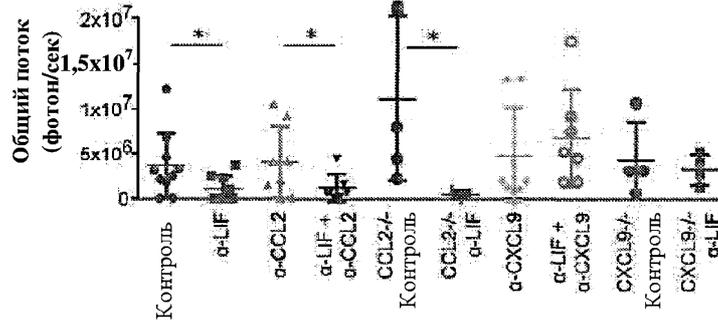
Фиг. 20D



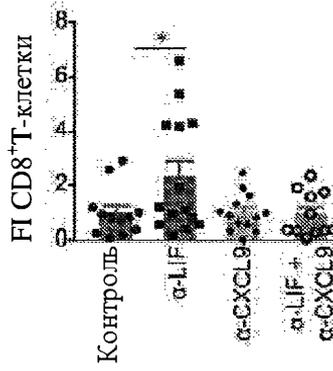
Фиг. 20E



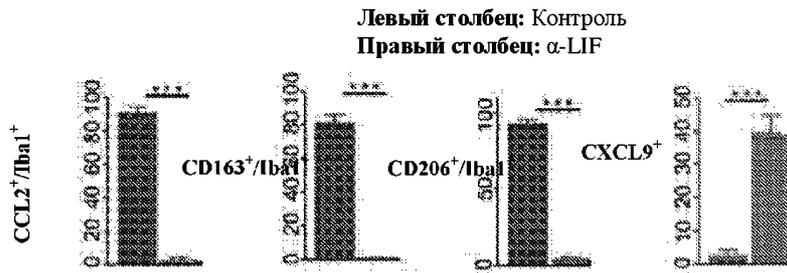
Фиг. 20F



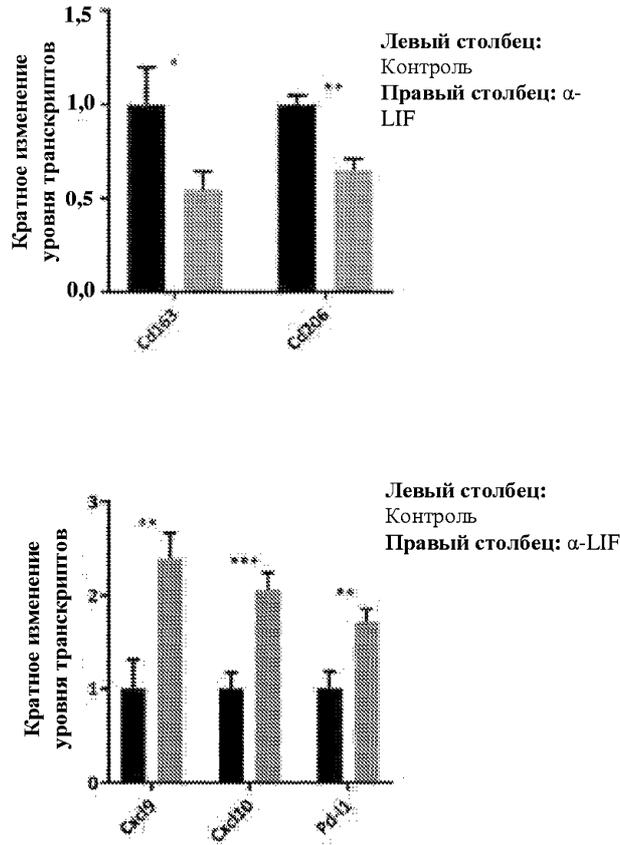
Фиг. 20G



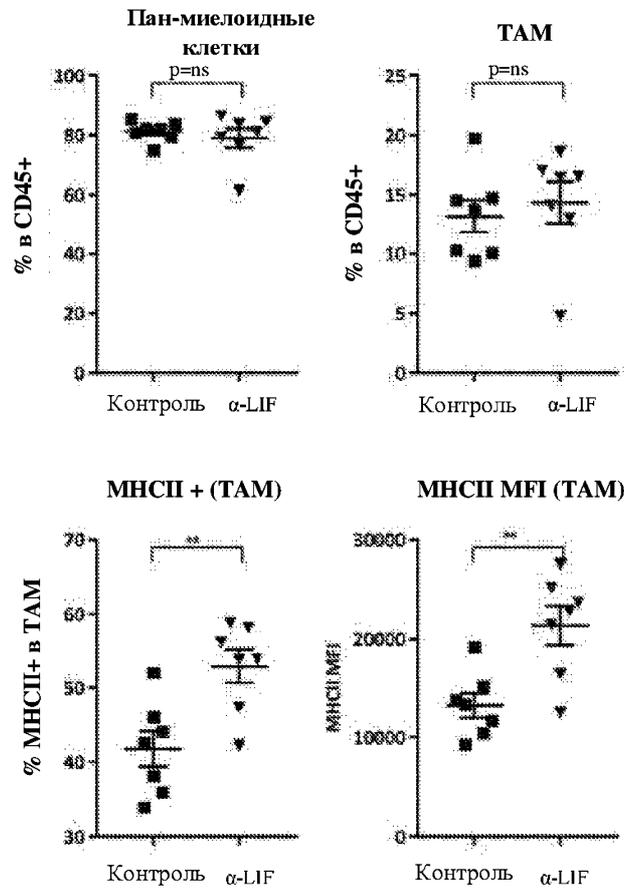
