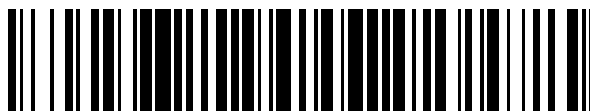


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 195**

51 Int. Cl.:
A61P 35/02 (2006.01)
A61K 38/07 (2006.01)
A61K 35/55 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05764348 .8**
96 Fecha de presentación: **04.08.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1781377**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.05.2007**

54 Título: **Inhibidor de elastasa en leucemia**

30 Prioridad:
10.08.2004 IL 16345304

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.05.2012

73 Titular/es:
**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO.,
LTD.
THE WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE P.O.
BOX 95
76100 REHOVOT, IL**

72 Inventor/es:
**LAPIDOT, Tsvee;
TAVOR, Sigal y
PETIT, Isabelle**

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 381 195 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

Inhibidor de elastasa en leucemia

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La invención se refiere al uso de un inhibidor de elastasa en el tratamiento de la leucemia humana, tal como la leucemia mielógena aguda (abreviadamente en lo sucesivo AML, por la expresión inglesa *Acute Myelogeneous Leukemia*) con un inhibidor de elastasa.

FUNDAMENTO DE LA INVENCIÓN

10 Las células madre son capaces de auto-renovación y división, lo que conduce a más células madre y a células diferenciadas. Las células madre hematopoyéticas (abreviadamente HSC, por la expresión inglesa *Hematopoietic Stem Cells*) o las células madre progenitoras (HPC, por la expresión inglesa *Hematopoietic Progenitor Cells*) tienen la propiedad de dar lugar a suficiente actividad hematopoyética para evitar que un receptor irradiado letalmente sufra una insuficiencia hematopoyética (Morrison et al., 1995).

15 La médula ósea contiene células madre mesenquimales y hematopoyéticas. Las células madre mesenquimales dan lugar a los linajes adipocíticos, condrocíticos y osteocíticos, incluyendo las células estromales de la médula ósea (Pittenger et al., 1999). Se ha encontrado que las células madre hematopoyéticas (HSC) dan lugar a los linajes linfoides, mieloides y eritrocíticos.

20 En el ratón, las HSC representan una escasa población de 0,01% de la médula ósea completa y han sido aisladas usando una combinación de marcadores: linaje Thy^{low} - Scat+ c-kit^{high} (KTLS). En seres humanos las células madre hematopoyéticas CD34+ Thy-1+ Lin- son las equivalentes humanas de las células madre hematopoyéticas KTLS de ratón (Ikuta et al., 1992).

25 Los mecanismos que guían a las células progenitoras hematopoyéticas circulantes (HPC o HSC) son clínicamente significativos debido a que el éxito del trasplante de células madre depende de la focalización eficaz de las células injertadas en la médula ósea del receptor (Mazo and von Adrian, 1999). Debido a esta focalización (migración dirigida) de las células trasplantadas es por lo que los trasplantes de médula ósea pueden ser realizados por una sencilla infusión intravenosa, en lugar de requerir una cirugía invasiva, como sucede en el caso del trasplante de cualquier otro órgano. La migración dirigida de las HPC se puede definir como el conjunto de interacciones moleculares que permiten circular las HPC para reconocer, adherirse y migrar a través de las células endoteliales de la médula ósea, dando como resultado la acumulación de las HPC en el microambiente único promotor de la hematopoyesis de la médula ósea. La migración dirigida de las células progenitoras se puede concebir como un fenómeno de múltiples etapas. Las HPC que llegan a la médula ósea deben interactuar primeramente con la superficie luminal del endotelio de la médula ósea. Esta interacción debe ocurrir en segundos después de que las HPC hayan entrado en la microvasculatura de la médula ósea y proporcionen suficiente resistencia mecánica para permitir que las células adherentes resistan la fuerza de cizallamiento ejercida por la sangre circulante. Las HPC adherentes deben pasar luego a través de la capa endotelial para entrar en el compartimento hematopoyético. 35 Después de extravasación, las HPC encuentran células estromales especializadas cuya yuxtaposición soporta el mantenimiento de la mezcla inmadura de células por un proceso de auto-renovación además de diferenciación, proliferación y maduración de las HPC específicas del linaje, que es un proceso que implica citoquinas derivadas del estroma y otras señales de crecimiento.

40 Se ha descrito que el factor SDF-1, también denominado factor estimulante del crecimiento de los linfocitos pre-B (PBSF, por la expresión inglesa *pre-B-cell growth-stimulating factor*), es un potente agente de atracción química (quimioquina) para linfocitos, monocitos y células CD34+ primarias. El SDF-1 es un factor quimiotáctico que induce la migración de células y la dirección del movimiento celular es determinada por el gradiente de concentración del SDF-1 (Kim and Broxmeyer, 1998), bajo en la sangre periférica y alto en la médula ósea. Puesto que el SDF-1 es producido por las células estromales de la médula ósea, se estableció la hipótesis de que se forma un gradiente de SDF-1 entre el microambiente de la médula ósea y el sistema sanguíneo. Este gradiente atrae a las HPC y las retiene en el microambiente de la médula ósea, a no ser que este gradiente sea roto en la sangre por moléculas efectoras administradas o inducidas.

50 El receptor de SDF-1, CXCR4, se expresa en muchos tipos de células, incluyendo células de la médula ósea, células de la médula ósea movilizadas, células de la sangre del cordón umbilical, incluyendo las sub-población de las células CD34+ de la sangre del cordón umbilical, células CD34+CD38-, que son células precursoras hematopoyéticas pluripotentes. El tratamiento de las HPC humanas, células CD34+, con anticuerpos anti-CXCR4 antes del trasplante da como resultado la inhibición del injerto de médula ósea en ratones NOD/SCID trasplantados (Peled et al., *Science* 1999).

55 Las células CD34+ humanas inmaduras y las células primitivas CD34+/CD38-/low, que no migran hacia un gradiente de SDF-1 *in vitro*, y no se dirigen a la médula ósea de muridos, ni la repueblan *in vivo*, pueden llegar a ser células repobladoras funcionales por estimulación *in vitro* durante un corto plazo de 16 a 48 horas con citoquinas, tales como SLF e IL-6 antes del trasplante (Kollet et al., 2000, Peled et al., 1999 Lapidot, 2001). Estas citoquinas

aumentan la expresión de CXCR4 en la superficie, la migración hacia SDF-1 *in vitro*, la migración dirigida y la repoblación *in vivo*.

Se ha descrito que el SDF-1 es también un factor clave en la estimulación de la adherencia de las células madre humanas a las células endoteliales en la microvasculatura de la médula ósea (Peled et al., *The Journal of Clinical Investigation*, 1999). Por lo tanto, el SDF-1 está implicado no solamente como factor quimiotáctico de las células madre y progenitoras, sino también como mediador de la adhesión celular dependiente de integrinas y de la migración transendotelial requerida para el injerto en la médula ósea.

