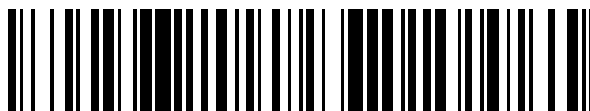


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 608 699**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.04.2011 PCT/EP2011/055253**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.10.2011 WO11124566**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2011 E 11715676 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.09.2016 EP 2556091**

54 Título: **Anticuerpo que reconoce el factor inhibidor de la leucemia humana (LIF) y uso de anticuerpos anti-LIF en el tratamiento de enfermedades asociadas a una proliferación celular no deseada**

30 Prioridad:
05.04.2010 EP 10380049

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.04.2017

73 Titular/es:
**FUNDACIÓ PRIVADA INSTITUCIÓ CATALANA DE RECERCA I ESTUDIS AVANCATS (50.0%)
Passeig Lluís Companys 23
08010 Barcelona, ES y
FUNDACIO PRIVADA INSTITUT D'INVESTIGACIO ONCOLOGICA DE VALL D'HEBRON (VHIO) (50.0%)**

72 Inventor/es:
**SEOANE SUAREZ, JOAN;
ANIDO FOLGUEIRA, JUDIT y
SAEZ BORDERIAS, ANDREA**

74 Agente/Representante:
ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 608 699 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo que reconoce el factor inhibidor de la leucemia humana (LIF) y uso de anticuerpos anti-LIF en el tratamiento de enfermedades asociadas a una proliferación celular no deseada

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere, en general, a una línea celular híbrida (hibridoma de linfocitos) para la producción de anticuerpos monoclonales que reconocen el factor inhibidor de la leucemia humana (LIF), a una población homogénea de dichos anticuerpos y al uso de dichos anticuerpos para el tratamiento de cánceres y, más particularmente, del glioma.

10

Estado de la técnica

15 El factor inhibidor de la leucemia (LIF) es una citocina de tipo interleucina 6 (IL-6) que está implicada en diversas actividades biológicas y tiene efectos sobre diferentes tipos celulares. El LIF humano es un polipéptido de 202 aminoácidos

20 El LIF es una importante molécula de señalización; en particular, desempeña un papel en las enfermedades asociadas a la proliferación celular indeseada, tales como varios tipos de tumores. La capacidad de autorrenovación de algunas células tumorales se puede incrementar mediante la inducción de LIF o Sox2 (Ikushima et al., *Cell Stem Cell*, 5:504-514, 2009; Penuelas et al., *Cancer Cell*, 15:315-327, 2009). El LIF también se ha implicado en otras actividades fisiológicas, tales como la inhibición de la implantación de blastocistos (Sengupta et al., 2006, *Contraception*, 74, 419-425) y la diferenciación de los melanocitos epidérmicos (Hirobe, 2002, *J. Cell. Phys.*, 192:315-326).

25

30 En tumores, las células iniciadoras del cáncer (CIC) son una subpoblación celular que tiene las características de las células madre normales, muestran una autorrenovación sostenida y pueden generar tumores secundarios que reproducen las características y la diversidad celular del tumor original. Se considera que las CIC son responsables del inicio, la propagación, la recurrencia y la quimio- y radiorresistencia de los tumores (Bao et al., *Nature*, 444:7756-760, 2006; Dick, *Blood*, 112:4793-4807, 2008; Gupta et al., *Nat. Methods*, 15:1010-1012, 2009; Visvader y Lindeman, *Nat. Rev. Cancer*, 8:755-768, 2008; Zhou et al., *Nat. Rev. Drug Discov.* 8:806-823, 2009). Todas estas características indican que las CIC son dianas terapéuticas críticas y que la comprensión de la biología de las CIC es crucial para mejorar los tratamientos anti-cancerosos. Se ha demostrado la utilidad de varios marcadores de superficie celular, incluidos CD133 y CD44, para el aislamiento de subpoblaciones de células enriquecidas para las CIC (Visvader y Lindeman, *Nat. Rev. Cancer*, 8:755-768, 2008) en diferentes tipos de tumores.

35

40 Es glioma es el tumor más habitual del cerebro. La forma más agresiva de glioma, el glioma de grado IV, también denominado glioblastoma (GBM), es uno de los cánceres más mortales con una mediana de la supervivencia de aproximadamente 14 meses (Stupp et al., *N. Engl. J. Med.*, 352:987-996, 2005). A pesar del progreso en los conocimientos sobre los mecanismos moleculares implicados en la génesis y progresión del glioma, el pronóstico y el tratamiento de este tipo de tumor siguen siendo ineficaces. Las células iniciadoras de glioma (CIG) se caracterizan por su elevado potencial oncogénico, su capacidad de autorrenovación y su capacidad para diferenciarse en múltiples líneas celulares. El número de células de tipo madre en un tumor está regulado por su capacidad de autorregeneración. Las CIG y, en general, las células madre del cáncer, experimentan divisiones simétricas y asimétricas por medio de las cuales una célula madre genera dos copias idénticas de la misma o una copia de la célula madre y una célula más diferenciada (división asimétrica). La capacidad de autorregeneración de la célula madre del cáncer está regulada por el equilibrio entre las divisiones simétricas y asimétricas y es muy probable que la alteración de la regulación de los mecanismos que controlan dicha autorrenovación esté implicada en el inicio del tumor.

40

45

50 Se considera que las CIG son responsables del inicio, la propagación y la recurrencia de los tumores, lo que indica que las terapias más eficaces procederán de las terapias dirigidas a la compartimentalización de las células madre de glioma. Un tumor no se erradicará si no se eliminan las CIG.

50

55 La vía de señalización del TGF β (factor de crecimiento transformante beta) está implicada en la regulación de muchas actividades celulares, tales como la proliferación y la diferenciación celular, a través de la regulación de un gen diana. La familia de citocinas del TGF β comprende los propios TGF β (p. ej., TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3), activinas y proteínas morfogénicas óseas. Los miembros de la familia de TGF β actúan a través de la activación de los receptores de serina/treonina quinasa en la superficie de la célula, lo cual desencadena vías de señalización intracelular que implican al efector posterior SMAD que, tras su activación, se transfiere directamente al núcleo y activa la transcripción. Se ha demostrado que el TGF β puede aumentar la capacidad de autorrenovación de las CIG mediante la inducción de LIF o Sox2 (Ikushima et al., *Cell Stem Cell*, 5:504-514, 2009; Penuelas et al., *Cancer Cell*, 15:315-327, 2009). El importante papel del TGF β en la señalización del cáncer (Massague, *Cell*, 134:215-230, 2008) ha promovido el desarrollo clínico de estrategias anticancerosas basadas en el diseño de compuestos inhibidores contra el TGF β (Seoane et al., *Clin. Transl. Oncol.*, 10:14-19, 2008; Yingling et al., *Nat. Rev. Drug Discov.*, 3:1011-1022, 2004). En el glioma, la elevada actividad de TGF β confiere un peor pronóstico en los pacientes (Bruna et al., *Cancer Cell*, 11:147-160, 2007) y muestra una respuesta oncogénica diversa que incluye la inducción de la angiogénesis, inmunosupresión, invasión

60

65

celular y proliferación celular (Bruna et al., *Cancer Cell*, 11:147-160, 2007; Rich, *Front. Biosci.* e245-260, 2003). Los miembros de la familia del TGF β regulan la expresión de los inhibidores de la proteína 1 de unión a ADN (Id1). Los inhibidores de las proteínas de unión a ADN (Id) son factores de transcripción que regulan el ciclo celular y la diferenciación celular y tienen un importante papel en el control de la autorrenovación de las células madre (Perk et al., *Nat. Rev. Cancer*, 5:603-614, 2005; Ying et al., *Cell*, 115:281-292, 2003). En las células epiteliales normales, el TGF β reprime y BMP induce la transcripción de Id1 (Massague, *Cell*, 134:215-230, 2008). No obstante, en las células endoteliales y algunas células tumorales, el TGF β es capaz de inducir la expresión de Id1 (Goumans et al., *EMBO J.*, 1743-1753, 2002; Padua et al., *Cell*, 133:66-77, 2008). La Id1 se expresa en las células madre neurales adultas de tipo B1 que tienen un papel importante en la regulación de la capacidad de autorrenovación de estas células (Nam y Benezra, *Cell Stem Cell*, 5:515-526, 2009). En el cáncer, la Id1 se encuentra regulada por incremento en varios tumores (Perk et al., *Cancer Res.*, 2006:10870-10877, 2006) y se ha descrito que está implicada en las metástasis (Gupta et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104:19506-19511, 2007)

El tratamiento de elección para el glioma es la intervención quirúrgica. No obstante, el tratamiento quirúrgico suele acompañarse de un tratamiento adyuvante farmacológico o mediante radioterapia. Los fármacos de elección para el tratamiento del glioma incluyen la combinación denominada PCV, que comprende procarbazona, CCNU (lomustina) y vincristina, temozolomida en combinación con radioterapia.

Por tanto, es necesario disponer de tratamientos alternativos que prevengan los inconvenientes de los tratamientos conocidos en la técnica y que puedan eliminar las CIG con eficiencia.

En los documentos US 5.654.157A, US 5.654.157, Kim *et al.*, (*J. Immunol. Meth.*, 156:9-17, 1992), Alphonso *et al.*, (*J. Leukocyte Biology (Abstracts del 28 Congreso Nacional de la Sociedad de Biología Leucocitaria, vol. 0, n° SP.2 (1991) (NY, N.E., p. 49) (Mabs D4.16.9, D25.1.4 y D62.3.2), Sengupta et al., (Contraception 74:419-425, 2010) se describen varios anticuerpos específicos del LIF. No obstante, las regiones antigénicas dentro de la proteína LIF a las que se unen estos anticuerpos no se han caracterizado con detalle. Además, no se ha divulgado el uso de estos anticuerpos para el tratamiento del cáncer, en particular del glioma y, más particularmente, el glioblastoma. Como sabrá el experto a partir de otros ejemplos en la técnica, la unión de un anticuerpo a una región o epítipo concreto del antígeno puede ser decisiva para el éxito de una terapia. Por ejemplo, se conocen varios anticuerpos anti-HER2, de los que solo uno, el trastuzumab, se ha demostrado que es particularmente útil para el tratamiento del cáncer de mama.*

Godard et al. (*Cytokine* 1993, 5(1): 16-23) desvela la generación de una serie de anticuerpos monoclonales específicos para LIF y el efecto de dichos anticuerpos sobre la proliferación de la línea celular linfoblástica murina DA-1a.

Kellokumpu-Lehtinen et al. (*International Journal of Cancer* 1996, 66(4):515-519) estudian el efecto de LIF sobre la proliferación de diferentes líneas de células cancerosas, incluyendo células cancerosas de mama, riñón y próstata.

El documento WO93/23556A1 desvela un anticuerpo anti-LIF D25.1.4 que bloquea la unión de LIF a su receptor.

Ravandi y Estrov (*Cancer Metastasis Biology and Treatment Growth Factors and Their Receptors in Cancer Metastasis* 2004, 2(1): 1-25) revisan el papel de LIF en el cáncer y en metástasis de cáncer.

Decker et al. (*Neuro-Oncology* 2009, página 578) desvelan el efecto de la pérdida de función de CD44 sobre la progresión del glioma, demostrando que CD44 acelera el desarrollo del glioma y la cinética de crecimiento.

Sumario de la invención

En un primer aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal o a un fragmento del mismo, que reconoce el LIF humano de longitud completa, pero no reconoce un fragmento de LIF que corresponde a los aminoácidos 1 a 160, donde el anticuerpo se produce por la línea celular de hibridoma DSM ACC3054, depositada el 1 de abril de 2010 por el Vall d'Hebron Institute of Oncology en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.

En otro aspecto, la invención se refiere a la línea celular de hibridoma DSM ACC3054, depositada el 1 de abril de 2010 por el Vall d'Hebron Institute of Oncology en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.

En otro aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal o a un fragmento del mismo de acuerdo con el primer aspecto, o a una composición farmacéutica que comprende dicho anticuerpo o fragmento del mismo para uso en el tratamiento de cánceres.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con el primer aspecto, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la invención se refiere a un reactivo inmunoanalítico usado en la medición del LIF humano, que comprende el anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo de acuerdo con el primer aspecto.

En otro aspecto, se desvela un método *in vitro* para el diagnóstico de enfermedades asociadas a la proliferación celular no deseada en un sujeto o para determinar la predisposición de un sujeto a sufrir dicha enfermedad asociada a la proliferación celular no deseada, o para determinar el estadio o gravedad de dicha enfermedad asociada a la proliferación celular no deseada en un sujeto, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un sujeto con dicha enfermedad asociada a la proliferación celular no deseada, que comprende cuantificar los niveles de LIF o de una variante funcionalmente equivalente del mismo o de cualquier combinación de estas moléculas en una muestra biológica de dicho sujeto. En otro aspecto, se desvela el uso de un kit que comprende reactivos para la cuantificación de los niveles de expresión de LIF o de una variante funcionalmente equivalente del mismo o de cualquier combinación de estas moléculas para el diagnóstico de cáncer en un sujeto o para determinar la predisposición de un sujeto a sufrir dicho cáncer, o para determinar el estadio o gravedad de dicho cáncer en un sujeto, o para predecir la probabilidad de supervivencia o de la esperanza de vida prevista promedio de un sujeto que sufre dicho cáncer, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un sujeto con dicho cáncer, en el que si los reactivos detectan un incremento en la expresión de LIF o de una variante funcionalmente equivalente del mismo o de cualquier combinación de estas moléculas con respecto a una muestra control, dicho sujeto puede sufrir una enfermedad asociada a la proliferación celular no deseada o presenta una mayor predisposición a sufrir dicha enfermedad asociada a la proliferación celular no deseada, o presenta mayor gravedad de dicha enfermedad, o la terapia administrada no está siendo eficaz.

En otro aspecto, se desvela un método *in vitro* para el pronóstico de la esperanza de vida promedio de pacientes que sufren enfermedades asociadas a una proliferación celular no deseada, que comprende cuantificar los niveles de LIF o de una variante funcionalmente equivalente del mismo o de cualquier combinación de estas moléculas en una muestra biológica de dicho sujeto.

Dibujos

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: el anticuerpo anti-LIF (α -LIF) se une al dominio en C-terminal de la proteína LIF humana comprendido en los aminoácidos 160 a 202.