Фиг. 20H



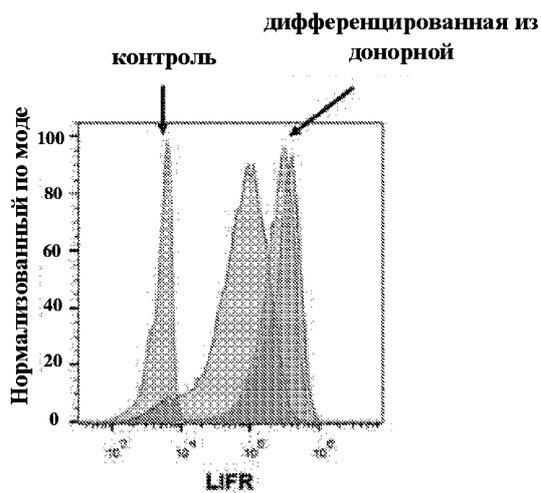
Фиг. 20I



Фиг. 20J

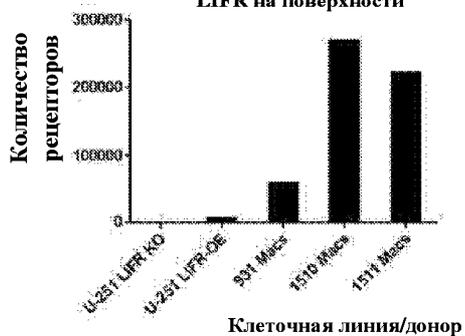


Фиг. 20K



A

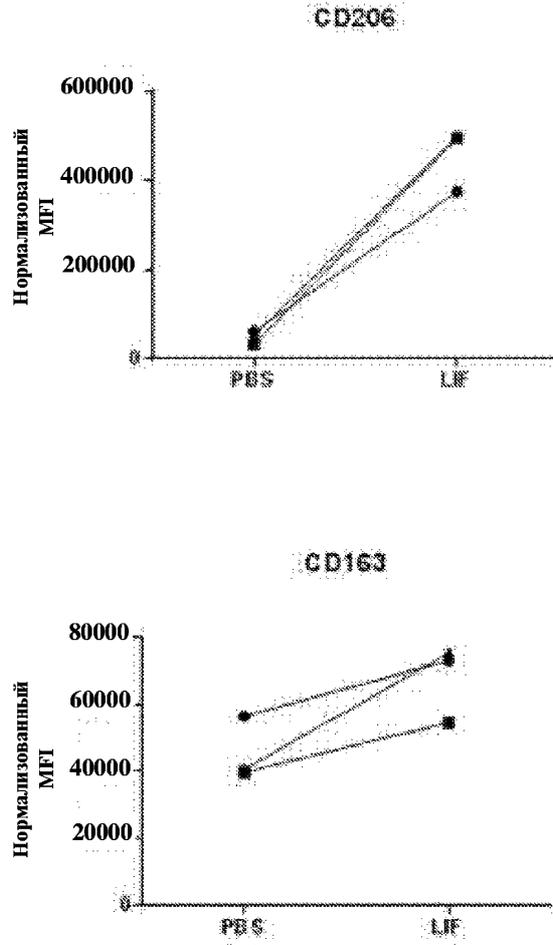
**Количественное определение
LIFR на поверхности**