En toda la vida adulta, el sistema hematopoyético se mantiene por producción constante de células linfoides, mieloides y eritroides maduras, que son liberadas desde la médula ósea (abreviadamente BM, por la expresión inglesa *Bone Marrow*) a los órganos periféricos y secundarios. Curiosamente, las células madre hematopoyéticas, que residen principalmente en la BM, se encuentran también circulando en la sangre en concentraciones muy bajas. Esta salida de células maduras e inmaduras adecuadas debe estar muy bien regulada, pero los mecanismos moleculares que controlan la migración y salida de células no están caracterizados ampliamente.

Las HPC pueden ser movilizadas desde la médula ósea hasta la sangre periférica en respuesta a citoquinas inyectadas, tales como el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GMC-SF), el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y el factor de Steel (SLF) [Siena et al., 1989, Dührsen et al., 1988, Drize et al., 1996]. La movilización de células madre desde la médula ósea del donante hasta la sangre y su recuperación de la sangre, para métodos de trasplante, se está usando cada vez más en todo el mundo, y está reemplazando a la recuperación de estas células madre de la médula ósea del donante usando cirugía invasiva.

La movilización permite la repoblación de la médula ósea con HSC propias, recuperadas y reservadas de los pacientes antes de los tratamientos de irradiación y quimioterapéuticos (trasplante autólogo). La recuperación de las HSC es mayor a partir de la movilización que de la sangre del cordón umbilical o por cirugía de la médula ósea.

Los estudios dirigidos a descifrar el mecanismo de la salida de células madre y progenitoras de la BM se han enfocado en la leucocitosis inducida por diversos agentes inductores de estrés, tales como LPS, quimioquinas o citoquinas, incluyendo el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), que se emplea ampliamente para movilizar y recoger las HSC para trasplante clínico [To, 1997] [Thomas, 2002]. En los últimos años, ha llegado a establecerse el mecanismo que gobierna la movilización inducida por el G-CSF: el G-CSF induce la expansión de células mieloides que liberan grandes cantidades de proteasas neutrófilas, tales como elastasa y catepsina G en la BM que degradan las VCAM-1 estromales, ICAM-1, el receptor de P-selectina PSGL-1, así como la quimioquina SDF-1 y el citoquina ligando kit [Lapidot, 2002] [Papayannopoulou, 2004]. Se cree que tanto las interacciones VCAM-1/VLA-4, ligando c-kit/kit como SDF1/CXCR4 son reguladores cruciales del anclaje de las células hematopoyéticas y la retención en la BM. Además, las metaloproteinasas, tales como MMP-9, también participan en la liberación inducida por G-CSF de las células [Heissig, 2002]. Curiosamente, las mutaciones heterocigóticas de las líneas germinales en el gen ELA2 que codifica la elastasa de leucocitos humanos han sido asociadas con diversos síndromes neutropénicos heredados, tales como neutropenia cíclica y la enfermedad de Kostman, que se caracterizan por un acusado impedimento de la liberación de neutrófilos en la circulación [Aprikyan, 2001].

La elastasa de neutrófilos - o de leucocitos - es una serina-proteasa almacenada en los gránulos azurófilos de las células mieloides y se libera por activación y desgranulación. La elastasa es una enzima proteolítica de muy amplio espectro, sus sustratos incluyen diversas proteínas de la matriz extracelular, tales como elastina, fibronectina y colágeno, así como moléculas adhesivas como ICAM-1 y cadherinas de unión, lo que sugiere un papel de la elastasa para facilitar la migración transendotelial de las células [Ginzberg, 2001]. Además, la elastasa degrada numerosas proteínas solubles como factores de coagulación, inmunoglobulinas, complemento, inhibidores de proteasa, citoquinas, factor de crecimiento y sus receptores [Bank, 2001] [Lee, 2001].

Las características clínicas y de laboratorio de la leucemia están causadas por la supresión de la formación de las células normales de la sangre y la infiltración en órganos del clon maligno. Los factores inhibidores producidos por las células leucémicas o el reemplazo del espacio de la médula puede suprimir la hematopoyesis normal, con las consiguientes anemia, trombocitopenia y granulocitopenia. La infiltración en órganos de las células leucémicas da como resultado la dilatación del hígado, del bazo y de los ganglios linfáticos, con implicación ocasional de los riñones y las gónadas. La infiltración en las meninges da como resultado aspectos clínicos asociados con un aumento de la presión intracraneal (por ejemplo, parálisis del nervio craneal).

Las leucemias se denominaron originalmente agudas o crónicas basándose en la expectativa de vida, pero ahora se clasifican de acuerdo con la madurez celular. La leucemia aguda consiste predominantemente en células inmaduras (usualmente blastoformas); la leucemia crónica, en células más maduras.

Las leucemias agudas se dividen en las clases linfoblástica (abreviadamente ALL por la expresión inglesa *Acute Lymphoblastic Leukemia*) y mielógena (AML), que a su vez pueden subdividirse, por su aspecto morfológico y citotímico de acuerdo con la clasificación Franco-Americana-Británica (FAB) (Tabla A) o por su inmunofenotipo. Los linfocitos B y los linfocitos T específicos y los anticuerpos monoclonales de antígenos mieloides, junto con la citometría de flujo, son muy útiles para clasificar la ALL frente a la AML, lo que es crítico para el tratamiento.

La patente europea EP-0525973 describe inhibidores de elastasa para tratar enfermedades inflamatorias e inhibidores de proteinasa 3 (PR-3) para tratar el cáncer.

El documento WO99/12934 describe compuestos que actúan como inhibidores de la elastasa de neutrófilos.

El documento WO03/079969 se refiere al uso de inhibidores de elastasa en el contexto de necrosis.

- 5 La patente europea EP-0630382 describe inhibidores de elastasa de leucocitos humanos (abreviadamente HLE, por la expresión inglesa *Human Leukocyte Elastase*) y de elastasa de neutrófilos humanos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

10 Tavor, S. et al., (*Blood*, 100 (2001), p. 750 A (*Annual Meeting Abstract* N° 2969)) describen que las células de la leucemia mielógena aguda (AML) segregan altos niveles de elastasa en el suero de pacientes afectados de AML y que la elastasa regula la migración dirigida dependiente de SDF-1 de las células de AML a la médula ósea.

Tabla A

Clasificación FAB	Descripción	Clasificación FAB	Descripción
Leucemia linfoblástica aguda		Leucemia mielógena aguda	
L1	Linfoblastos con núcleos redondeados uniformes y citoplasma escaso	M1	Mieloblástica no diferenciada; sin granulación citoplásmica.
L2	Más variabilidad de linfoblastos; los núcleos pueden ser irregulares con más citoplasma que L1	M2	Mieloblástica no diferenciada; pocas a muchas células pueden tener escasa granulación
L3	Los linfoblastos tienen la cromatina nuclear más fina y el citoplasma azul a azul intenso con vacuolización citoplásmica.	M3	Promielocítica; granulación típica de la morfología promielocítica
		M4	Mielomonoblástica; morfología mixta mieloblástica y monocitoide
		M5	Monoblástica; morfología monoblástica pura
		M6	Eritroleucémica; morfología predominantemente eritroblástica inmadura, a veces aspecto megaloblástico
		M7	Megacarioblástica; las células tienen bordes enmarañados que pueden mostrar algo de gemación.