(A) Esquema que muestra la estructura secundaria del gen LIF y deleciones secuenciales realizadas en la proteína de fusión LIF-EGFP. (B) Se transfectaron células 293T con las construcciones indicadas. Tras 48 horas, las células se lisaron e inmunoprecipitaron con 1 μ g del anticuerpo anti-LIF durante la noche a 4 °C. Después, se añadió la proteína A/G a los lisados y se eluyeron los inmunoprecipitados. Los fragmentos de LIF se detectaron mediante inmunotransferencia usando un anticuerpo anti-EGFP. (C) Esquema que muestra el dominio de unión al anticuerpo anti-LIF.

Figura 2: el anticuerpo anti-LIF bloquea la inducción de Phospho-Stat3 por el LIF en la línea celular de glioma U373 y los niveles basales de Phospho-Stat3 en neuroesferas de GBM derivadas del paciente.

A) Se trataron células U373 con o sin LIF recombinante humano durante 15 minutos en presencia o ausencia del anticuerpo monoclonal indicado y se determinaron los niveles de Phospho-Stat3 y de tubulina mediante transferencia de Western. Como control se usaron IgG del mismo isotipo. B) Las neuroesferas de GBM se disgregaron y se dejaron sin tratar o se incubaron durante la noche en presencia de anticuerpo monoclonal anti-LIF o IgG control de isotipo y los niveles de Phospho-Stat3 y tubulina se determinaron mediante transferencia de Western.

Figura 3: Las neuroesferas de GBM derivadas del paciente contienen un compartimento celular CD44^{alto}/Id1^{alto}

Se realizó un análisis FACS de los niveles de CD44 en neuroesferas de GBM (Figura 3A). Se muestra la tinción con el isotipo control. Las neuroesferas de GBM se clasificaron mediante FACS de acuerdo con los niveles de CD44 y se determinaron los niveles del transcrito *CD44*, *ID1*, *ID2* e *ID3* mediante cRT-PCR y análisis de transferencia de Western (Figura 3B y 3C).

Figura 4: La población CD44^{alto}/Id1^{alto} en las neuroesferas de GBM está enriquecida para las células iniciadoras de glioma.

(A) Se realizó un análisis FACS de los niveles de CD44 en neuroesferas de GBM1 cultivadas en presencia o ausencia de FBS al 10 % durante 10 días. (B) Las células GBM1 se clasificaron de acuerdo con los niveles de CD44 y se sembró un ensayo de formación de neuroesferas. Tras 7 días, se determinó el número de neuroesferas. (C, D y E) Las células de neuroesfera se clasificaron de acuerdo con los niveles de CD44 y el número indicado de células se inoculó en el cerebro de ratones inmunocomprometidos. (C) Cuarenta días tras la cirugía, se obtuvieron imágenes de la totalidad del cerebro de los ratones a los que se inocularon 10⁵ células mediante IRM (las flechas indican tumores). (D) Se muestra la incidencia del tumor. (E) Se realizó inmunohistoquímica de las proteínas indicadas y tinción con H y E de los tumores.

Figura 5: El anticuerpo anti-LIF disminuye los niveles de la población CD44^{alto}/Id1^{alto} en neuroesferas de GBM.

Las neuroesferas de GBM se disociaron y cultivaron en presencia de anticuerpo monoclonal anti-LIF o IgG control de isotipo durante 7 días en presencia de (A) o en ausencia de (B) EGF y FGF. Las células se tiñeron con anticuerpo monoclonal anti-CD44-FITC en presencia de yoduro de propidio para excluir las células muertas y las proporciones de las células ricas en CD44 se determinaron mediante FACS.

5 Figura 6: el anticuerpo anti-LIF disminuye los niveles de CD44 e Id1 en neuroesferas de GBM derivadas de paciente.

Las neuroesferas de GBM se disociaron y cultivaron en presencia de anticuerpo monoclonal anti-LIF o IgG control de isotipo durante 7 días en ausencia de EGF y FGF y los niveles de ARNm de los genes indicados se analizaron mediante cRT-PCR. El GAPDH se usó como control de normalización interno.

10 Figura 7: El tratamiento *in vivo* con el anticuerpo anti-LIF disminuye el compartimento celular CD44^{alto}/Id1^{alto}

15 (A) Esquema que muestra el procedimiento experimental. (B) Se inocularon neuroesferas de GBM en el cerebro de ratones inmunocomprometidos. 30 días después de la inoculación, se generó un tumor y, cuando se consiguió la formación del tumor, se trató a los ratones con PBS o 500 µg de anticuerpo monoclonal anti-LIF cada 3 días durante 10 días. Los cerebros de los ratones se disociaron y las células tumorales humanas se aislaron clasificando las células positivas para MHC-I. Los niveles de expresión del ARNm de ID1 y CD44 se determinaron mediante cRT-PCR. El GAPDH se usó como control de normalización interno.

Figura 8. Los niveles de ARNm de LIF de los pacientes de glioma están asociados a la esperanza de vida promedio.

25 Curvas de Kaplan-Meier que muestran que la supervivencia global de los pacientes de glioma con niveles de ARNm de LIF regulados por aumento por más de 2 es significativamente menor que en el resto de los pacientes ($p = 7,2E-8$) mediante la prueba del orden logarítmico. Datos obtenidos del programa REpository for Molecular BRAIn Neoplasia DaTa (REMBRANDT) del National Cancer Institute.

Figura 9. Los niveles de ARNm de LIF de los pacientes de glioblastoma (GBM) están asociados a la esperanza de vida promedio.

30 Curvas de Kaplan-Meier que muestran que la supervivencia global de los pacientes de GBM con niveles de ARNm de LIF regulados por aumento por más de 9 es significativamente menor que en el resto de los pacientes ($p = 6,9E-4$) mediante la prueba del orden logarítmico. Datos obtenidos del programa REpository for Molecular BRAIn Neoplasia DaTa (REMBRANDT) del National Cancer Institute.

35 Descripción Detallada de la Invención

Anticuerpos de acuerdo con la presente invención

40 Los autores de la presente invención han generado un anticuerpo monoclonal nuevo dirigido contra el factor inhibidor de la leucemia humana (LIF).

45 Por tanto, en un primer aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal o a un fragmento del mismo, que reconoce el LIF humano de longitud completa, pero no reconoce un fragmento de LIF que corresponde a los aminoácidos 1 a 160, en el que el anticuerpo se produce por la línea celular de hibridoma DSM ACC3054, depositada el 1 de abril de 2010 por el Vall d'Hebron Institute of Oncology en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, donde las moléculas de anticuerpo individuales que constituyen la población son esencialmente idénticas en afinidad y especificidad excepto por cualquier posible mutación natural que pueda estar presente en cantidades minoritarias.

50 El anticuerpo monoclonal es una población homogénea de anticuerpos específicos por un solo epítipo del antígeno. En la presente invención, la expresión "anticuerpo monoclonal" debe interpretarse en sentido amplio e incluye anticuerpos multiespecíficos y fragmentos de los mismos (F(ab')₂, Fab), etc. con la condición de que sean capaces de reconocer específicamente el LIF. Los fragmentos del anticuerpo monoclonal en el sentido de la presente invención pueden, como ejemplos no limitantes, incorporarse en anticuerpos recombinantes, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos etc.

60 Un anticuerpo quimérico es un anticuerpo monoclonal construido por medio de la clonación o recombinación de anticuerpos de diferentes especies animales. En una configuración típica, aunque no limitante de la invención, el anticuerpo quimérico incluye parte del anticuerpo monoclonal en el sentido de la presente invención, generalmente el fragmento variable (Fv) que incluye los sitios para reconocimiento y unión del antígeno, y la otra parte que corresponde a un anticuerpo humano, incluyendo generalmente la parte la región constante y la región constante adyacente.

65 Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo monoclonal construido por medio de la clonación e injerto de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) hipervariables del anticuerpo monoclonal murino en el sentido de la

presente invención en un anticuerpo humano en sustitución de las regiones CDR hipervariables de dicho anticuerpo humano.

Un "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, puede significar un anticuerpo monoclonal completamente humano. Dicho anticuerpo humano es un anticuerpo que puede ser producido por ratones modificados genéticamente, los denominados ratones transgénicos, que se habían modificado para producir anticuerpos humanos. Lonberg y Huszar (Int. Rev. Immunol., 1995; 13(1):65-93), por ejemplo, basándose en una tecnología descrita primero por McCafferty et al., (1990, Nature 348 (6301): 552-554) describieron una técnica para obtener anticuerpos humanos a partir de ratones.

Además, en el contexto de la presente invención, el término "anticuerpo" también incluye variantes con un patrón de glicosilación alterado, así como fragmentos de anticuerpos glicosilados o no glicosilados, obtenidos de la proteína o por medio de tecnología recombinante, que puede consistir en (i) zonas variables de los anticuerpos unidos unos a otros por un péptido de unión (scFv), (ii) la zona variable junto con la región constante CH1 de la cadena pesada (Fd) unida a la cadena ligera por medio de cisteínas o por medio de péptidos de unión y de puentes disulfuro (scFab), (iii) nuevas variantes, tales como cadenas pesadas sencillas o (iv) cualquier modificación realizada en los fragmentos de anticuerpo con el fin de hacerlos más similares, menos inmunogénicos (humanizados) o más estables en los fluidos biológicos y que, en el contexto de la presente invención, tienen la capacidad para evitar la función (actividad) del HF, es decir, inducir la activación de la vía de señalización JAK-STAT.

Como entenderá el experto en la materia, las variantes del anticuerpo en el sentido de la presente invención se pueden obtener por medio de ingeniería genética convencional o de técnicas recombinantes, técnicas de producción de anticuerpos, técnicas para la extracción y purificación de fluidos o tejidos biológicos, o mediante cualquier otra técnica convencional para obtener proteínas y anticuerpos que son ampliamente conocidas por el experto en la materia. Son ejemplos ilustrativos y no limitantes de las técnicas: por medio de técnicas de ingeniería genética podrían rediseñarse y expresarse en vectores diseñados para la producción de anticuerpos recombinantes de diferentes tamaños, composición y estructura. Se puede encontrar una revisión de los métodos principales para la producción y purificación de anticuerpos en, por ejemplo:

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

En el sentido de la invención actual, se requiere la región comprendida por los aminoácidos 160 a 202 del LIF humano para el reconocimiento del LIF o un fragmento del mismo por dicho anticuerpo monoclonal (Figura 1).

Los autores de la presente invención han generado una línea celular de hibridoma productora de un anticuerpo que reconoce el LIF humano. Dicho anticuerpo es para el isotipo IgG 1. Este anticuerpo reconoce un fragmento del LIF no comprendido en el tramo de restos de aminoácidos 1 a 160. Por lo tanto, en otra realización, la invención se refiere a una línea celular de hibridoma que produce dicho anticuerpo. Una línea celular de hibridoma con el número de acceso DSM ACC3054 productora de dicho anticuerpo se ha depositado el 1 de abril de 2010 por el Vall d'Hebron Institute of Oncology en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. Por tanto, la línea celular de hibridoma con el número de acceso DSM ACC3054 está comprendida en la presente invención. Esta línea celular de hibridoma también se describe en la solicitud de patente europea 10 380 049.6.

Como entenderá el experto en la materia, los anticuerpos que se unen a epítomos solapantes o parcialmente solapantes del antígeno compiten entre sí por la unión al antígeno. El experto también entenderá que dos moléculas de anticuerpo esencialmente idénticas, tales como dos moléculas de anticuerpo monoclonal producidas por la misma línea celular de hibridoma, inhibirán de forma competitiva la unión de la otra molécula al epítipo del antígeno. Por tanto, a modo de ejemplo, la unión de una molécula de anticuerpo producida por la línea celular de hibridoma DSM ACC3054 de la presente invención inhibe de forma competitiva la unión de cualquier otra molécula de anticuerpo individual producida por la misma línea celular al LIF humano. Asimismo, inhibirá de forma competitiva la unión de cualquier otra molécula de anticuerpo de otra fuente distinta de DSM ACC3054, siempre que la otra molécula de anticuerpo, en general, sea capaz de unirse al mismo o a un epítipo solapante. Los presentes inventores han caracterizado la región del LIF que contiene el epítipo. Por lo tanto, también se desvela cualquier anticuerpo que se inhibe competitivamente en su unión al LIF humano por el anticuerpo definido anteriormente.

También se desvela el uso de dicho anticuerpo en un método inmunoanalítico, tal como transferencia de Western, inmunohistoquímica o ELISA.

Procedimientos terapéuticos de la invención

En otro aspecto, la invención se refiere al anticuerpo monoclonal o a un fragmento del mismo de acuerdo con el primer aspecto o a una composición farmacéutica que comprende dicho anticuerpo o fragmento del mismo para uso en el tratamiento de cánceres.