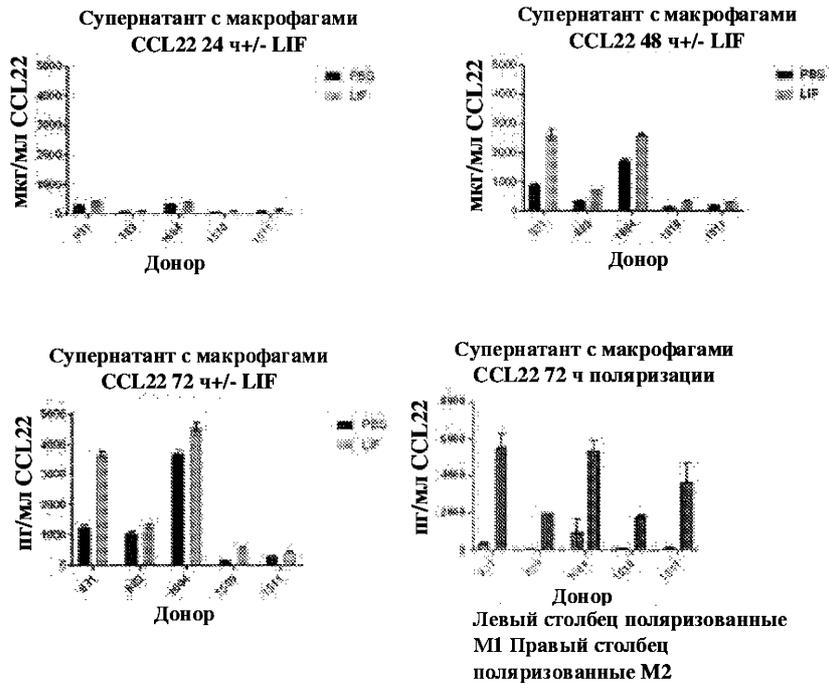
Клеточная линия/донор

B

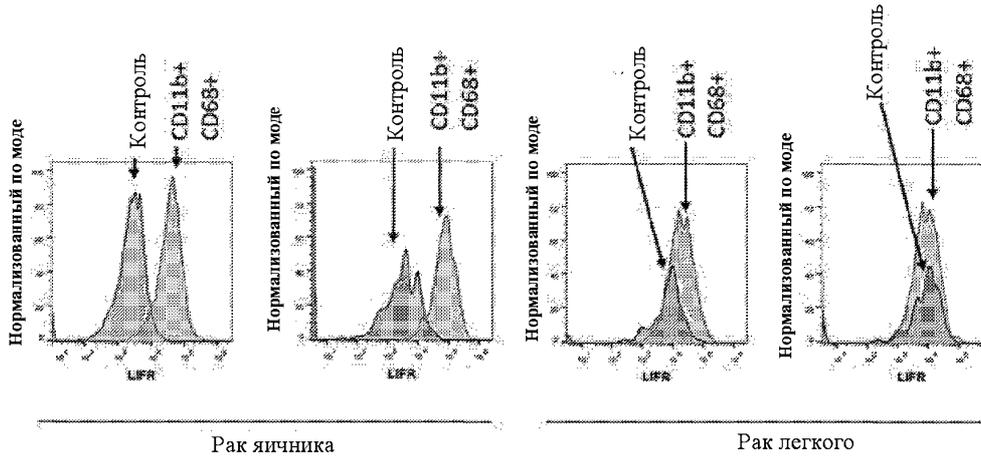
Фиг. 21А, В



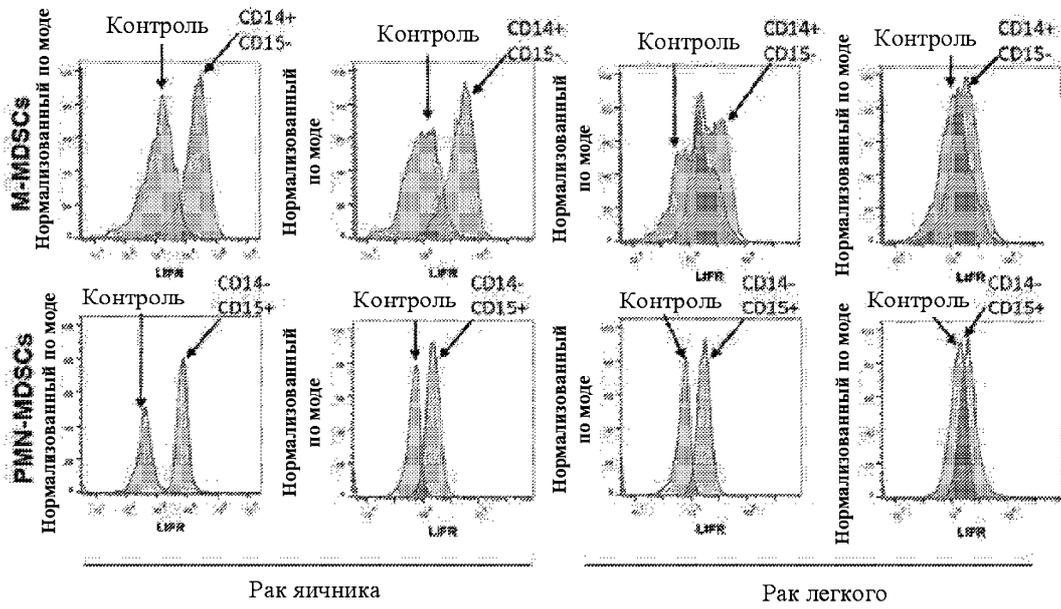
Фиг. 22



Фиг. 23



Фиг. 24



Фиг. 25