La leucemia crónica se describe como linfocítica (CLL) o mielocítica (CML).

- 15 Los síndromes mielodisplásicos representan la insuficiencia progresiva de la médula ósea, pero con una proporción insuficiente de blastocitos (< 30%) para el diagnóstico definitivo de la AML; 40 a 60% de los casos evolucionan a AML.

La leucemia mieloblástica aguda (AML) se caracteriza por una proliferación incontrolada en la BM de células progenitoras mieloides malignas detenidas en su proceso de maduración y por la salida de estas células anómalas a

la circulación. Los estudios previos describieron altos niveles de actividad de la elastasa intracelular y secreción de la proteína elastasa por células de AML [Hunter, 2003].

Las células leucémicas parece que expresan altos niveles de diversas proteasas, tales como MMP-2, MMP-9, MT1-MMP (Ries et al., *Clinical Cancer Research*, 1999, (5) 1115) y elastasa.

5 La evidencia recientemente aparecida de que la elastasa tiene un papel en el desarrollo de la leucemia mieloide crónica asociada al cromosoma Filadelfia y solamente en pacientes en fase crónica (CML-CP) [El-Ouriaghli, *Blood*, 15, volumen 102 número 10, 2003]. El-Ouriaghli informa que tanto la proliferación celular en la CML como la proliferación de células progenitoras normales (abreviadamente en lo sucesivo NPC, por la expresión inglesa *Normal Progenitor Cells*) son inhibidas por la elastasa, sin embargo la proliferación de células en la CML es inhibida en un menor grado.

10 El G-CSF es un factor de crecimiento que induce la proliferación de las NPC. De acuerdo con El-Ouriaghli, la elastasa no inhibe directamente la proliferación, sino que lo hace digiriendo el G-CSF y el receptor del G-CSF (Hunter et al., 2003), dando como resultado la reducción del crecimiento de las NPC. El-Ouriaghli explica que, puesto que el crecimiento de las células en la CML es menos dependiente de los factores de crecimiento transmitidos exógenamente comparado con el de las NPC, la CML es menos afectada por la elastasa, pero no completamente insensible a ella.

El-Ouriaghli indica que la concentración mantenida de diferentes proteasas, tales como MM-9, serina-proteinasas de neutrófilos, tales como proteinasa 3 o catepsina G e incluyendo la elastasa en la CML podría ser responsable de inducir las células de médula inmaduras características de la sangre de los pacientes con CML.

20 Las interacciones SDF-1/CXCR4 son cruciales para la migración dirigida y la repoblación de células madre humanas normales trasplantadas a ratones NOD/SCID inmunodeficientes [Kollet, 2001] [Peled, 1999]. Los autores de la presente invención mostraron que la migración dirigida de las células de AML y las pre-B de ALL malignas humanas direccionalmente a la BM y al bazo de ratones NOD/SCID/B2mnull también depende de CXCR4 [Tavor, 2004, *Asaf, Blood*].

25 La translocación que está presente en más del 90% de los pacientes con leucemia promielocítica aguda (APL) crea dos proteínas de fusión PML-RAR y RAR-PML. Se sugirió recientemente que el procesamiento proteolítico por la elastasa desempeña un papel importante en el desarrollo de la APL. Lane et al., (*Cell*, vol. 115, 305, 2003) mostraron que la proteína de fusión PML-RAR asociada a la leucemia promielocítica aguda (APL) es escindida por la elastasa de neutrófilos y que ratones deficientes en elastasa de neutrófilos están parcialmente protegidos del desarrollo de la APL (Lane, 2003).

30 Más recientemente, se propuso el uso de elastasa para el tratamiento de leucemia para inducir linfocitos T citotóxicos reactivos de la leucemia (Fujiwara et al., 2004 *Blood*, 103 (S) 3076).

Por tanto, existe la necesidad de proporcionar un método terapéutico factible para tratar la leucemia,

SUMARIO DE LA INVENCION

35 La invención se refiere al uso de un inhibidor de elastasa en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de leucemia, preferiblemente la leucemia aguda y más preferiblemente para el tratamiento de la AML.

En una realización de la invención, el inhibidor de elastasa es un anticuerpo neutralizante de la elastasa, MeOSuc-AAPV-CMK o α 1-antitripsina.

40 La presente descripción se refiere al uso de un inhibidor de elastasa, y opcionalmente un agente movilizante, en la fabricación de un medicamento para ayudar al autotrasplante de células madres hematopoyéticas (HSC) en pacientes que sufre leucemia, tal como leucemia aguda y preferiblemente la AML.

En otra realización, la invención se refiere al uso de un inhibidor de elastasa en la fabricación de un medicamento para prevenir o inhibir la salida de células leucémicas, desde los órganos hematopoyéticos, preferiblemente la médula ósea, hasta la sangre en pacientes que sufren leucemia, tal como leucemia aguda y preferiblemente la AML.

45 La presente descripción se refiere al uso de un inhibidor de elastasa en la fabricación de un medicamento para prevenir o inhibir la migración de células leucémicas.

En otra realización adicional, la invención se refiere al uso de un inhibidor de elastasa en la fabricación de un medicamento para prevenir o inhibir la proliferación de células leucémicas, tales como las de leucemia aguda y preferiblemente las de AML.

50 La presente descripción se refiere al uso de un inhibidor de elastasa para separar células madre hematopoyéticas normales de células leucémicas, en una mezcla de células extraída de un paciente, que comprende la etapa de incubar la mezcla de células con un inhibidor de elastasa y recoger las células de migración rápida, preferiblemente las células que migran hacia un gradiente de SDF-1.

En otra realización adicional, la invención se refiere a un inhibidor de elastasa para uso en un método de tratamiento de la leucemia,

En otra realización adicional de este aspecto, la invención se refiere a la leucemia aguda y preferiblemente a la AML.

5 En otra realización adicional de este aspecto, la invención se refiere a un inhibidor de elastasa, tal como un anticuerpo neutralizante de elastasa, MeOSuc-AAPV-CMK y α 1-antitripsina, para uso en un método para tratar la leucemia.

Se describe también un método de autotrasplante de células madre hematopoyéticas (HSC) a un paciente que sufre leucemia, que comprende las etapas de administrar un agente movilizante y poner en contacto las células movilizadas con un inhibidor de elastasa, recoger las células y trasplantar de nuevo las células al paciente.

10 Preferiblemente, la etapa de poner en contacto el inhibidor de elastasa con las células movilizadas se lleva a cabo *ex-vivo* antes de trasplantar de nuevo las células al paciente.

En otra realización adicional, la invención se refiere a un inhibidor de elastasa para uso en un método de tratamiento de un paciente que sufre leucemia.

15 En otra realización adicional, la invención se refiere a un inhibidor de elastasa para uso en un método para prevenir o inhibir la salida de células leucémicas, desde un órgano hematopoyético hasta la sangre, en un paciente que sufre leucemia.