- 5 Los términos “cáncer” y “tumor” se refieren a la afección fisiológica en mamíferos caracterizados por la alteración de la regulación del crecimiento celular. El cáncer es una clase de enfermedad en la que un grupo de células muestran un crecimiento incontrolado o un crecimiento indeseado. El crecimiento incontrolado puede hacer que estas células puedan invadir, entrar o incluso destruir tejidos adyacentes. Las células cancerosas también se pueden extender a otras localizaciones, lo cual puede conducir a la formación de metástasis. La diseminación de las células cancerosas en el cuerpo puede producirse, por ejemplo, a través de la linfa o la sangre. El crecimiento incontrolado, la intrusión y la formación de metástasis también se denominan propiedades malignas de los cánceres. Las propiedades malignas diferencian los cánceres de los tumores benignos, que normalmente no invaden ni producen metástasis. Los compuestos de la presente invención son, sin limitaciones, útiles para el tratamiento de cánceres seleccionados del grupo de tumores de mama, corazón, pulmón, intestino delgado, colon, bazo, riñón, vejiga urinaria, cabeza, cuello, ovarios, próstata, cerebro, páncreas, piel, hueso, médula ósea, sangre, timo, útero, testículos e hígado. En particular, los tumores que se pueden tratar con los compuestos de la invención incluyen adenoma, adenocarcinoma, angiosarcoma, astrocitoma, carcinoma epitelial, germinoma, glioblastoma, glioma, hemangioendotelioma, hemangiosarcoma, hematoma, hepatoblastoma, leucemia, linfoma, meduloblastoma, melanoma, neuroblastoma, osteosarcoma, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma y teratoma. En particular, el tumor/cáncer se selecciona del grupo de melanoma lentiginoso acral, queratosis actínica, adenocarcinoma, carcinoma quístico adenoide, adenomas, adenosarcoma, carcinoma adenoescamoso, tumores astrocíticos, carcinoma de la glándula de Bartholin, carcinoma de células basales, carcinoma de glándula bronquial, carcinoide capilar, carcinoma, carcinosarcoma, colangiocarcinoma, condrosarcoma, cistadenoma, tumor sinusal endodérmico, hiperplasia endometrial, sarcoma estromal endometrial, adenocarcinoma endometriode, sarcoma endometrial, sarcoma de Swing, hiperplasia nodular focal, gastrinoma, tumores de la línea germinal, glioblastoma, glucagonoma, hemangioblastoma, hemangioendotelioma, hemangioma, adenoma hepático, adenomatosis hepática, carcinoma hepatocelular, insulinita, neoplasia intraepitelial, neoplasia de células escamosas intraepiteliales, carcinoma invasivo de células escamosas, carcinoma de células grandes, liposarcoma, carcinoma pulmonar, leucemia linfoblástica, leucemia linfocítica, leiomiomasarcoma, melanoma, melanoma maligno, tumor mesotelial maligno, tumor de la vaina neural, meduloblastoma, meduloepitelioma, mesotelioma, carcinoma mucoepidermoide, leucemia mieloide, neuroblastoma, adenocarcinoma neuroepitelial, melanoma nodular, osteosarcoma, carcinoma de ovarios, adenocarcinoma seroso papilar, tumores hipofisarios, plasmocitoma, pseudosarcoma, carcinoma de próstata, blastoma pulmonar, carcinoma de células renales, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma, carcinoma seroso, carcinoma de células escamosas, carcinoma microcítico, carcinoma de tejidos blandos, tumor secretor de somatostatina, carcinoma escamoso, carcinoma de células escamosas, carcinoma indiferenciado, melanoma uveal, carcinoma verrugoso, carcinoma de vagina/vulva, VIPoma, tumor de Wilm. Incluso más preferentemente, el tumor/cáncer que se va a tratar con los compuestos de la invención incluye cáncer cerebral, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma colorrectal, leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda de células pre-B, cáncer de vejiga, astrocitoma, astrocitoma preferentemente de grado II, III o IV, glioblastoma, preferentemente glioblastoma multiforme, cáncer de células pequeñas y cáncer de células no pequeñas, preferentemente cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón, melanoma metastásico, cáncer de próstata metastásico independiente de andrógenos, cáncer de próstata metastásico dependiente de andrógenos, adenocarcinoma de próstata y cáncer de mama, preferentemente cáncer ductal de mama o carcinoma de mama.
- 45 En una realización concreta, el cáncer es uno de los siguientes: glioma, leucemia linfoblástica aguda de células pre-B, leucemia mieloide aguda, carcinoma colorrectal, adenocarcinoma de pulmón, adenocarcinoma de próstata, cáncer de vejiga, cáncer ductal de mama o carcinoma de mama. Incluso más preferentemente, dicho glioma es glioma de grado IV.
- 50 El TGFB puede inducir la capacidad de autorrenovación de células madre de cáncer a través de la inducción dependiente de Smad de LIF. El LIF, a su vez, está implicado en la activación de la vía de JAK-STAT, de modo que se induce el proceso de proliferación celular y el incremento de las células madre tumorales (células madre de cáncer) (Penuelas et al., Cancer Cell, 15:315-327, 2009). La activación de los miembros de la familia STAT, tal como Stat 3, normalmente se produce a través de su fosforilación.
- 55 Como se ha expresado al principio de la descripción, los inventores han abierto una nueva ventana terapéutica en el tratamiento del cáncer, especialmente para el tratamiento del cáncer asociado con niveles altos de LIF o de variantes funcionalmente equivalentes del mismo, con la invención descrita en el presente documento. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se piensa que el efecto del LIF y de sus inhibidores sobre la proliferación de los tumores reside en la capacidad de LIF para estimular la proliferación de células madre tumorales. Los autores muestran que el tratamiento con anticuerpos anti-LIF, preferentemente anticuerpos anti-LIF de acuerdo con la presente invención, reduce la fosforilación dependiente de LIF de Stat3 en cultivo celular (Figura 2). Los anticuerpos inhibidores anti-LIF son capaces de inhibir la proliferación de las células madre tumorales, de modo que su uso es particularmente útil para el tratamiento de enfermedades que se pueden beneficiar de la inhibición de la proliferación de las células madre. Como se ha descrito anteriormente, los anticuerpos de la presente invención tienen la propiedad de reconocer un fragmento de LIF no comprendido en la región que comprende los restos de aminoácidos de 1 a 160 del LIF humano, lo que

significa, a su vez, que estos anticuerpos se unen en el segmento C-terminal del LIF. Los presentes inventores han demostrado que, sorprendentemente, los anticuerpos que tienen esta propiedad son particularmente útiles para el tratamiento de dichas enfermedades, incluidos el cáncer (Figura 2, Figura 6).

5 Por tanto, en otro aspecto, se desvelan anticuerpos inhibidores para el tratamiento de enfermedades asociadas a la proliferación celular no deseada, tales como, por ejemplo, cáncer y, especialmente, para el tratamiento del cáncer asociado con una actividad elevada de LIF.

10 La expresión "anticuerpo inhibidor" se entiende en el contexto de la presente invención como un anticuerpo que es capaz de unirse al LIF, de modo que evita que el LIF realice sus funciones. "Anticuerpo neutralizante" es sinónimo.

15 En el cáncer de mama se ha descrito una relación entre TGF β y una población celular caracterizada por niveles altos del marcador de superficie celular CD44 (población CD44^{alto}). Se ha demostrado que el TGF β incrementa la población de células CD44^{alto} enriquecida por CIC mediante la inducción de una transición epitelial-mesenquimatoso (EMT) (Gupta et al., Cell, 138, 645-659, 2009; Mani et al., Cell, 133:504-715, 2008). No obstante, en el glioma, el compartimento de CD44^{alto} no se ha estudiado extensamente. La presente invención identifica Id1 y CD44 como nuevos marcadores de células madre cancerosas en glioma, más específicamente glioblastoma (Figura 3). En concreto, los autores muestran que la población celular CD44^{alto}/CD44^{alto} está enriquecida en células iniciadoras de glioma (CIG, Figura 4).

20 En un ejemplo no limitante y meramente ilustrativo, los anticuerpos anti-LIF, preferentemente los anticuerpos anti-LIF de acuerdo con la presente invención, apuntan a una población celular caracterizada por la expresión de CD44 e Id1, que está enriquecida por células iniciadoras de glioma (CIG). En particular, los anticuerpos anti-LIF, preferentemente los anticuerpos anti-LIF de acuerdo con la presente invención, se dirigen a las CIG CD44^{alto}/Id1^{alto} mediante la represión de Id1 and Id3 (Figura 5). Además, los anticuerpos son capaces de eliminar la población de CIG CD44^{alto}/Id1^{alto}. Por tanto, los autores de la presente invención han encontrado que los anticuerpos anti-LIF, preferentemente anticuerpos anti-LIF de acuerdo con la presente invención, funcionan como inhibidores de la vía regulada por los miembros de la familia del factor de crecimiento transformante beta (TGF β). Por lo tanto, en una realización concreta, la presente invención se refiere al anticuerpo o fragmento del mismo o composición farmacéutica de la invención, en el que dicho anticuerpo o fragmento del mismo o composición farmacéutica es capaz de reducir la población celular caracterizada por niveles altos de CD44 e Id1. En la Figura 5 se muestra un ejemplo ilustrativo de esto. Las neuroesferas de GBM son un ejemplo preferido de la población celular caracterizada por niveles altos de CD44 e Id1. Por ejemplo, en las líneas celulares derivadas de glioblastoma-paciente, los anticuerpos anti-LIF, preferentemente los anticuerpos anti-LIF de acuerdo con la presente invención, reducen los niveles de expresión de Id1 y CD44 (Figura 6).

35 Además, los autores muestran que el tratamiento in vivo con anticuerpos anti-LIF, preferentemente anticuerpos anti-LIF de acuerdo con la presente invención, disminuye el compartimento celular CD44^{alto}/Id1^{alto} (Figura 7). Por tanto, la administración de anticuerpos anti-LIF, preferentemente los anticuerpos anti-LIF de acuerdo con la presente invención, puede evitar el inicio del tumor y se cree que evita la recurrencia del tumor.

45 En una realización concreta de la invención, el cáncer o las células que forman los tumores que se producen en el cáncer se caracterizan por presentar niveles altos de LIF. En el contexto de la presente invención, con "niveles altos" de LIF se entiende que las concentraciones de LIF son mayores que las que se producen en una muestra control en al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 100 %, al menos el 110 %, al menos el 120 %, al menos el 130 %, al menos el 140 %, al menos el 150 % o más.

50 Se entiende que la muestra control es una muestra que tiene niveles de LIF que se usan como referencia para la determinación de los niveles relativos de LIF en una muestra de ensayo. Las muestras de referencia normalmente se obtienen de pacientes que están bien documentados desde el punto de vista clínico y que no presentan enfermedad. En dichas muestras, la concentración de biomarcador puede determinarse, por ejemplo, mediante la determinación de la concentración media en una población de referencia. En la determinación de la concentración de referencia para un marcador determinado, es necesario tener en cuenta algunas características del tipo de muestra, tales como la edad, sexo, estado físico, y similares, del paciente. Por ejemplo, la muestra de referencia se puede obtener de cantidades idénticas de un grupo de al menos 2, al menos 10, de al menos 100 a más de 1.000 individuos, de modo que la población sea estadísticamente significativa.

60 La concentración de LIF se puede determinar intracelularmente, en el hueco intersticial o en extractos en los que hay proteína intracelular y la que se encuentra en el hueco intersticial. Los niveles de LIF se pueden determinar mediante la medición de la cantidad de proteína usando métodos inmunológicos.

65 Más concretamente, el método inmunológico para la determinación de los niveles de LIF comprende un anticuerpo anti-LIF e, incluso más concretamente, comprende el anticuerpo de acuerdo con la presente invención.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con la presente invención junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 En el contexto de la presente invención, "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende como la cantidad de anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con la presente invención, que es necesaria para conseguir el efecto deseado que, en este caso específico, es el tratamiento de cánceres. En general, la cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de acuerdo con la presente invención que se va a administrar dependerá, entre otros factores, del individuo que se va a tratar, de la gravedad de la enfermedad que sufre dicho individuo, de la forma de dosificación elegida etc. Por esta razón, el experto en la materia debe considerar las dosis mencionadas en la presente invención únicamente como una guía, y debe ajustar las dosis de acuerdo con las variables mencionadas previamente. No obstante, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención se puede administrar una o más veces al día, por ejemplo 1, 2, 3 o 4 veces al día.

15 En el contexto de esta memoria, el término "tratamiento" o "tratar" significa la administración de un anticuerpo de acuerdo con la invención para prevenir, aliviar o eliminar el cáncer o uno o más síntomas asociados con el cáncer. "Tratamiento" también incluye la prevención, alivio o eliminación de las secuelas fisiológicas de la enfermedad. En el contexto de la presente invención, se entiende que el término "alivio" significa cualquier mejora de la situación del paciente tratado, tanto subjetiva (sensaciones de o sobre el paciente) como objetivamente (parámetros medidos).

20 El término "vehículo, adyuvante y/o excipiente" se refiere a entidades moleculares o sustancias con las que se administra el principio activo. Dichos vehículos, adyuvantes o excipientes farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluidos los procedentes del petróleo o de origen animal o vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares, excipientes, agentes disgregantes, agentes humectantes o diluyentes. Se describen vehículos farmacéuticos adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W. Martin.

30 En el contexto de la presente invención, la expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y que normalmente no producen reacciones alérgicas o reacciones adversas similares, tales como molestias gástricas, mareos y similares, cuando se administran a un ser humano. La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa, preferentemente, aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal, o incluido en la farmacopea de EE.UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales y, más particularmente, en seres humanos.

35 El anticuerpo, así como las composiciones farmacéuticas que contienen dicho anticuerpo, se pueden usar junto con otros fármacos adicionales útiles en el tratamiento de cánceres. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica o pueden proporcionarse, de forma alternativa, en forma de una composición aparte para su administración, que puede ser, o no, simultánea a la de la composición farmacéutica que comprende dicho anticuerpo.

40 Los ejemplos de otros fármacos adicionales útiles en el tratamiento de cánceres incluyen, entre otros, agentes alquilantes tales como, por ejemplo, ciclofosfamida, carmustina, daunorubicina, mecloretamina, clorambucilo, nimustina, melfalán y similares; antraciclina tales como, por ejemplo, daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, mitoxantrona, valrubicina y similares; compuestos de taxano tales como, por ejemplo, paclitaxel, docetaxel y similares; inhibidores de la topoisomerasa tales como, por ejemplo, etopósido, tenipósido, tulipósido, irinotecán y similares; análogos de nucleótidos tales como, por ejemplo, azacitidina, azatioprina, capecitabina, citarabina, doxifluridina, fluorouracilo, gemcitabina, mercaptopurina, metotrexato, tioguanina, florafur y similares; agentes basados en platino tales como, por ejemplo, carboplatino, cisplatino, oxaliplatino y similares; agentes antineoplásicos tales como, por ejemplo, vincristina, leucovorina, lomustina, procarbazona y similares; moduladores hormonales tales como, por ejemplo, tamoxifeno, finasterida, inhibidores de la 5- α -reductasa y similares; alcaloides de la vinca tales como, por ejemplo, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina y similares. Agentes quimioterapéuticos adecuados se describen con más detalle en la literatura, tal como en The Merck Index en CD-ROM, 13 edición.

55 La composición farmacéutica de la invención se puede administrar por cualquier vía adecuada para la administración de formulaciones que contienen anticuerpos, tales como, por ejemplo, subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular etc.

60 Los ejemplos ilustrativos de las formas de dosificación farmacéuticas administradas pueden estar en forma de, por ejemplo, soluciones estériles, suspensiones o productos liofilizados, en la forma de dosificación adecuada; en este caso, dichas composiciones farmacéuticas incluirán los excipientes adecuados, tales como tampones, reactivos etc. En cualquier caso, los excipientes se elegirán de acuerdo con la forma de dosificación farmacéutica elegida.