Se describe también un método para diagnosticar la fase de maduración de las células leucémicas en un paciente que sufre leucemia aguda, que comprende la etapa de monitorizar el nivel de elastasa en la médula ósea de dicho paciente.

20 Se describe también un método para separar una mezcla de células madre hematopoyéticas normales y células leucémicas extraídas de un paciente, que comprende la etapa de incubar la mezcla de células con un inhibidor de elastasa y recoger las células de migración rápida, opcionalmente las células que migran a través de un gradiente de SDF-1.

25 La presente descripción se refiere además a un modelo animal para determinar la salida de células leucémicas, que comprende inyectar células leucémicas humanas a un ratón inmunodeficiente y permitir que las células se injerten en la médula ósea para obtener un ratón quimérico.

La presente descripción se refiere además a un método para aislar un fármaco capaz de inhibir o prevenir la salida o crecimiento de células leucémicas que comprende el uso del modelo animal de la invención.

30 La presente descripción se refiere además a un fármaco capaz de inhibir o prevenir la salida o proliferación de células leucémicas obtenibles usando el modelo animal de la invención.

La presente descripción se refiere además a una preparación celular obtenible usando el método de separación de la invención.

La presente invención se describe adicionalmente por las reivindicaciones anexas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS DE LOS DIBUJOS

35 La Figura 1 muestra los niveles de elastasa en la BM y en la sangre periférica de pacientes con AML.

(A) Se determinaron por un ELISA los niveles de elastasa en plasma en la BM (barras rellenas) y en la sangre periférica (barras vacías) de diez pacientes con AML con fenotipo variable. Cada muestra se midió por triplicado y los datos mostrados representan el valor medio \pm el error estándar (SE). (B) Niveles de elastasa en plasma en la sangre periférica de individuos normales (Normal), pacientes con AML que presentaban blastocitos en la sangre periférica (abreviadamente en lo sucesivo PB, por la expresión inglesa *Peripheral Blood*), sin blastocitos en la circulación (sin blastocitos en PB) o pacientes con AML con el subtipo M0 de la clasificación FAB (con blastocitos en PB). Cada muestra se midió por duplicado o triplicado y los datos mostrados representan el valor medio. Se indica el valor medio de cada grupo. (C) Correlación entre los niveles de elastasa en la PB y el número de blastocitos en la sangre circulante en la AML. Los niveles de elastasa en plasma se representaron frente al número de blastocitos circulantes. $R=0,6$, $p=0,01$.

40

45

La Figura 2 muestra la expresión de elastasa en la superficie de células de AML. (A) Las líneas celulares de AML (HL-60, U937 y ML-1) y las células de AML primaria de la BM (BM del paciente) y de la PB (PB del paciente) se tiñeron para detectar la elastasa externa e interna. Análisis por el clasificador de células activadas por fluorescencia (abreviadamente FACS, por la expresión inglesa *Fluorescence-Activated Cell Sorter*) de elastasa en las líneas celulares de AML (panel del lado izquierdo) y en las células leucémicas primarias (panel del lado derecho). Los histogramas sombreados muestran la tinción con anticuerpos de control del mismo el isotipo, los histogramas vacíos muestran la tinción con anticuerpos de elastasa. (B) Análisis inmunocitoquímico de la localización de la elastasa

50

membranal en células obtenidas de pacientes con AML primaria adherida a poli-L-lisina e inmunomarcada indirectamente con anticuerpos anti-CXCR4 y anti-elastasa. 100 aumentos del original.

La Figura 3 muestra que la secreción de elastasa por las células de AML afecta a su migración *Transwell* inducida por SDF-1. (A) Ensayo de migración *Transwell in vitro* de células de AML, no tratadas o tratadas durante 30 minutos con inhibidor de elastasa, 10 µg/mL del inhibidor de elastasa [abreviadamente en los sucesivos EI, por la expresión inglesa *Elastase Inhibitor*] (MeOSuc-AAPV-CMK) (A), anticuerpos anti-elastasa (B) o α1-antitripsina (α1-AT) (C). Los resultados muestran el porcentaje de células migradas hacia 125 ng/mL de SDF-1 después de 4 horas. (D) Análisis inmunocitoquímico de células de AML primaria en superficies revestidas con poli-L-lisina. Las células fueron pre-tratadas durante 30 minutos con inhibidor de elastasa (EI) o dejadas sin tratar, se dejó que se adhirieran en ausencia (-) o presencia de 200 ng/mL de SDF-1, se fijaron y se inmunomarcaron indirectamente con los anticuerpos anti-CXCR4 y anti-elastasa. 100 aumentos del original.

La Figura 4 muestra que el inhibidor de elastasa impide la migración dirigida de las células de AML. (A) Células de AML humana primaria de 8 pacientes no tratadas o después de 30 minutos de incubación con inhibidor de elastasa (10 µg/mL) se inyectaron en ratones B2nnull NOD/SCID irradiados sub-letalmente. Los porcentajes de células CD45+ humanas en la BM se determinaron después de 16 horas. (A) Los datos muestran el porcentaje de células humanas tratadas con el inhibidor de elastasa en comparación con el control no tratado (100%). (B) Análisis por el FACS de un experimento representativo. Los números mostrados representan el número de células CD45+ humanas por $1,5 \times 10^6$ células de la BM adquiridas. (C) Comparación del efecto del inhibidor de elastasa (10 µg/mL) sobre la migración dirigida de células CD34+ de AML primaria y células normales enriquecidas en CD34+ de la CB.

La Figura 5 muestra que la inhibición de elastasa impide la salida a la circulación de células de AML humana injertadas. Ratones NOD/SCID injertados con células de AML fueron tratados con 1 mg de inhibidor de elastasa durante 4 días consecutivos. Se determinaron los niveles de células de AML en la BM y en la sangre periférica por tinción de CD45. En (A) se muestra el análisis por FACS de un experimento representativo. El panel B muestra el porcentaje de células humanas injertadas en la PB/porcentaje de células injertadas en la BM con o sin tratamiento con inhibidor de elastasa. Debido a la variabilidad en el porcentaje de injerto entre ratones, se realizó la comparación de la relación PB/BM. Los datos representan los resultados medios de 4 experimentos independientes.

La Figura 6 muestra que el inhibidor de elastasa inhibe la proliferación de células de AML. Las células de AML primaria, las líneas celulares de AML y las células de la sangre del cordón umbilical (CB) con o sin 10 µg/mL de inhibidor de elastasa (EI), fueron cultivadas durante 3-7 días y se determinó el número de células viables usando exclusión con azul tripán (A). Se cultivaron células de CB enriquecidas en CD34+ de partos a téminos en RPMI/10% de FCS con SCF, FLT3L e IL6. Se determinó por FACS el porcentaje de células CD34+/38- en el total de células de CB enriquecidas en CD34+ cultivadas con y sin EI (B).

La Figura 7 muestra que el SDF-1 aumenta la expresión de elastasa en la superficie de células de AML y la disminuye en las células CD34+ normales. Las células AML primarias y las células CD34+ de CB se trataron con SDF-1 (200 ng/mL) durante 1 y 3 horas y se determinó por FACS la expresión de elastasa en la superficie celular: (a) control del isotipo, (b) células no tratadas, (c) una hora con SDF-1 y (d) 3 horas con SDF-1.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención se refiere al uso de un inhibidor de elastasa para el tratamiento de leucemia.

La presente descripción se refiere al uso de un inhibidor de elastasa para inhibir la proliferación de células leucémicas junto con la potenciación del crecimiento de células madre normales y particularmente de un linaje de células madre más adecuado para el trasplante.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un inhibidor de elastasa para prevenir la migración y salida de células leucémicas desde los órganos hematopoyéticos de un paciente, tal como por ejemplo la médula ósea, hasta la circulación, y también se describe un ensayo para el cribado de fármacos para inhibir la salida de células leucémicas.

La presente descripción se refiere además al uso de un inhibidor de elastasa para facilitar el trasplante autólogo a un paciente leucémico.

Además, la descripción se refiere a métodos de diagnóstico para detectar la fase de maduración de células leucémicas en pacientes leucémicos.

La invención se refiere además, por tanto, al uso de un inhibidor de elastasa para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la leucemia.

La invención se refiere al uso de un inhibidor de elastasa en el tratamiento de cualquier clase de leucemia, tal como leucemia crónica y preferiblemente leucemia aguda, tal como leucemia promielocítica aguda (APL) y leucemia mielógena aguda (AML).

La invención se basa en los siguientes hallazgos experimentales *in vitro*:

Las células de AML no solo segregan elastasa independientemente del estímulo externo, sino que también expresan constitutivamente elastasa ensamblada homogéneamente en la superficie celular. Cepinskas et al., (1999) indicaron que en los neutrófilos activados, la elastasa unida a membranas es catalíticamente activa y resistente a las proteólisis por las proteasas circulantes, en contraste con la elastasa soluble. Por tanto, la elastasa de membranas de las células de AML está protegida de las proteólisis por las proteasas circulantes y puede permitir que las células de AML penetren en la matriz extracelular (abreviadamente ECM, por la expresión *Extra Cellular Matrix*) de la médula ósea y en las barreras endoteliales y facilitar su diseminación en la circulación. Los resultados obtenidos *in vitro* muestran que el papel de la elastasa unida a membranas no es solamente facilitar la penetración en las células de AML a través de las barreras mecánicas, tales como el endotelio de la BM, sino que como se ha observado en un ensayo de migración *in vitro* que usa tres inhibidores diferentes de elastasa MeOSuc-AAPV-CMK (EI), anticuerpos α 1-anti-tripsina o un anti-elastasa, se requiere elastasa para la motilidad de las células de AML (tanto en la migración dirigida, en la dependiente del SDF-1, como en la migración espontánea) por ejemplo, induciendo transposiciones del citoesqueleto y polarización celular.

Recientemente se ha sabido que la migración dirigida de las células malignas de AML humana y de los pre-linfocitos B de la ALL a la BM y al bazo en ratones NOD/SCID/B2mnull también depende de las interacciones SDF-1/CXCR4 [Tavor, 2004, Asaf, *Blood*]. Teniendo en cuenta los resultados anteriores que muestran el papel de la elastasa en la migración de las células de AML, se supuso que el SDF-1 puede tener un papel en la regulación de la elastasa. Realmente, se encontró de acuerdo con la presente invención que el SDF-1 regula la expresión de elastasa en la superficie celular y tiene un efecto opuesto sobre las células de AML frente al ejercido sobre las células CD34+ normales de la CB. Aunque el SDF-1 aumentó la elastasa en la superficie celular de las células de AML, disminuyó la elastasa de la superficie celular en las células normales enriquecidas en CD34+ de la CB.

La AML se caracteriza por una proliferación de las células de AML extensa y no controlada en la BM. Por tanto, los autores de la presente invención comprobaron la posibilidad de que la elastasa pudiera estar involucrada también en la regulación de la proliferación de las células de AML.

Para analizar el papel de la elastasa en la proliferación de células de AML, dichas células de AML (células de AML primaria-) o células normales enriquecidas en células CD34+ de la sangre del cordón umbilical (CB) se cultivaron en un medio de crecimiento con y sin inhibidor de elastasa (EI) y se determinó el número de células viables después de varios días de cultivo. Los resultados observados muestran que la proliferación de células de AML fue inhibida cultivando las células en presencia de un inhibidor de elastasa, mientras que la inhibición de elastasa potenció la tasa de proliferación de células CD34+ normales de la CB cultivadas en las mismas condiciones. Además, los autores de la presente invención encontraron que el porcentaje de población competente en el trasplante de células CD34+, que comprende más células progenitoras primitivas del linaje CD34+/38-, aumentó significativamente después de 3 días de cultivo en presencia del EI, lo que sugiere un papel de la elastasa en la diferenciación de las células madre normales. Por tanto, se muestra en la presente invención que la elastasa es necesaria para la proliferación de las células de AML, y que la inhibición de elastasa inhibe la proliferación de células de AML y no solamente aumenta la proliferación de células CD34+ normales, sino que además mantiene en el cultivo las células madre primitivas CD34+/38- no diferenciadas competentes para el trasplante.

La invención se basa también en los siguientes hallazgos experimentales *in vivo* que usan el modelo experimental de ratones NOD/SCID inmunodeficientes pre-clínicos, que permite la migración dirigida y el injerto (o establecimiento) de células madre de AML humana en la médula ósea y su salida de la misma, imitando por tanto, muchos aspectos biológicos de AML humana en pacientes (Lapidot, *Nature*, 1994).

En el modelo experimental se administran células humanas (del donante), por ejemplo células de AML, a ratones (receptores) (NOD/SCID o B2mnull NOD/SCID) con inmunodeficiencia combinada grave, diabetes, no obesos e irradiados sub-letalmente, y después de unas cuantas horas de la administración (por ejemplo, 16 horas) se monitorizan las células humanas que llegan, o migran direccionalmente a un órgano específico (por ejemplo, la médula ósea (Kollet et al., 2001).

Los resultados obtenidos empleando el modelo de migración dirigida muestran que la migración dirigida de células de AML primaria pre-tratadas con EI o células progenitoras de AML enriquecidas en CD34+ disminuía en comparación con la de las células no tratadas. Contrariamente a las células de AML, la migración dirigida de células humanas normales enriquecidas en CD34+ y pre-tratadas con EI aumentaba en comparación con la de las células no tratadas. Tomados conjuntamente, estos resultados muestran un papel central de la elastasa en la migración dirigida de células de AML y un efecto opuesto de la elastasa y la inhibición de elastasa en la migración dirigida de células CD34+ de la leucemia mieloide y en células CD34+ normales.