65 El experto en la materia entiende que las mutaciones en la secuencia de nucleótidos del gen que codifica el LIF que dan lugar a sustituciones conservadoras de aminoácidos en posiciones no cruciales para la funcionalidad de la proteína son mutaciones neutras en la evolución que no afectan a su estructura global o a su funcionalidad. Dichas variantes entran dentro del ámbito de la presente invención.

“Funcionalmente equivalente” o “variante del mismo funcionalmente equivalente”, como se usa en esta memoria, describe una molécula que tiene una relación funcional con la molécula de la que deriva (es decir, un derivado de la misma). Más normalmente, tiene una relación tanto funcional como estructural con la molécula de la que deriva. Relación funcional/estructural se tiene que entender del siguiente modo:

A. Relación funcional: Una molécula con una relación funcional con el LIF como se usa en el presente documento tiene un efecto en el intervalo del 50 al 200 % en comparación con el efecto del LIF, más preferentemente en el intervalo del 80 al 120 % en comparación con el efecto del LIF y, más preferentemente, en el intervalo del 95 al 105 %, tal como esencialmente el 100 % del LIF en un ensayo *in vitro* para la actividad del LIF. El experto en la materia conoce varios ensayos *in vitro* para la actividad del LIF. Por ejemplo, se puede medir la diferenciación de los melanocitos tras la adición de LIF o un equivalente funcional de los mismos, como muestran Hirobe, 2002, J. Cell. Phys., 192:315-326. Más particularmente, se puede determinar el porcentaje de melanocitos tras la adición de LIF, como se muestra en la Fig. 2A de Hirobe, 2002, J. Cell. Phys., 192:315-326.

B. Relación estructural: (1) la molécula puede migrar en electroforesis convencional en gel de SDS-poliacrilamida con Tris/Glicina, como conoce el experto, de forma esencialmente idéntica al LIF y/o es una molécula que tiene un patrón de glicosilación diferente y/o es una molécula cuya secuencia de aminoácidos deriva del LIF humano, es decir en la que uno o más (es decir, de 1 a 5, de 1 a 10 o de 1 a 20) aminoácidos del LIF humano se han modificado, sustituido, añadido o delecionado. Las variantes funcionalmente equivalentes de LIF que tienen dichas inserciones, deleciones o modificaciones de uno o más aminoácidos con respecto a LIF y, además, conservan las mismas funciones que el LIF, por tanto, también se incluyen dentro del alcance de la divulgación. En un aspecto preferido, “funcionalmente equivalente” o “variante del mismo funcionalmente equivalente” describe una molécula capaz de llevar a cabo esencialmente la misma función que el LIF. Por tanto, como se usa en el presente documento, la expresión “funcionalmente equivalente” o “variante del mismo funcionalmente equivalente” también incluye cualquier fragmento funcionalmente equivalente de LIF. Lo mismo que se ha descrito en el presente documento para la variante funcionalmente equivalente del LIF también se aplica a variantes funcionalmente equivalentes de otras proteínas, tales como CD44, Id1 e Id3.

El término “fragmento” se refiere a un péptido que comprende una porción de una proteína. En este caso, un fragmento funcionalmente equivalente de LIF es un péptido o proteína que comprende una porción de LIF y que tiene esencialmente las mismas funciones que el LIF. La esencialmente misma función de un efector, tal como LIF, se puede determinar como se ha descrito anteriormente en “A: Relación funcional”.

Un “fragmento de un anticuerpo” es un péptido o una pluralidad de péptidos (tales como, normalmente, dos, tres o cuatro péptidos) que comprenden una porción del anticuerpo. Estos péptidos comprenden opcionalmente puentes disulfuro intermoleculares o intramoleculares. Por tanto, un fragmento de un anticuerpo puede comprender una o dos cadenas ligeras o fragmentos de las mismas y/o una o dos cadenas pesadas o fragmento(s) de las mismas, unidas opcionalmente por puentes disulfuro. Son más típicas las combinaciones con una cadena pesada y ligera o fragmento(s) de las mismas o dos cadenas pesadas y dos ligeras o fragmento(s) de las mismas. Los fragmentos relevantes del anticuerpo o, más particularmente, los fragmentos de las cadenas ligeras y las cadenas pesadas son, preferentemente, fragmentos que comprenden los dominios variables (V_H) del anticuerpo/cadena y, más particularmente, comprenden la región de unión al antígeno del anticuerpo/cadena.

Los anticuerpos anti-LIF, preferentemente los anticuerpos anti-LIF de acuerdo con la presente invención, son también potencialmente interesantes para el tratamiento de tumores resistentes a quimioterapia dada la capacidad conocida de las células madre tumorales de ser resistentes a la quimioterapia. Además, los autores muestran que el uso de anticuerpos anti-LIF, preferentemente anticuerpos anti-LIF de acuerdo con la presente invención, también es adecuado para prevenir la aparición de recaídas en enfermedades asociadas a una proliferación celular no deseada (Figura 7).

Métodos diagnósticos desvelados

Los autores de la presente invención han descubierto que el LIF induce el proceso de proliferación celular y el incremento de las células madre tumorales (células madre cancerosas) mediante su implicación en la cascada JAK/STAT. Más particularmente, los autores proporcionan pruebas de que CD44 e Id1 son nuevos marcadores de glioma. Además, los autores mostraron que Id1 se expresa preferentemente en una subpoblación celular enriquecida para CIG caracterizada por la expresión de niveles altos de CD44 y que *ID1* e *ID3* son genes incluidos en una firma de la inhibición de LIF mediada por anticuerpos. Por tanto, LIF, CD44, Id1, Id3 o cualquier combinación de los mismos se pueden usar en métodos diagnósticos para diagnosticar enfermedades asociadas a la proliferación celular no deseada. Los procedimientos diagnósticos se basan en determinar los niveles de LIF o de una variante funcionalmente equivalente del mismo o de CD44 o de una variante funcionalmente equivalente del mismo o de Id1 o de una variante funcionalmente equivalente de la misma o de Id3 o de variante funcionalmente equivalente de la misma o de cualquier combinación de estas moléculas. Preferentemente, los métodos diagnósticos se basan en la determinación de los niveles de LIF o de una variante funcionalmente equivalente del mismo.

Por lo tanto, en otro aspecto, se desvela un método *in vitro* para el diagnóstico de enfermedades asociadas a la proliferación celular no deseada en un sujeto o para determinar la predisposición de un sujeto a sufrir dicha enfermedad asociada a la proliferación celular no deseada, o para determinar el estadio o gravedad de dicha enfermedad asociada a la proliferación celular no deseada en un sujeto, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un sujeto con dicha enfermedad asociada a la proliferación celular no deseada, que comprende cuantificar los niveles de expresión de LIF o de una variante funcionalmente equivalente del mismo, o de CD44 o de una variante funcionalmente equivalente del mismo, o de Id1 o de una variante funcionalmente equivalente de la misma, o de Id3 o de una variante funcionalmente equivalente de la misma, o de cualquier combinación de estas moléculas en una muestra biológica de dicho sujeto, en el que un incremento de la expresión del gen que codifica LIF o de una variante funcionalmente equivalente del mismo o de CD44 o de una variante funcionalmente equivalente del mismo o de Id1 o de una variante funcionalmente equivalente de la misma o de Id3 o de una variante funcionalmente equivalente de la misma o de cualquier combinación de estas moléculas, con respecto a los niveles de expresión del gen que codifica LIF o de una o de una variante funcionalmente equivalente del mismo o de CD44 o de una variante funcionalmente equivalente del mismo o de Id1 o de una variante funcionalmente equivalente de la misma o de Id3 o de una variante funcionalmente equivalente de la misma o de cualquier combinación de estas moléculas en una muestra control, es indicativo de una enfermedad asociada a la proliferación celular no deseada, o de una mayor predisposición de dicho sujeto a sufrir una enfermedad asociada a la proliferación celular no deseada o de la falta de respuesta a la terapia administrada a dicho sujeto. En una realización preferida, dicho método *in vitro* comprende cuantificar los niveles de expresión del gen que codifica el LIF o una variante funcionalmente equivalente del mismo con respecto a los niveles de expresión del gen que codifica el LIF o una variante funcionalmente equivalente del mismo en una muestra control.

Por tanto, como se usa en el presente documento, la expresión "variante funcionalmente equivalente" también incluye cualquier fragmento funcionalmente equivalente de dichas proteínas marcadoras. El término "fragmento" se refiere a un péptido que comprende una porción de dicha proteína marcador. En este caso, un fragmento funcionalmente equivalente es un péptido o proteína que comprende una porción de dicha proteína marcador y que tiene esencialmente las mismas funciones que dicha proteína. "Proteína marcador" se refiere a, preferentemente, LIF, CD44, Id1 e Id3, sin desear quedar limitado a las mismas.

Como se usa en el presente documento, diagnosticar se refiere a evaluar la probabilidad de acuerdo con la cual un sujeto sufre una enfermedad. Como entenderán los expertos en la materia, dicha evaluación normalmente puede no ser correcta para el 100 % de los sujetos a los que se va a diagnosticar, aunque preferentemente lo es. No obstante, el término requiere ser capaz de identificar una parte estadísticamente significativa de los sujetos que sufren la enfermedad o que tienen predisposición a la misma. El experto en la materia puede determinar si una parte es estadísticamente significativa usando simplemente una o varias herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, la determinación de los intervalos de confianza, la determinación del valor p, la prueba t de Student, la prueba de Mann-Whitney, etc. Los detalles se encuentran en Dowdy y Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, New York, 1983. Los intervalos de confianza preferidos son al menos el 50%, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 % y al menos el 95 %. Los valores p son, preferentemente, 0,2, 0,1, 0,05.

Como se usa en el presente documento, el término "predisposición" significa que un sujeto todavía no ha desarrollado la enfermedad o ninguno de los síntomas de la enfermedad mencionados anteriormente u otros criterios diagnósticos pero, no obstante, desarrollará la enfermedad en el futuro con una cierta probabilidad. Dicha probabilidad será significativamente diferente de la probabilidad estadística del inicio de una enfermedad asociada a la proliferación celular no deseada. Preferentemente, se diagnostica que la probabilidad de desarrollar una enfermedad asociada a la proliferación celular no deseada es al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o el 100% de una predisposición. El diagnóstico de una predisposición puede denominarse, en ocasiones, pronóstico o predicción de la probabilidad de que un sujeto desarrolle la enfermedad.

En el contexto de la presente divulgación, "muestra control" se entiende como la muestra de referencia que se usa para determinar la variación de los niveles de expresión de los genes y proteínas usados en la presente divulgación. En un aspecto, el valor de referencia se obtiene de la señal proporcionada usando una muestra de tejido obtenida de un individuo sano. Preferentemente, las muestras se toman del mismo tejido de varios individuos sanos y se combinan, de modo que la cantidad de los polipéptidos en la muestra refleje el valor medio de dichas moléculas en la población.

Por tanto, en un aspecto particular de la divulgación, se pueden cuantificar los niveles de expresión de LIF o CD44 o de Id1 o de Id3.

Como entiende el experto en la materia, el nivel de expresión de una proteína se puede cuantificar por medio de cualquier método convencional. A modo de ilustración no limitante, los niveles de proteína se pueden cuantificar mediante, por ejemplo, el uso de anticuerpos con la capacidad de unirse a dichas proteínas (o a fragmentos de las mismas que contienen un determinante antigénico) y la posterior cuantificación de los complejos formados. Los anticuerpos que se usan en estos ensayos pueden o no estar marcados. Los ejemplos ilustrativos de marcadores que se pueden usar incluyen isótopos radiactivos, enzimas, fluoróforos, reactivos quimioluminiscentes, sustratos enzimáticos o cofactores, inhibidores enzimáticos, partículas, tintes, etc. Existe una gran variedad de ensayos

conocidos que se pueden usar en la presente invención que usan anticuerpos no marcados (anticuerpos primarios) y anticuerpos marcados (anticuerpos secundarios); estas técnicas incluyen transferencia de Western, ELISA (ensayo de inmunoadsorción ligada a enzimas), RIA (radioinmunoensayo), EIA competitivo (inmunoensayo enzimático competitivo), DAS-ELISA (ELISA de tipo sándwich con doble anticuerpo), técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, técnicas basadas en el uso de biochips o micromatrices de proteínas que incluyen anticuerpos específicos o ensayos basados en precipitación coloidal en formatos tales como tiras reactivas. En otro aspecto particular, la cuantificación de los niveles de proteína se realiza por medio de un procedimiento inmunoanalítico, tal como transferencia de Western, inmunohistoquímica o ELISA. En un aspecto incluso más particular, dicho método inmunoanalítico comprende el anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma con el número de acceso DSM ACC3054 en el sentido de la presente invención.

Asimismo, el procedimiento diagnóstico desvelado en el presente documento se puede aplicar a cualquiera de las enfermedades asociadas a la proliferación celular no deseada definida anteriormente. En una realización preferida, la enfermedad asociada a la proliferación celular no deseada es un cáncer, preferentemente un cáncer que tiene niveles elevados de LIF o tiene niveles elevados de cualquiera de los siguientes: Id1, Id3, CD44.

Poner en práctica el método del presente documento comprende obtener una muestra biológica del sujeto que se va a estudiar. Los ejemplos ilustrativos no limitantes de dichas muestras incluyen diferentes tipos de fluidos biológicos, tales como sangre, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, líquido peritoneal, heces, orina y saliva, así como muestras de tejidos. Las muestras de fluidos biológicos se pueden obtener mediante cualquier método convencional como las muestras de tejidos; a modo de ilustración, dichas muestras de tejidos pueden ser muestras de biopsias obtenidas mediante resección quirúrgica.

En otro aspecto, se desvela un kit que comprende reactivos para la cuantificación de los niveles de expresión de LIF o de una variante funcionalmente equivalente del mismo, o de CD44 o de una variante funcionalmente equivalente del mismo, o de Id1 o de una variante funcionalmente equivalente de la misma, o de Id3 o de una variante funcionalmente equivalente de la misma, o de cualquier combinación de estas moléculas para el diagnóstico de cáncer en un sujeto, o para determinar la predisposición de un sujeto a sufrir dicho cáncer, o para determinar el estadio o gravedad de dicho cáncer en un sujeto o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un sujeto con dicho cáncer, en el que si los reactivos detectan un incremento en la expresión de dicho gen o dicha proteína o una variante funcionalmente equivalente de la misma con respecto a una muestra control, dicho sujeto puede sufrir una enfermedad asociada a la proliferación celular no deseada o presentar una mayor predisposición a sufrir dicha enfermedad asociada a la proliferación celular no deseada, o presentar mayor gravedad de dicha enfermedad, o la terapia administrada no está siendo eficaz. En una realización preferida de la misma, el kit se caracteriza porque comprende reactivos para la cuantificación de los niveles de expresión de LIF o de una variante funcionalmente equivalente del mismo. También se desvela el uso de dicho kit.