Los ratones NOD/SCID inmunodeficientes quiméricos y con AML, permitieron analizar la salida de células madre de AML humana desde la médula ósea a la circulación (modelo de salida). El modelo de salida consiste en ratones NOD/SCID irradiados sub-letalmente e inyectados con células de AML para establecer el quimerismo AML humana-ratones (injerto). La salida de células de AML desde la médula ósea a la circulación es monitorizada aproximadamente dos a cuatro semanas después de la inyección de células de AML. Usando este modelo de salida

de células de AML, es posible analizar el efecto de la administración de fármacos sobre la salida de células de AML desde la médula ósea.

5 Puesto que los resultados de la presente invención demuestran el papel de la elastasa en la migración de las células de AML, se estableció la hipótesis de que la elastasa pudiera ser la proteasa candidata que facilita la salida de las células de AML desde la BM a la circulación. Por tanto, se analizó el efecto de un EI en la salida de células de AML usando el modelo de salida. Los resultados obtenidos muestran que la salida de células de AML (primaria y línea celular) disminuían en ratones tratados con un EI en comparación con los ratones no tratados (Fig. 5 y Tabla 1, Tabla B). Por tanto, estos resultados muestran que la elastasa controla la salida de células de AML humana, y que la inhibición de elastasa puede prevenir eficientemente la salida de células de AML desde la médula ósea a la
10 circulación.

Una realización de la invención, muestra que la inhibición de elastasa inhibe la proliferación de células de AML, la migración de células de AML y la salida de células de AML de la BM. Por tanto, la inhibición de elastasa se puede usar para tratar la AML.

15 Los autores de la invención también mostraron un efecto diferencial de la elastasa en la migración dirigida y el crecimiento de las células de AML y de las células madre y progenitoras hematopoyéticas normales, que se puede usar ventajosamente para obtener una población de células madre hematopoyéticas sustancialmente exenta de células de AML de un paciente leucémico. Por ejemplo, una mezcla de células madre hematopoyéticas normales y células leucémicas, extraída de un paciente, podría ser cultivada en un medio suplementado con un inhibidor de elastasa y pueden ser recogidas células de migración rápida, opcionalmente en un gradiente del SDF-1, constituidas por una población de células enriquecida en células madre hematopoyéticas normales.
20

Los autores de la invención también mostraron que la elastasa en la médula ósea de pacientes con AML estaba correlacionada con la fase de maduración de las células leucémicas, por ejemplo, la concentración más alta de elastasa en la BM se encontró en los sub-tipos M3 y M4 de AML y un nivel muy bajo en la médula ósea del sub-tipo M0 de AML no diferenciada, por lo tanto, se podría usar la monitorización del nivel de elastasa en la BM de
25 pacientes leucémicos para diagnosticar la fase de maduración de las células de AML en un paciente, por ejemplo, como se muestra en el Ejemplo 1.

La expresión "inhibidor de elastasa" en el contexto de esta invención se refiere a cualquier molécula que module la producción y/o acción de elastasa, de tal modo que se atenúe, reduzca o se impida o bloquee parcial, sustancial o completamente la producción y/o acción de elastasa. La expresión "inhibidor de elastasa " significa que abarca
30 inhibidores de la producción de elastasa, así como inhibidores de la acción de la elastasa. Los inhibidores de elastasa pueden ser moléculas pequeñas o polipéptidos o péptidos.

Un inhibidor de la producción puede ser cualquier molécula que afecte negativamente a la síntesis, procesamiento o maduración de la elastasa. Los inhibidores considerados de acuerdo con la invención pueden ser, por ejemplo, supresores de la expresión génica de la elastasa, moléculas de mRNA antisentido que reduzcan o impidan la
35 transcripción del mRNA de la elastasa o que conduzcan a la degradación del mRNA, proteínas que perjudiquen el plegamiento correcto, o que impidan parcial o sustancialmente la secreción de elastasa, proteasas que degraden la elastasa, una vez que ha sido sintetizada, inhibidores de la activación de elastasa e inhibidores de la secreción de elastasa desde los gránulos hasta la superficie celular. Un inhibidor de la acción de la elastasa puede ser un inhibidor natural, tal como α 1-antitripsina. Los antagonistas de la elastasa pueden unirse a la propia molécula de
40 elastasa o secuestrarla con suficiente afinidad y especificidad para neutralizar parcial o sustancialmente la elastasa o el(los) sitio(s) de unión a la elastasa responsable(s) de la unión de la elastasa a sus ligandos.

Los inhibidores de la acción de la elastasa pueden ser también anticuerpos contra la elastasa, tales como anticuerpos policlonales o monoclonales, o cualquier otro agente o molécula que impida la unión de la elastasa a sus dianas, disminuyendo o impidiendo por tanto, las reacciones mediadas por la elastasa.

45 En una realización preferida de la presente invención, el inhibidor de elastasa se selecciona de EI, anticuerpos α 1-antitripsina dirigidos contra la elastasa, antagonistas de la elastasa que compiten con la elastasa y proteínas que se unen a la elastasa.

En el contexto de la presente invención, las expresiones "migración" y "migración dirigida" se usan sinónimamente.

50 Las células madre y/o precursoras humanas hematopoyéticas que se han de usar de acuerdo con la invención pueden ser embrionarias y/o neonatales, tales como las células de la sangre del cordón umbilical y/o células madre adultas (por ejemplo, células de la médula ósea, células de la sangre periférica movilizadas (Koliet et al., 2001). La fuente de células madre y/o precursoras puede ser alogénica (tales como donantes de HLA desiguales), preferiblemente singénica (tales como, hermanos de igual HLA), y más preferiblemente autóloga (es decir, derivada del propio paciente).

55 Las células madre y/o las células progenitoras pueden ser recogidas y aisladas de la sangre periférica de un donante o del paciente tratado con un agente inductor de la movilización, tal como G-CSF, o de la médula ósea por intervención quirúrgica. El G-CSF induce la movilización de las células madre y/o progenitoras desde los órganos

hematopoyéticos, por ejemplo, la médula ósea, hasta la sangre periférica.

Las células madre y progenitoras hematopoyéticas se aíslan de sus mezclas celulares con células sanguíneas maduras en dichas fuentes hematopoyéticas por técnicas estándares (Kollet et al., 2001), por ejemplo, las muestras de sangre se diluyen 1:1 en solución salina tamponada con fosfato (PBS) sin Mg^{+2}/Ca^{+2} . Las células mononucleares de baja densidad se recogen después de separación estándar en Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) y se lavan con PBS. Las células CD34+ pueden ser purificadas usando el kit de aislamiento de células MACS y columnas MidiMacs o AutoMACS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, pudiendo obtenerse una pureza de más del 95%. Las células CD34+ aisladas se pueden usar inmediatamente para experimentos de migración dirigida o después de incubación durante una noche con RPMI suplementado con suero fetal de ternero (FCS) al 10% o exento de suero y factor de células madre (SCF) (50 ng/mL). Se pueden emplear diversas técnicas para separar las células retirando inicialmente las células de un linaje determinado. Para la separación de las células requeridas se pueden usar anticuerpos que reconozcan un marcador de un linaje específico, por ejemplo anticuerpos para el receptor CXCR4. También, las células enriquecidas en células CD34+ pueden ser marcadas posteriormente con un anticuerpo monoclonal (mAb) específico humano anti-CD34 FITC (Becton Dickinson, San José, CA) y anti-CD38 PE (Becton Dickinson, San José, CA) y clasificadas por FACSVantage como sub-poblaciones purificadas de CD34⁺CD38⁻low o CD34⁺CD38⁺ (Becton Dickinson); puede obtenerse una pureza de 97% a 99%.