Todos los términos y expresiones usados en la definición del uso del kit se han descrito anteriormente y explicado para otros aspectos y aspectos particulares desvelados en el presente documento, y también son aplicables al uso del kit descrito en el presente documento.

Métodos para diseñar terapias individualizadas y para seleccionar pacientes que se pueden beneficiar de la terapia basada en el anticuerpo anti-LIF

En otro aspecto, se desvela un método *in vitro* para diseñar una terapia individualizada para un paciente que sufre una enfermedad asociada a la proliferación celular no deseada, que comprende:

- (a) cuantificar los niveles de expresión de LIF en dicho paciente, y
- (b) comparar dichos niveles de expresión con los niveles control, en el que si los niveles de expresión de LIF en dicho paciente son mayores que los valores control, se administra a dicho paciente un anticuerpo dirigido contra LIF.

En otro aspecto, se desvela un método *in vitro* para seleccionar pacientes que sufren una enfermedad asociada a la proliferación celular no deseada, para ser tratados con un anticuerpo dirigido contra LIF, que comprende

- a) cuantificar los niveles de expresión de LIF en dicho paciente, y
- b) comparar dichos niveles de expresión con los niveles control,

en el que, si los niveles de expresión de LIF en dicho paciente son mayores que los valores control, dicho paciente se selecciona para recibir tratamiento con un anticuerpo dirigido contra LIF.

En ambos aspectos, preferentemente la enfermedad asociada a la proliferación celular no deseada está asociada a una proliferación no deseada de las células madre.

Las enfermedades que presentan una proliferación celular no deseada son las que se han descrito anteriormente. Preferentemente, dicha enfermedad que presenta una proliferación celular no deseada es cáncer. Incluso más

preferentemente, dicho cáncer se debe a una actividad elevada de la vía de señalización JAK-STAT.

Preferentemente, dicho cáncer es uno de los siguientes: glioma, leucemia linfoblástica aguda de células pre-B, leucemia mieloide aguda, carcinoma colorrectal, adenocarcinoma de pulmón, adenocarcinoma de próstata, cáncer de vejiga, cáncer ductal de mama o carcinoma de mama. Incluso más preferentemente, dicho glioma es glioma de grado IV.

Métodos pronósticos desvelados

En otro aspecto, se desvela un método pronóstico *in vitro* para predecir la esperanza de vida promedio de pacientes que sufren una enfermedad asociada a la proliferación celular no deseada. Este método se basa en la observación de que, por ejemplo, en caso de glioma, la esperanza de vida promedio se reduce para los pacientes que muestran niveles de expresión de LIF más altos que los pacientes control. Los autores proporcionan pruebas de que CD44 e Id1 son marcadores de CIG. Estos marcadores confieren un mal pronóstico en pacientes con GBM. La conexión especificada anteriormente entre niveles más altos de LIF y niveles más altos de Id1 y CD44, respectivamente, en sujetos que sufren una enfermedad asociada a la proliferación celular no deseada, proporciona nuevos marcadores sobre los que pueden apoyarse los métodos pronósticos.

El método se basa en

- a) cuantificar los niveles de expresión de LIF o de CD44 o de Id1 o de Id3 en dicho paciente, y
- b) comparar dichos niveles de expresión con los niveles control, en el que, si los niveles de expresión de LIF o de CD44 o de Id1 o de Id3 en dicho paciente son mayores que los valores de los pacientes control de dicha misma enfermedad, dicho paciente probablemente tenga una esperanza de vida menor que el grupo control.

En un aspecto más específico, la concentración de LIF o de CD44 o de Id1 o de Id3 o de una variante funcionalmente equivalente de cualquiera de estos marcadores se puede medir con fines pronósticos, particularmente para la predicción de la esperanza de vida promedio de un individuo que sufre dicha enfermedad. Preferentemente, se usa la concentración de LIF o de una variante funcionalmente equivalente del mismo. Para este fin, la concentración de LIF o de una variante funcionalmente equivalente del mismo o de CD44 o de una variante funcionalmente equivalente del mismo o de Id1 o de una variante funcionalmente equivalente de la misma o de Id3 o de variante funcionalmente equivalente de la misma o de cualquier combinación de estas moléculas del paciente con el tumor se comparan con la concentración de referencia de dicho mismo marcador. Como se usa en el presente documento, LIF, CD44, Id1 e Id3 o equivalentes funcionales de LIF, CD44, Id1 e Id3 son "marcadores". Preferentemente, la concentración de LIF o de una variante funcionalmente equivalente del mismo del paciente con el tumor se compara con la concentración de referencia de LIF o de una variante funcionalmente equivalente del mismo, es decir siendo el marcador LIF o una variante funcionalmente equivalente del mismo. La muestra de referencia se toma de un grupo de pacientes de referencia. El grupo de pacientes de referencia habitualmente consiste en pacientes bien documentados y que sufren la misma enfermedad. Por ejemplo, la muestra de referencia se puede obtener de cantidades idénticas de un grupo de al menos 2, al menos 10, al menos 100 a más de 1.000 individuos, de modo que la población de pacientes que sufren dicha enfermedad sea estadísticamente significativa. El grupo de referencia puede consistir en uno o más de los siguientes:

- a) todos los pacientes que sufren dicha enfermedad
- b) todos los pacientes que sufren dicha enfermedad que no muestran niveles significativamente regulados por aumento de LIF
- c) todos los pacientes que sufren dicha enfermedad que muestran niveles significativamente regulados por disminución de LIF

La concentración de LIF se puede determinar intracelularmente, en el hueso intersticial o en extractos en los que hay proteína intracelular y la que se encuentra en el hueso intersticial.

En este aspecto, se prefiere una enfermedad asociada a la proliferación celular no deseada. En un aspecto más particular, la enfermedad asociada a la proliferación celular no deseada es cáncer. Incluso más preferido, el tipo de cáncer se asocia con niveles anormalmente altos de LIF en una subpoblación de pacientes de dicho cáncer. En un aspecto más particular, el cáncer es uno de los siguientes: leucemia, glioma, carcinoma colorrectal, cáncer de vejiga, cáncer de mama. En un aspecto más particular, la leucemia es leucemia linfoblástica aguda de células pre-B o leucemia mieloide aguda y el cáncer de mama es cáncer ductal de mama o carcinoma de mama.

Los métodos estadísticos permitirán predecir la esperanza de vida promedio de los pacientes basándose en los niveles de dicha proteína o variantes funcionalmente equivalentes de la misma. Dicha proteína es, preferentemente, LIF.

Como se usa en el presente documento, la expresión "variante funcionalmente equivalente" también incluye cualquier fragmento funcionalmente equivalente de dichas proteínas marcadoras LIF. El término "fragmento" se refiere a un péptido que comprende una porción de dicha proteína marcadora. En este caso, un fragmento funcionalmente

equivalente es un péptido o proteína que comprende una porción de dicha proteína marcadora y que tiene esencialmente las mismas funciones que dicha proteína.

5 En un aspecto más particular, la cuantificación de los niveles de proteína se realiza por medio de un método inmunoanalítico, tal como transferencia de Western, inmunohistoquímica o ELISA. En un caso incluso más particular, dicho método inmunoanalítico comprende el anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma con el número de acceso DSM ACC3054.

10 Ejemplos:

La invención se describe a continuación por medio de los ejemplos siguientes, que deben considerarse ejemplos meramente ilustrativos y no limitantes de la misma.

15 Materiales y métodos:

Líneas celulares y cultivos de células primarias:

20 Se generaron PCTC y neuroesferas de GBM como se ha descrito anteriormente (Bruna et al., Cancer Cell, 11:147-160, 2007; Gunther et al., Oncogene, 2007). En resumen, se procesaron muestras de tumor en los 30 minutos posteriores a la resección quirúrgica. Las piezas trituradas de muestras de GBM humano se digirieron con 200 U/ml de colagenasa I (Sigma) y 500 U/ml de DNasa I (Sigma) en PBS durante 2 horas a 37 °C con agitación energética constante. La suspensión de una célula se filtró a través de un colador celular de 70 µm (BC Falcon) y se lavó con PBS. Por último, las células se resuspendieron y, después, se cultivaron en DMEM con el 10 % de FBS (para PCTC

25 Para la inmunotransferencia se usaron anticuerpos específicos contra p-Smad2, Smad2 (Cell Signaling); α-Tubulina (Sigma) e Id1 (C20, Santa Cruz Biotechnology). Las construcciones lentivirales se produjeron y concentraron como se ha descrito anteriormente (Zufferey et al., Nat. Biotechnol., 15:871-875, 1997). Las neuroesferas se disociaron en medio de crecimiento, se mezclaron con virus y se sembraron en placas. Se añadió polibreno (Sigma) a una concentración de 8 µg/ml. Las células se incubaron con el virus durante 12 horas, se lavaron con PBS y se incubaron en medio fresco como se ha descrito anteriormente (Zufferey et al., Nat. Biotechnol., 15:871-875, 1997).

30 Análisis de la población positiva para CD44 mediante citometría de flujo. Las neuroesferas se disociaron y las células individuales se incubaron durante 15 minutos en solución de bloqueo que contenía 10 µg/ml de IgG humana, seguido de anticuerpo anti-CD44 o el isotipo de control IgG2b, ambos conjugados con FITC (BD Pharmingen). Las células se incubaron durante 20 minutos en hielo protegidas de la luz, se lavaron en PBS y se tiñeron con yoduro de propidio (Sigma) para discriminar las células moribundas. Después, las células se analizaron mediante citometría de flujo (FACSCalibur; Beckton Dickinson) o se clasificaron (MoFlo; DAKO) después de teñir con CD44-FITC.

Aislamiento de células humanas de xenoinjertos ortotópicos en cerebros de ratón

40 Los cerebros de ratones a los que se inocularon neuroesferas se disociaron y se tiñeron con el AcMo específico de pan-MHC de clase I HP-1F7 (Santa Cruz Biotechnology), seguido de AcMo secundario conjugado con PE (Dako Cytomation) para la posterior clasificación celular de células humanas positivas a MHC-I (MoFlo-DAKO). Las células obtenidas se lavaron e inmediatamente se usaron en los posteriores experimentos.

Ensayo de formación de neuroesferas

45 Un número igual de células se sembraron a una densidad celular baja (4 células/µl) en pocillos de una placa de 96 pocillos. Las células se trataron con los compuestos indicados y el número total de neuroesferas recién formadas se contó tras 7 días en cultivo (Lee et al., Cancer Cell, 13:69-80, 2008; Reynolds y Weiss, Dev. Biol. 175:1-13, 1996).

Ensayo de autorrenovación

50 Se trataron células de las neuroesferas de GBM indicadas sembradas en placas a 100 células/µl con los compuestos indicados durante 7 días. Las neuroesferas se disociaron después, se volvieron a sembrar en placas en ausencia de tratamiento y se incubaron durante otros 7 días. Se contó el número total de neuroesferas recién formadas.

PCR cuantitativa en tiempo real

60 La PCR cuantitativa en tiempo real (cRT-PCR) se realizó usando sondas Taqman de Applied Biosystems, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las reacciones se llevaron a cabo en un detector de secuencias ABI 7900 (Perkin Elmer) y los resultados se expresaron como el número de cambios calculados por el método $\Delta\Delta C_t$ respecto a la muestra control. El GAPDH se usó como control de normalización interno.

Inmunohistoquímica, inmunocitoquímica

Para la generación de micromatriz tisular, se tomaron tres núcleos de 0,6 mm de áreas distintas y cada uno se introdujo en bloques receptores en una malla con una separación de 1 mm. Los siguientes anticuerpos se usaron para la detección de proteínas: anti-Id1 (BioCheck), anti-CD44 (Ab-4, Neomarkers), anti-CD31 (clon JC70A, DAKO). Para el análisis cuantitativo de Id1, se evaluaron el porcentaje de células tumorales teñidas y la intensidad de la tinción en campos representativos de alta potencia (x 400) sobre secciones de tejido usando microscopía óptica. Los resultados se expresaron como la puntuación H o el porcentaje de células positivas.

La inmunocitoquímica de Id 1 (Santa Cruz Biotechnology) de las neuroesferas se realizó como se ha descrito previamente en (Geschwind et al., Neuron, 29:325-329, 2001). Los núcleos se contratiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI).

Microdissección

Las áreas de tumor representativo, lejanas de los focos necróticos, se identificaron sobre secciones de 10 µm teñidas con hematoxilina-eosina de muestras congeladas. Las células tumorales se microdisseccionaron usando el Microdisector Leica LMD6000 y se procesaron para obtener ARN usando el RNAeasy Micro Kit (Qiagen) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Ensayo de la luciferasa

Se transfectaron células con neuroesferas de GBM de forma transitoria con diferentes construcciones indicadoras del promotor de ID1 y el plásmido de la luciferasa de Renilla pRL-TK (Promega) como control de normalización usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen).

Ejemplo 1: Línea celular de hibridoma productora de anticuerpos dirigidos contra el LIF humano

Se generaron líneas celulares de hibridoma para la producción de anticuerpos dirigidos contra el LIF humano mediante métodos bien conocidos para el experto en la materia. A partir de estas líneas celulares de hibridoma, se seleccionó una línea celular y se depositó el 1 de abril de 2010 por el Vall d'Hebron Institute of Oncology en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. Se le asignó el número de acceso DSM ACC3054. De acuerdo con ello, también se seleccionó la población homogénea de anticuerpos producidos por dicha línea celular. Posteriormente, se determinó por inmunoprecipitación la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales anti-LIF humano (α -LIF) producidos por la línea celular de hibridoma con el número de acceso DSM ACC3054, depositada el 1 de abril de 2010 por el Vall d'Hebron Institute of Oncology en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. A tal fin, las células 293T que se habían transfectado con versiones marcadas con EGFP en el extremo C-terminal de la proteína LIF humana (Figura 1A) se lisaron y sometieron a inmunoprecipitación con el anticuerpo monoclonal anti-LIF, seguido de la adición de proteína A/G a los lisados y elución de inmunoprecipitados. Los fragmentos de LIF se detectaron mediante inmunotransferencia usando un anticuerpo anti-EGFP. Este análisis reveló que dicho anticuerpo reconoce el LIF y variantes de los mismos, siempre que esté presente el dominio C-terminal de la proteína LIF humana comprendida por los aminoácidos 160 a 202. El LIF de longitud completa marcado con EGFP, pero no los fragmentos de LIF marcados con EGFP correspondientes a los aminoácidos 1 a 72, 1 a 127 o 1 a 160 se reconocieron por el anticuerpo monoclonal (Figura 1B). Por tanto, el dominio en C-terminal de la proteína LIF humana comprendido en los aminoácidos 160 a 202 se requiere para el reconocimiento por el anticuerpo anti-LIF (Figura 1C).

Ejemplo 2: El anticuerpo monoclonal anti-LIF bloquea la inducción de Phospho-Stat3 mediante el LIF en el cultivo celular y en neuroesferas con glioblastoma derivadas de pacientes.

Para analizar el efecto del anticuerpo monoclonal anti-LIF producido por la línea celular de hibridoma depositada el 1 de abril de 2010 por el Vall d'Hebron Institute of Oncology en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH para determinar su eficacia en el bloqueo de los efectos cadena abajo del LIF, se trataron células U373 con o sin LIF recombinante humano en presencia o ausencia del anticuerpo monoclonal indicado, o en presencia de una IgG de isotipo equivalente como control. La posterior determinación de los niveles de Phospho-Stat3 mediante transferencia de Western mostró que la inducción mediada por LIF de Phospho-Stat3 puede bloquearse con eficacia mediante la administración del anticuerpo monoclonal anti-LIF (Figura 2A).

Para analizar el efecto de dicho anticuerpo sobre las células cancerosas derivadas del paciente, las neuroesferas de GBM derivadas del paciente se separaron e incubaron opcionalmente en presencia de dicho anticuerpo o IgG control de isotipo equivalente. La posterior determinación de los niveles de Phospho-Stat3 mediante transferencia de Western mostró que la inducción mediada por LIF de Phospho-Stat3 puede bloquearse con eficacia mediante la administración del anticuerpo monoclonal anti-LIF en las células derivadas del paciente (Figura 2B).

Ejemplo 3: Las neuroesferas de GBM derivadas del paciente contienen un compartimento celular CD44^{alto}/Id1^{alto}

CD44 es una proteína que se ha descrito que tiene una expresión muy elevada en las CIC de ciertos tumores (Visvader and Lindeman, Nat. Rev. Cancer, 8:755-768, 2008). De acuerdo con ello, los autores del presente estudio observaron

que en las neuroesferas de GBM había dos poblaciones pequeñas que expresaban diferentes niveles de CD44 (Figura 3A). No obstante, en el glioma, hasta ahora no se ha estudiado extensamente el compartimento de CD44^{alto}. Con el fin de analizar si la expresión de CD44 se correlaciona con la expresión de Id1 en células derivadas de neuroesferas de pacientes, la población CD44^{alto} de neuroesferas de cuatro pacientes diferentes se clasificó mediante citometría de flujo tras la tinción de las células como se ha descrito en "Materiales y Métodos". Posteriormente, se determinaron los niveles de expresión de Id1 en las poblaciones de CD44^{alto} y de CD44^{bajo}, respectivamente. Es interesante el hecho de que la proteína Id1 y el ARN se detectaran a niveles mucho más altos en el compartimento de CD44^{alto} que en el compartimento de CD44^{bajo} (Figura 3B y 3C). Es interesante el hecho de que Id3 también estuviera presente a niveles más altos en la población CD44^{alto}, no obstante, este no fue el caso para Id2, otro miembro de la familia Id de factores de transcripción (Figura 3B). Por tanto, los niveles elevados de CD44 se correlacionan con niveles altos de Id1 y de Id3.

Ejemplo 4: La población de CD44^{alto}/Id1^{alto} en las neuroesferas de GBM está enriquecida para las células iniciadoras de glioma.

Los autores observaron que, tras la inducción de la diferenciación de las neuroesferas derivadas de pacientes mediante el tratamiento con suero, el compartimento de CD44^{alto} desaparecía (Figura 4A). Después, las células CD44^{alto} y CD44^{bajo} se clasificaron y sembraron en placas a una densidad baja. Las células CD44^{alto} generaron más neuroesferas que el compartimento CD44^{bajo} (Figura 4B), lo que indica que las células CD44^{alto} tenían una capacidad formadora de neuroesferas mayor que las células CD44^{bajo}. A continuación, se analizó la capacidad iniciadora de tumor de CD44^{alto} en comparación con el compartimento CD44^{bajo}. Las células tumorales se clasificaron basándose en la expresión de CD44 y se realizaron diluciones límite *in vivo* implantando cantidades decrecientes de células en el estriado derecho de ratones NOD-SCID. La progresión del tumor se monitorizó mediante imágenes de resonancia magnética (IRM). Las células que expresaban niveles elevados de CD44 fueron mucho más tumorigénicas que las que expresaban CD44bajo. Solo 1 de 7 ratones a los que se inocularon 100.000 células CD44^{bajo} desarrollaron tumores, mientras que 9 de 9 ratones generaron tumores cuando se les inoculó el mismo número de células CD44^{alto} (Figura 4C y 4D). Además, los ratones a los que se inocularon 10.000 o 1.000 CD44^{alto} generaron tumores, mientras que el mismo número de CD44^{bajo} nunca generó tumores. Se obtuvo un resultado similar con células de otro paciente, GBM2 (Figura 4D). Los tumores generados por el compartimento CD44^{alto} reprodujeron las características histopatológicas del tumor del paciente, incluyendo la misma heterogeneidad celular (Figura 4E). Por ejemplo, los tumores generados en el ratón contenían el mismo porcentaje (aproximadamente el 70 %) de células positivas y negativas para Sox2 que el tumor del paciente (Figura 4E). Todos los resultados indicaron que el compartimento CD44^{alto} estaba enriquecido para CIG como se ha mostrado en otros tipos de tumores.

Ejemplo 5: El anticuerpo anti-LIF disminuye los niveles de la población CD44^{alto}/Id1^{alto} en neuroesferas de GBM.

Las neuroesferas de GBM se disociaron y cultivaron en presencia de anticuerpo monoclonal anti-LIF de la línea celular DSM ACC3054 o IgG control de isotipo equivalente durante 7 días en presencia (A) o en ausencia (B) de EGF y FGF. Cabe destacar que las neuroesferas tratadas con el anticuerpo anti-LIF disminuían el compartimento CD44^{alto}. Por tanto, el TGFβ regula el compartimento CD44^{alto} que expresa niveles elevados de Id1 y está enriquecido para CIG.

Ejemplo 6: el anticuerpo anti-LIF disminuye los niveles de CD44 y Id1 en neuroesferas de GBM derivadas de paciente.

Las neuroesferas de GBM se disociaron y cultivaron en presencia de anticuerpo monoclonal anti-LIF o IgG control de isotipo durante 7 días en ausencia de EGF y FGF y los niveles de ARNm de los genes indicados se analizaron mediante cRT-PCR. En comparación con la IgG control de isotipo equivalente, los niveles de ARNm de Id1, así como los niveles de ARNm de CD44, se reducían significativamente tras la aplicación del anticuerpo anti-LIF en neuroesferas de GBM derivadas de pacientes.

Ejemplo 7: El tratamiento *in vivo* con el anticuerpo anti-LIF disminuye el compartimento celular CD44^{alto}/Id1^{alto}.

Con el fin de evaluar si la disminución de la población de CIG en los tumores en respuesta a la aplicación del anticuerpo monoclonal anti-LIF afecta a la recaída tumoral, los autores de la presente invención generaron primero tumores en ratones a través de la inoculación de neuroesferas de GBM1. Un mes después de la inoculación de las células, los ratones eran portadores de tumores que se detectaron mediante IRM. En ese punto, los ratones fueron tratados con el anticuerpo monoclonal anti-LIF o IgG de isotipo equivalente durante 10 días y fueron sacrificados. Las células tumorales humanas se aislaron del cerebro de ratón mediante clasificación de células humanas positivas para MHC-1 (Figura 7A).

Las células obtenidas de ratones tratados con el inhibidor de T3RI mostraron menores niveles de los transcritos de *ID1*, *ID3* y *CD44* medidos mediante cRT-PCR (Figura 7B).

Ejemplo 8

Los pacientes con glioma o glioblastoma que muestran regulación por aumento de los niveles de LIF tienen una esperanza de vida global más corta

En una subpoblación de todos los pacientes de glioma, los niveles de LIF están regulados por aumento ≥ 2 veces. En un periodo de tiempo fijado, los pacientes tienen una probabilidad significativamente reducida de supervivencia en comparación con los pacientes control. Por ejemplo, la probabilidad de supervivencia tras 1.000 días se reduce a aproximadamente el 50 % en comparación con todos los pacientes de glioma, y a aproximadamente un 35 % en comparación con los pacientes de glioma con niveles de LIF no regulados por aumento ≥ 2 veces (Figura 8). Datos obtenidos del programa REpository for Molecular BRAIn Neoplasia DaTa (REMBRANDT) del National Cancer Institute.

En una subpoblación de todos los pacientes con glioblastoma, los niveles de LIF están regulados por aumento ≥ 9 veces. En un periodo de tiempo fijado, esos pacientes tienen una probabilidad significativamente reducida de supervivencia en comparación con los pacientes control. Por ejemplo, la probabilidad de supervivencia tras 500 días se reduce a aproximadamente un 50 % en comparación con todos los pacientes de glioblastoma (Figura 9). Datos obtenidos del programa REpository for Molecular BRAIn Neoplasia DaTa (REMBRANDT) del National Cancer Institute.

15 **Realizaciones preferidas de la invención**

Las siguientes son realizaciones preferidas de la presente invención. Sin embargo, la invención no debe considerarse limitada a estas realizaciones preferidas:

20 1. Un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo, que reconoce el LIF humano de longitud completa, pero no reconoce un fragmento de LIF correspondiente a los aminoácidos 1 a 72 y, más preferentemente, no reconoce un fragmento de LIF correspondiente a los aminoácidos 1 a 127, e incluso más preferentemente, no reconoce un fragmento de LIF correspondiente a los aminoácidos 1 a 160.

25 2. El anticuerpo monoclonal de la realización 1, en el que dicho anticuerpo reconoce un epítipo del LIF humano comprendido en la región correspondiente a los aminoácidos 160 a 202 del LIF humano.

3. El anticuerpo monoclonal de la realización 1, en el que dicho anticuerpo reconoce un epítipo comprendido en las regiones seleccionadas de las siguientes: una región correspondiente a los aminoácidos 160 a 180, una región correspondiente a los aminoácidos 170 a 190, una región correspondiente a los aminoácidos 180 a 200, una región correspondiente a los aminoácidos 182 a 202 del LIF humano.

30 4. El anticuerpo monoclonal de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones precedentes, en el que el anticuerpo se inhibe competitivamente en su unión al LIF humano por el anticuerpo monoclonal producido por un hibridoma depositado el 1 de abril de 2010 por el Vall d'Hebron Institute of Oncology en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.

5. El anticuerpo monoclonal de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones precedentes del isotipo IgG1.

35 6. El anticuerpo monoclonal de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, producido por la línea celular de hibridoma con el número de acceso DSM ACC3054 depositado el 1 de abril de 2010 por el Vall d'Hebron Institute of Oncology en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.

7. Un hibridoma depositado el 1 de abril de 2010 por el Vall d'Hebron Institute of Oncology en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.

40 8. Un reactivo inmunoanalítico usado en la medición del LIF humano, que comprende el anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 6.

9. El anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 6, en el que dicho anticuerpo o fragmento del mismo actúa a través de la inhibición de la autorregeneración de células madre de tumor.

45 10. Un anticuerpo o fragmento del mismo dirigido contra el LIF humano para el tratamiento de una enfermedad asociada a la proliferación celular no deseada.

11. El anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 6 o 9 para el tratamiento de una enfermedad asociada a la proliferación celular no deseada.

50 12. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 6 o 9 a 11 junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

55 13. Método *in vitro* para el diagnóstico de enfermedades asociadas a la proliferación celular no deseada en un sujeto o para determinar la predisposición de un sujeto a sufrir dicha enfermedad asociada a la proliferación celular no deseada, o para determinar el estadio o gravedad de dicha enfermedad asociada a la proliferación celular no deseada en un sujeto o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un sujeto con dicha enfermedad asociada a la proliferación celular no deseada, que comprende cuantificar los niveles de expresión de LIF o de una variante funcionalmente equivalente del mismo, o de CD44 o de una variante funcionalmente equivalente del mismo, o de Id1 o de una variante funcionalmente equivalente de la misma, o de Id3 o de una variante funcionalmente equivalente de la misma, o de cualquier combinación de estas moléculas en una muestra biológica de dicho sujeto, en el que un incremento de la expresión del gen que codifica LIF o de una variante funcionalmente equivalente del mismo, o de CD44 o de una variante funcionalmente equivalente del mismo, o de Id1 o de una variante funcionalmente equivalente de la misma, o de Id3 o de una variante funcionalmente equivalente de la misma, o de cualquier combinación de estas moléculas, con respecto a los niveles de expresión del gen que codifica LIF o de una variante funcionalmente equivalente del mismo, o de CD44 o de una variante funcionalmente equivalente del mismo, o de Id1 o de una variante funcionalmente equivalente de la misma, o de Id3 o de una variante funcionalmente equivalente de la misma, o de cualquier combinación de estas moléculas en una muestra

control, es indicativo de una enfermedad asociada a la proliferación celular no deseada o de una mayor predisposición de dicho sujeto a sufrir una enfermedad asociada a la proliferación celular no deseada o de la falta de respuesta a la terapia administrada a dicho sujeto.

14. El uso de un kit que comprende reactivos para la cuantificación de los niveles de expresión de LIF o de una variante funcionalmente equivalente del mismo, o de CD44 o de una variante funcionalmente equivalente del mismo, o de Id1 o de una variante funcionalmente equivalente de la misma, o de Id3 o de una variante funcionalmente equivalente de la misma, o de cualquier combinación de estas moléculas, para el diagnóstico de una enfermedad asociada a la proliferación celular no deseada en un sujeto o para determinar la predisposición de un sujeto a sufrir dicha enfermedad, o para determinar el estadio o gravedad de dicha enfermedad en un sujeto, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un sujeto con dicha enfermedad, en el que si los reactivos detectan un incremento en la expresión de dicho gen o dicha proteína o una variante funcionalmente equivalente de la misma con respecto a una muestra control, dicho sujeto puede sufrir dicha enfermedad o presentar una mayor predisposición a sufrir dicha enfermedad o presentar mayor gravedad de dicha enfermedad o la terapia administrada no está siendo eficaz.