Se pueden usar diversas técnicas de diferente eficacia para obtener preparaciones de células enriquecidas. Dichas preparaciones de células enriquecidas contienen hasta 10%, usualmente no más de 5%, preferiblemente no más de aproximadamente 1%, de las células totales.

Los métodos para la separación de los linajes de HSC/células progenitoras comprenden la separación física, por ejemplo, por centrifugación en gradiente de densidad, marcado en la superficie celular (afinidad a lectina y anticuerpos), separación magnética etc. Una técnica preferida que proporciona buena separación es la citometría de flujo.

Los métodos para determinar la presencia o ausencia de un marcador de la superficie celular son muy conocidos en la técnica (*Encyclopedia of Immunology* Ed. Roitt, Delves, Vol.1, 134). Típicamente, se usa un anticuerpo marcado específico para el marcador para identificar la población celular. Los reactivos específicos para los marcadores de la superficie celular humana Thy-1 y CD34 son conocidos en la técnica y están disponibles en el comercio.

Los métodos para movilizar células madre en la sangre periférica son conocidos en la técnica e implican generalmente el tratamiento con un fármaco quimioterapéutico, por ejemplo ciclofosfamida (CY) y citoquinas, por ejemplo, G-CSF, GM-CSF, G-CSF+, IL-3 etc.

Las células madre hematopoyéticas aisladas de pacientes movilizadas por estimulación con citoquinas con y sin tratamiento quimioterapéutico pueden ser tratadas *ex-vivo* antes del trasplante, de acuerdo con la invención, con inhibidor de elastasa para mantener la supervivencia y el crecimiento de las células madre hematopoyéticas competentes en migración dirigida e inhibir la proliferación/crecimiento de células leucémicas.

Las HSC genéticamente modificadas que producen un agente inhibidor de elastasa se pueden usar de acuerdo con el método de la invención. La transferencia de genes a HSC y/o células precursoras puede llevarse a cabo por transducción de virus adenoasociados, retrovirus, lentivirus y quimeras adeno-retrovirales, que codifican el agente terapéutico, por ejemplo el inhibidor de elastasa, como se ha descrito por Zheng et al., 2000 y Lotti et al., 2002. Dichas HSC genéticamente modificadas podrían usarse de acuerdo con la invención en pacientes leucémicos.

También se contempla de acuerdo con la invención el uso de un vector para inducir y/o potenciar la producción endógena de un inhibidor de elastasa. El vector puede comprender secuencias reguladoras funcionales en las células deseadas para expresar el inhibidor de elastasa endógeno. Dichas secuencias reguladoras pueden ser promotoras o potenciadoras. La secuencia reguladora puede ser introducida luego en el *locus* correcto del genoma por recombinación homóloga, uniendo, por tanto, operativamente la secuencia reguladora con el gen, cuya expresión se requiere para ser inducido o potenciado. Esta sobre-expresión puede ser estable o transitoria. La tecnología se denomina usualmente "activación endógena de genes" (abreviadamente EGA, por la expresión *Endogenous Gene Activation*), y se describe, por ejemplo, en el documento de patentes WO 91/09955.

Además de inhibidores de elastasa naturales, tales como el -antitripsina, también se puede usar la inhibición de SDF-1 o su receptor CXCR4, que induce la activación de elastasa en células malignas de AML humana (véase el Ejemplo 7). Los inhibidores de SDF-1 y CXCR4, que también impedirán la activación de elastasa en las células de AML son, por ejemplo, los anticuerpos anti-SDF-1 y anti-CXCR4, AMID 3100, TC 140 y/o cualquier otro inhibidor de esta quimioquina y este receptor incluyendo enzimas proteolíticas que inactiven el ligando y/o el receptor (CD26 MMP2/9, catepsina G).

Un inhibidor de elastasa puede ser administrado a un paciente que sufre leucemia para reducir la carga leucémica impidiendo la proliferación de células malignas. Un inhibidor de elastasa en una combinación con un agente movilizador podría ser administrado a un paciente que sufre leucemia antes, durante o después del trasplante de HSC y/o células progenitoras en donde el trasplante es autólogo o heterólogo.

La presente descripción se refiere también a composiciones farmacéuticas preparadas para administración de un inhibidor de elastasa, tal como EI, inhibidor de α 1-antitripsina, anticuerpos anti-elastasa, inhibidor de SDF-1, inhibidor de CXCR4 o una mezcla de inhibidores, mezclando el inhibidor con vehículos y/o estabilizadores y/o excipientes fisiológicamente aceptables, y dándoles forma farmacéutica, por ejemplo, por liofilización en viales de dosificación.

- 5 La invención se refiere también a composiciones farmacéuticas, particularmente útiles para impedir la proliferación de células leucémicas y/o la salida desde los órganos hematopoyéticos hasta la sangre periférica, que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de elastasa.

La presente invención se refiere además a composiciones farmacéuticas que comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable y un inhibidor de elastasa por ejemplo un EI o una mezcla de inhibidores para el tratamiento de pacientes que sufren leucemia. Preferiblemente, el inhibidor de elastasa puede ser administrado por inyección directa en el paciente antes, después o durante la movilización celular.

Alternativamente, un inhibidor de elastasa endógeno puede ser inducido preferiblemente por administración de agentes que inducen un inhibidor de elastasa endógeno.

15 Un inhibidor de elastasa, como se describe antes, es el ingrediente activo preferido de las composiciones farmacéuticas.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable, un inhibidor de elastasa, tal como el, inhibidor de α 1-antitripsina, anticuerpos anti-elastasa, inhibidor de SDF-1, inhibidor de CXCR4 o una de sus mezclas, e incluyendo opcionalmente además uno o más agentes de movilización.

20 La definición de "farmacéuticamente aceptable" significa que abarca cualquier vehículo que no interfiera con la eficacia de la actividad biológica del ingrediente activo y que no sea tóxico para el receptor al que se administre. Por ejemplo, para administración parenteral, el (los) agente(s) activo(s) pueden ser formulado(s) en formas farmacéuticas unitarias para inyección en vehículos, tales como solución salina, solución de dextrosa, seroalbúmina y solución de Ringer.

25 Los ingredientes activos de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención se pueden administrar a un individuo en una variedad de modos. Se puede usar una vía de administración terapéuticamente eficaz, por ejemplo absorción a través de los tejidos epiteliales o endoteliales o mediante una terapia génica en donde una molécula de DNA que codifica el agente activo se administra al paciente (por ejemplo, mediante un vector) que hace que el agente activo sea expresado y segregado *in vivo*. Además, el(los) inhibidor(es) de elastasa de acuerdo con la invención puede(n) ser administrado(s) junto con otros componentes de agentes biológicamente activos, tales como tensioactivos, excipientes, portadores, diluyentes y vehículos farmacéuticamente aceptables.