15. Un método *in vitro* para diseñar una terapia individualizada para un paciente que sufre una enfermedad asociada a un incremento de los niveles de LIF, que comprende:

- (a) cuantificar los niveles de expresión de LIF en dicho paciente, y
- (b) comparar dichos niveles de expresión con los niveles control, en el que, si los niveles de expresión de LIF en dicho paciente son mayores que los valores control, se administra a dicho paciente un anticuerpo frente a LIF.

16. Un método *in vitro* para seleccionar pacientes que sufren una enfermedad asociada a la proliferación celular no deseada, para ser tratados con un anticuerpo dirigido contra LIF, que comprende

- (a) cuantificar los niveles de expresión de LIF en dicho paciente, y
- (b) comparar dichos niveles de expresión con los niveles control, en el que, si los niveles de expresión de LIF en dicho paciente son mayores que los valores control, dicho paciente se selecciona para recibir tratamiento con el anticuerpo de acuerdo con las realizaciones 1 a 6 o 9 a 12 o un fragmento del mismo.

17. Un método *in vitro* para el pronóstico de la esperanza de vida o de la probabilidad de supervivencia de los sujetos que sufren enfermedades asociadas a la proliferación celular no deseada, que comprende la cuantificación de los niveles de expresión de LIF o un equivalente funcional del mismo en una muestra biológica de dicho sujeto, en el que un incremento de la expresión de LIF o un equivalente funcional del mismo, con respecto a la expresión de LIF o su equivalente funcional en una muestra control, es indicativo de una menor esperanza de vida.

18. El anticuerpo o fragmento del mismo o la composición farmacéutica, o el método o el kit de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 10 a 14, en el que dicha enfermedad que presenta una proliferación celular no deseada se caracteriza por presentar niveles elevados de LIF.

19. El anticuerpo o fragmento del mismo o la composición farmacéutica, o el método o el kit de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 10 a 17, en el que dicha enfermedad que presenta una proliferación celular no deseada se caracteriza por una población celular que expresa niveles elevados de CD44 e Id1.

20. El anticuerpo o fragmento del mismo o la composición farmacéutica, o el procedimiento o el kit de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 10 a 19, en el que dicha enfermedad que presenta una proliferación celular no deseada es cáncer.

21. El anticuerpo o fragmento del mismo o la composición farmacéutica, o el método o el kit de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 18 a 20, en el que dicho cáncer es uno de los siguientes: glioma, leucemia linfoblástica aguda de células pre-B, leucemia mieloide aguda, adenocarcinoma de pulmón, adenocarcinoma de próstata, carcinoma colorrectal, cáncer de vejiga, cáncer ductal de mama o carcinoma de mama.

22. El anticuerpo o fragmento del mismo o la composición farmacéutica, o el método o el kit de acuerdo con la realización 21, en el que dicho glioma es glioma de grado IV.

23. El método o el kit de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 13 a 22, en el que la cuantificación de los niveles de LIF se realiza por medio de transferencia de Western, inmunohistoquímica o ELISA.

24. El método o el kit de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 13 a 23, en el que el método o el kit para medir los niveles de expresión de LIF comprende el anticuerpo monoclonal de acuerdo con las realizaciones 1 a 6 o 9 o un fragmento del mismo.

25. El anticuerpo o fragmento del mismo o la composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 6, o 9 a 12 o 20 a 22, en el que dicho anticuerpo o fragmento del mismo es capaz de reducir la población celular caracterizada por niveles altos de CD44 y de Id1.

26. El anticuerpo o fragmento del mismo o la composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 6, 9 a 12 o 20 a 22, en el que dicho anticuerpo actúa a través de la inhibición de la autorregeneración de las células madre de tumor.

27. El anticuerpo o fragmento del mismo o composición farmacéutica o kit o método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el término "LIF o una variante funcionalmente equivalente del mismo, o CD44 o de una variante funcionalmente equivalente del mismo, o Id1 o de una variante funcionalmente equivalente de la misma o Id3 o de variante funcionalmente equivalente de la misma" está limitado a LIF o una variante

equivalente funcionalmente del mismo.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo, que reconoce el LIF humano de longitud completa, pero no reconoce un fragmento de LIF correspondiente a los aminoácidos 1 a 160, donde el anticuerpo se produce por la línea celular de hibridoma DSM ACC3054, depositada el 1 de abril de 2010 por el Vall d'Hebron Institute of Oncology en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.
- 10 2. La línea celular de hibridoma DSM ACC3054, depositada el 1 de abril de 2010 por el Vall d'Hebron Institute of Oncology en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.
- 15 3. Un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 o una composición farmacéutica que comprende dicho anticuerpo o fragmento del mismo para uso en el tratamiento de cánceres.
- 20 4. El anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicho anticuerpo o fragmento del mismo actúa mediante la inhibición de la autorregeneración de células madre tumorales.
- 25 5. El anticuerpo o fragmento del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicho anticuerpo o fragmento del mismo es capaz de reducir la población celular caracterizada por altos niveles de CD44 e Id1.
- 30 6. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
7. Un reactivo inmunoanalítico usado en la medición de LIF humano, que comprende el anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1.
8. El anticuerpo o fragmento del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el cáncer es uno de los siguientes: glioma, leucemia linfoblástica aguda de células pre-B, leucemia mieloide aguda, cáncer de pulmón, carcinoma colorrectal, cáncer de vejiga, cáncer ductal de mama, carcinoma de mama, cáncer de ovario o cáncer pancreático.
9. El anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el glioma es glioma de grado IV.

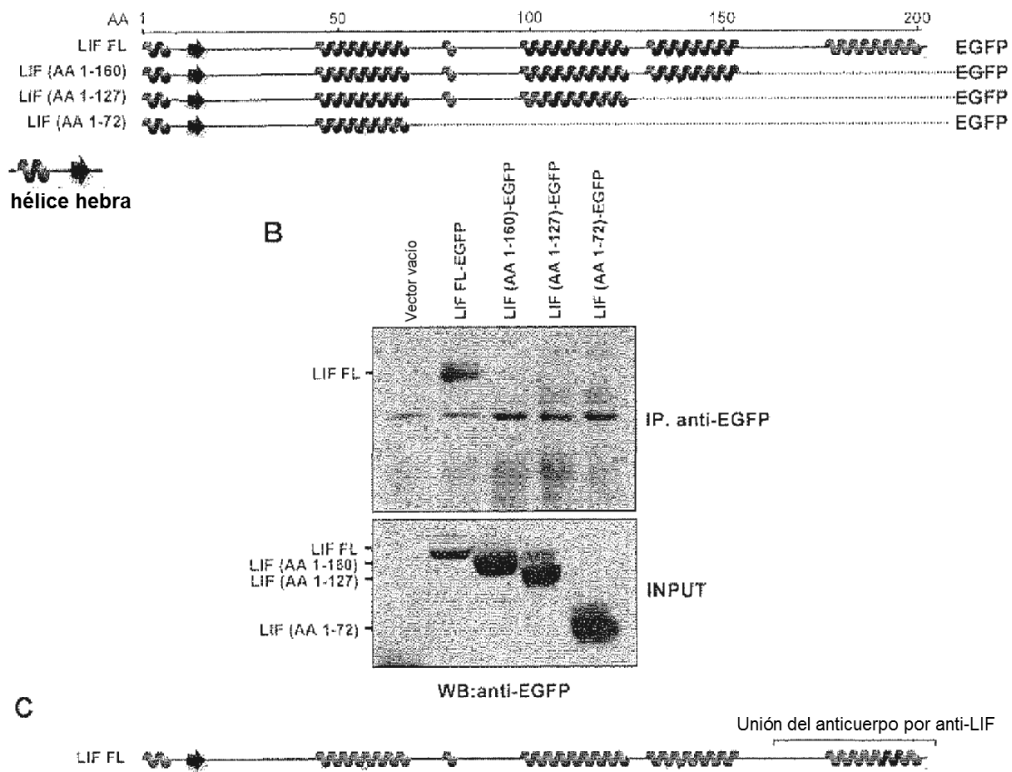
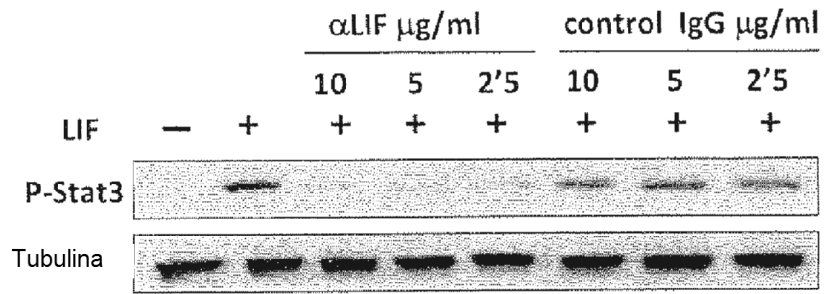


FIGURA 1

A



B

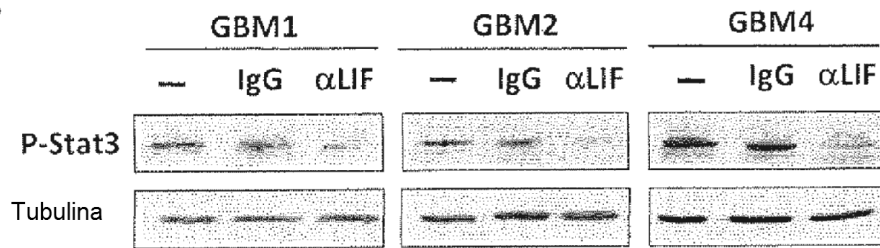


FIGURA 2

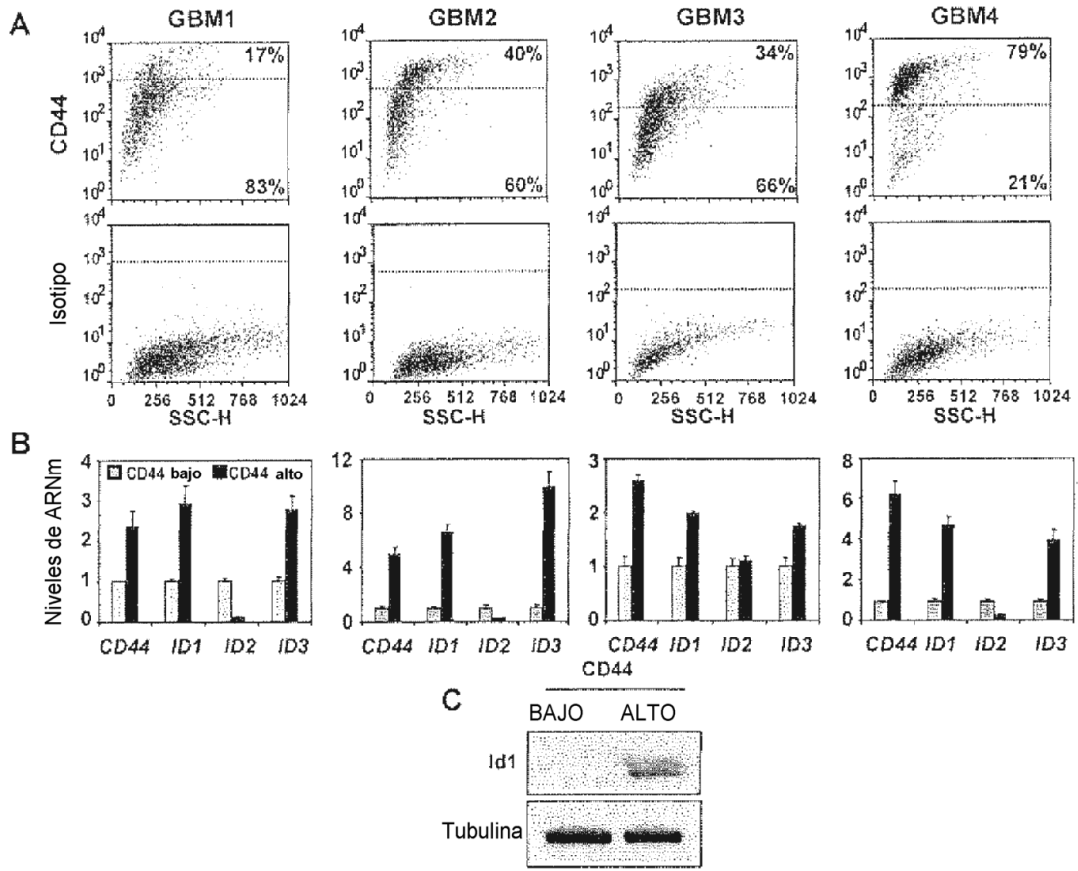


FIGURA 3

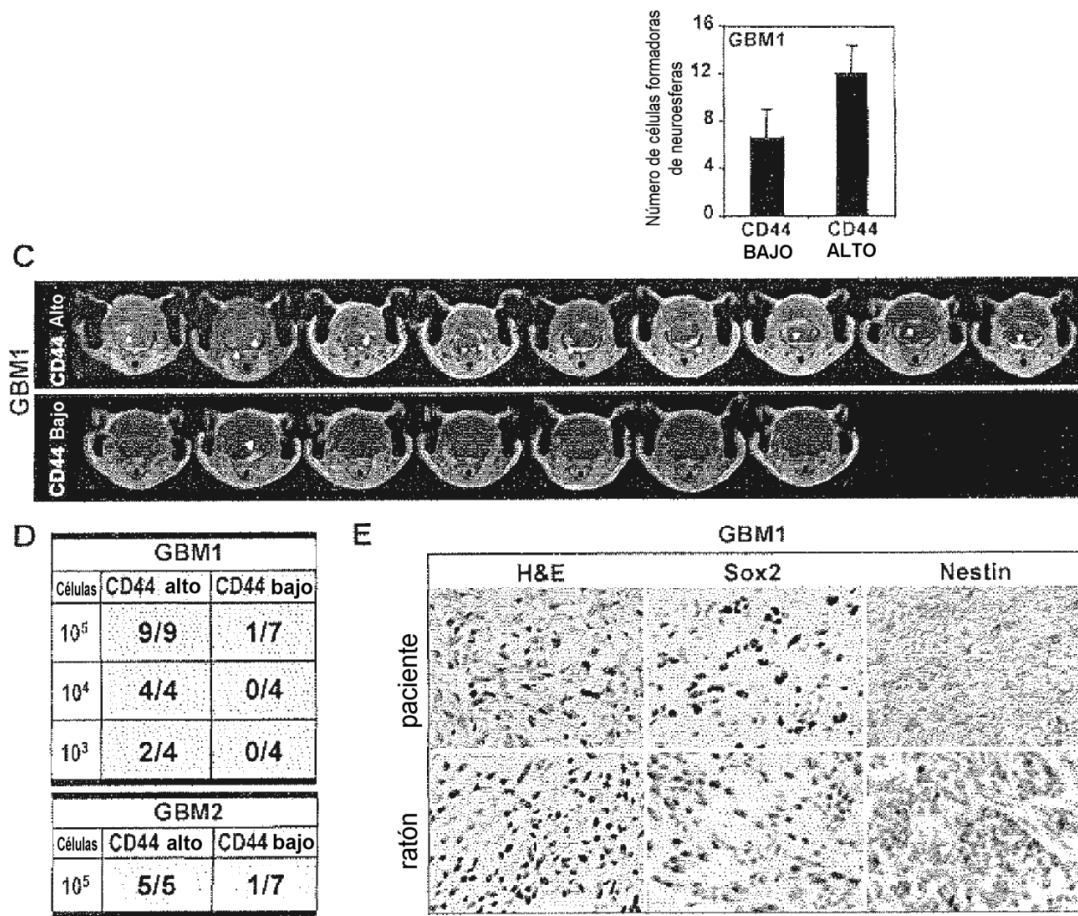


FIGURA 4

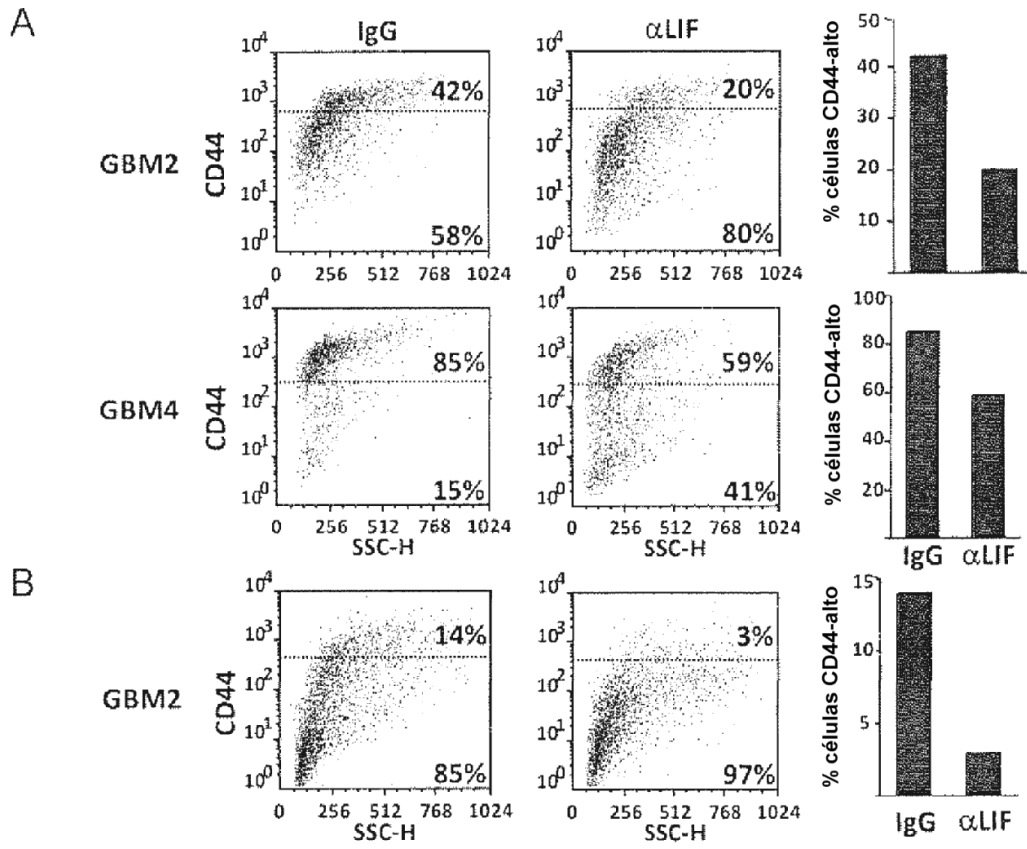


FIGURA 5

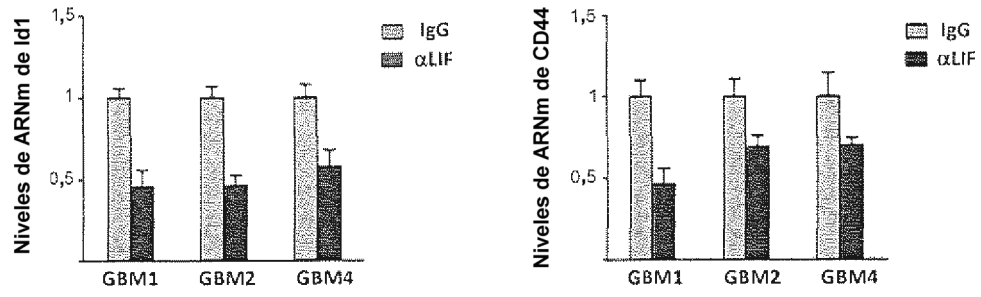


FIGURA 6

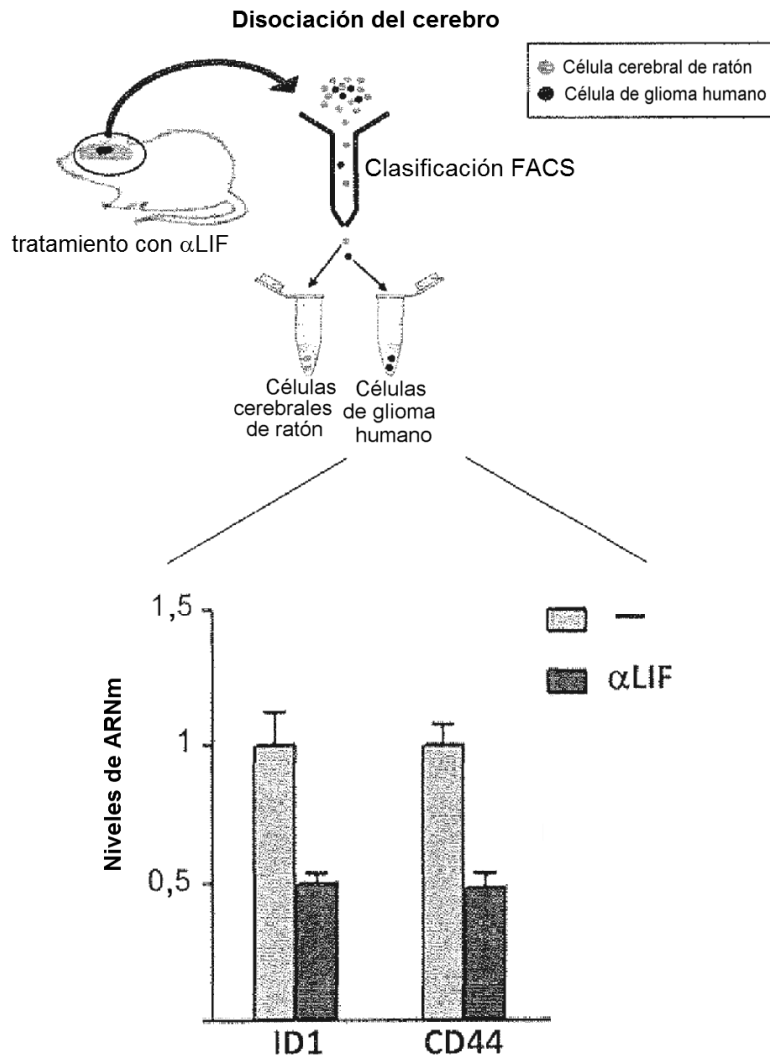


FIGURA 7

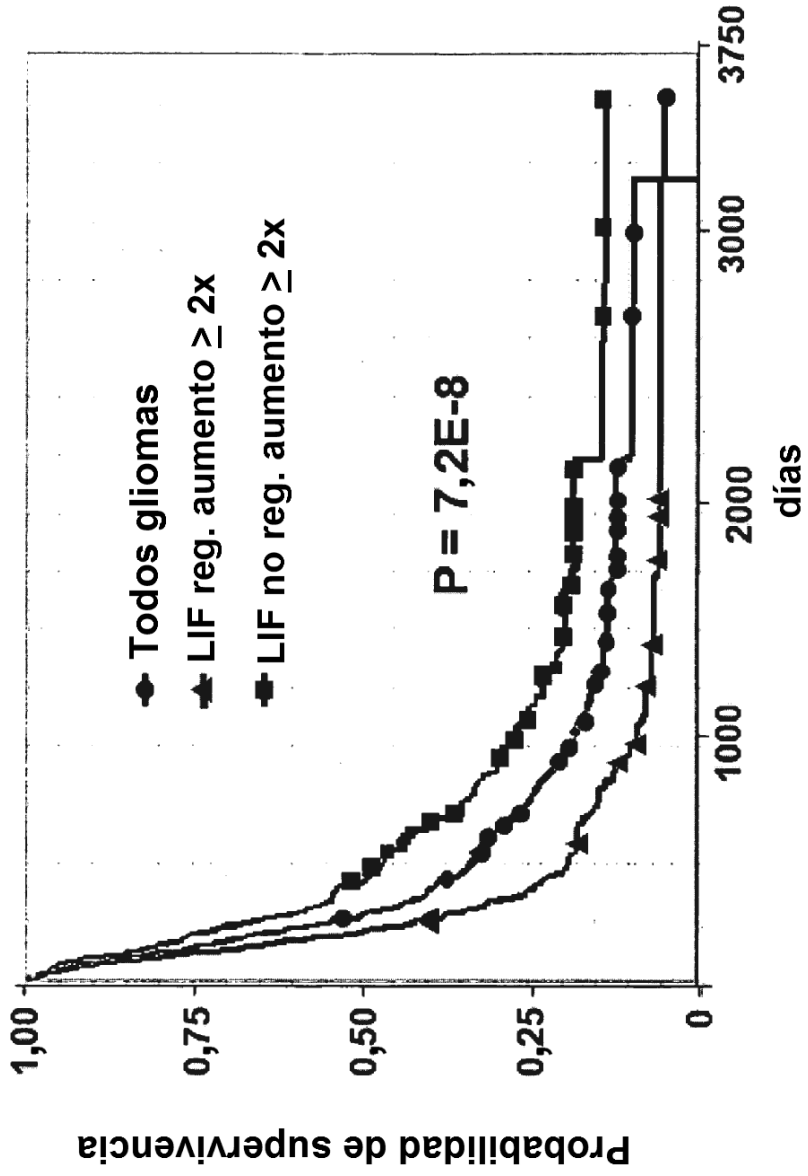


Figura 8

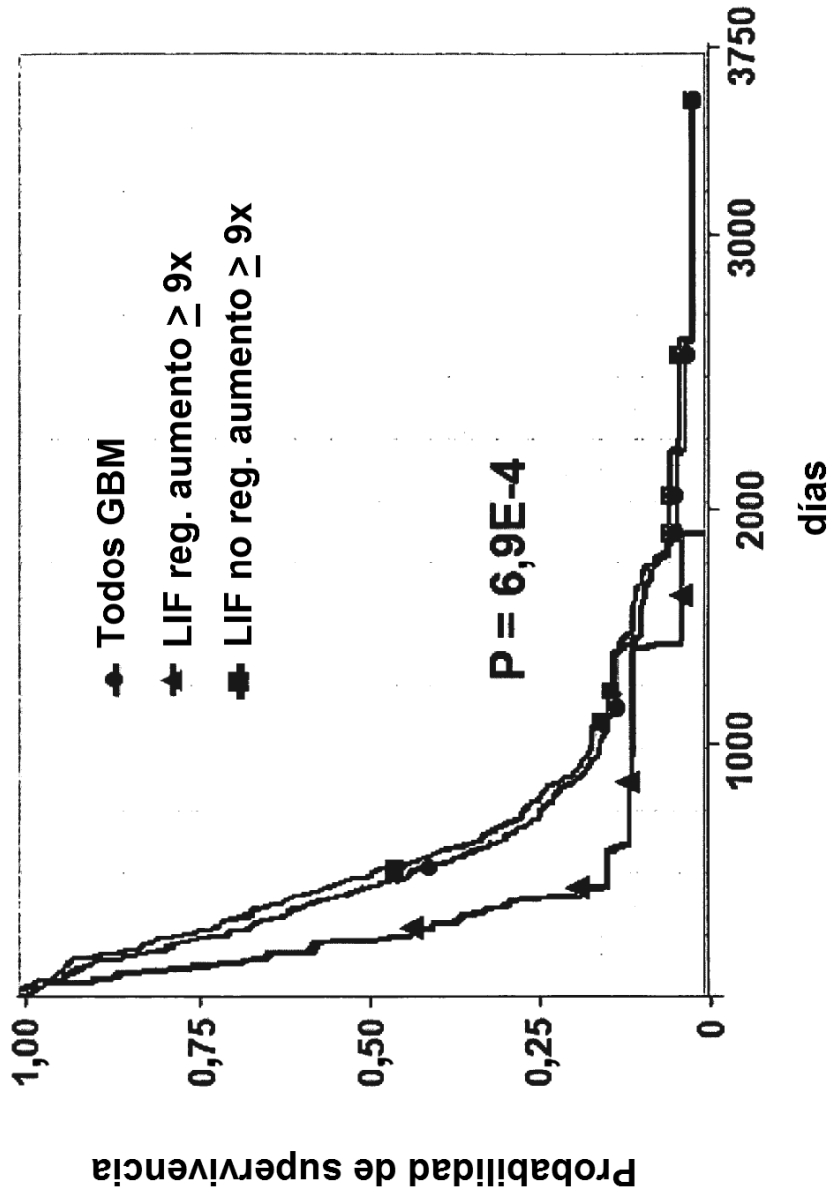


Figura 9