30 Para administración parenteral (por ejemplo, intravenosa o intramuscular), el(los) inhibidor(es) de elastasa activo(s) puede(n) ser formulado(s) en forma de solución, suspensión, emulsión o polvo liofilizado en asociación con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, agua, solución salina, solución de dextrosa) y aditivos que mantengan la isotonicidad (por ejemplo, manitol) o la estabilidad química (por ejemplo, conservantes y tampones). La formulación se esteriliza por las técnicas habitualmente usadas.

35 La biodisponibilidad del (de los) inhibidor(es) de elastasa activo(s) de acuerdo con la invención puede ser mejorada usando métodos de conjugación que aumenten la semivida de la molécula en el cuerpo humano, por ejemplo enlazando la molécula a polietilenglicol, como se describe en la solicitud de patente PCT WO 92/13095.

40 Las cantidades terapéuticamente eficaces de la molécula activa serán función de muchas variables, incluyendo el tipo de molécula usada, cualquier actividad citotóxica residual exhibida por la molécula, la vía de administración y el estado clínico del paciente.

45 Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es tal que cuando se administra el inhibidor de elastasa da como resultado una menor salida de las células leucémicas a la circulación y/o menor proliferación y/o menor migración y/o migración dirigida. La dosis administrada sencilla o múltiple, a un individuo variará dependiendo de una variedad de factores, incluyendo las propiedades farmacocinéticas de la molécula, la vía de administración, el estado del paciente y sus características (sexo, edad, peso, salud, tamaño), extensión de los síntomas, tratamientos simultáneos, frecuencia del tratamiento y efecto deseado. El ajuste y manipulación de los intervalos de dosis establecidos son bien conocidos por los expertos en la técnica, así como los métodos *in vitro* e *in vivo* de determinar el efecto de la molécula en un individuo.

50 De acuerdo con la invención, el inhibidor de elastasa por ejemplo EI, inhibidor de α 1-antitripsina, anticuerpo anti-elastasa, inhibidor del SDF-1, inhibidor del CXCR4 o una de sus mezclas se puede administrar a un individuo antes, simultánea o secuencialmente que otros regímenes terapéuticos (por ejemplo, regímenes de múltiples fármacos) o agentes, en una cantidad terapéuticamente eficaz, en particular con HSC y/o células progenitoras trasplantadas y/o agente de movilización.

55 La descripción se refiere además a un método para tratar leucemia, que comprende administrar una cantidad

farmacéuticamente eficaz de un inhibidor de elastasa a un paciente que lo necesite.

La referencia a etapas de métodos conocidas, etapas de métodos convencionales, métodos conocidos o métodos usuales de ningún modo significa admitir que cualquier aspecto, descripción o realización de la presente invención está descrito, enseñado o sugerido en la técnica pertinente.

- 5 La descripción anterior de las realizaciones específicas revelará tan completamente la naturaleza general de la invención que otros puedan — aplicando conocimientos al alcance de los expertos en la técnica (incluyendo el contenido de las referencias citadas en la presente memoria) — modificar y/o adaptar fácilmente para diversas aplicaciones dichas realizaciones específicas sin más experimentación indebida. Por lo tanto, se pretende que dichas adaptaciones y modificaciones estén incluidas en el significado de una gama de equivalentes de las realizaciones descritas, basadas en la enseñanza y guía contenidas en la presente memoria.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Las células de AML humana primaria segregan elevadas cantidades anómalas de elastasa que están relacionadas con los niveles de blastocitos en la circulación. La elastasa segregada en la médula ósea (BM) y en el plasma de la sangre periférica (PB) fue cuantificada por ELISA (según las instrucciones del fabricante, Bender MedSystems, San Bruno, CA) en 10 pacientes con AML que tenían diferentes subtipos FAB (clasificación Franco-Americana-Británica, véase la tabla A anterior). Los autores de la presente invención encontraron una cantidad variable de elastasa entre las muestras de BM y PB (Fig. 1A). Curiosamente, pudo observarse una correlación entre el nivel de elastasa en la BM y los subtipos (o FAB) de AML. Por ejemplo, el tipo de AML poco diferenciado (M0) tenía niveles muy bajos de elastasa en la médula ósea, mientras que las células más diferenciadas tenían mayores niveles de la enzima. La APL y la leucemia mielomonocítica (M4) tenían una cantidad notablemente alta de elastasa segregada en la BM (Fig. 1A). Sin embargo, no se encontró correlación entre los niveles variables de elastasa en la PB y los diferentes subtipos de AML. Cuando se comparó con el plasma de la PB de individuos normales, se observó una concentración significativamente mayor de elastasa en la mayoría de los pacientes con AML (Fig. 1B). Es digno de mención que en dos pacientes con AML (M2 y M5) que casi no tenían blastocitos en la circulación, se detectaron niveles normales de elastasa (Fig. 1B). Esta observación sugiere que la concentración de elastasa en la PB puede estar correlacionada con el número de blastocitos leucémicos circulantes. En realidad, cuando se comparó la cantidad de proteína elastasa segregada en el plasma y el número de blastocitos de AML en la sangre periférica, se encontró una correlación significativa entre estos parámetros (Fig. 1 C). Estos resultados demuestran que el nivel de proteína elastasa segregada en el plasma es debido a los blastocitos de AML presentes en la sangre, lo que sugiere que la elastasa puede participar en la diseminación de las células malignas de AML. Cabe destacar que la concentración de elastasa era muy baja en el plasma PB de un paciente tipo M0 a pesar del alto número de leucocitos (abreviadamente WBC, por la expresión inglesa *White Blood Cells*).

Ejemplo 2. Las células de AML expresan constitutivamente elastasa en su superficie celular. En los neutrófilos, la expresión de la elastasa es inducida después de activación de los neutrófilos o durante la desgranulación que tiene lugar cuando mueren las células. Puede encontrarse elastasa en el medio acondicionado de los neutrófilos activados. Sin embargo, los neutrófilos activados también expresan la elastasa unida a la membrana, que, por una señal quimiotáctica, es relocalizada en el borde delantero de los neutrófilos migrantes (Cepinskas, 1999).

Puesto que las células de AML presentaban una activación desregulada de la expresión de elastasa, los autores de la presente invención exploraron el nivel de expresión y la localización de elastasa en 4 líneas de células de AML (HL-60, U937, ML-1, ML-2), así como en las células AML primaria.

La elastasa de la superficie celular en las líneas de células de AML primaria o en las células enriquecidas CD34+ de la CB se analizó por citometría de flujo como sigue: se incubaron células de AML con anti-elastasa humana policlonal anti-humana (Biosdesign, Kennebunkport, ME) durante 30 minutos, se lavaron y se detectó la unión a anticuerpos utilizando FITC anti-conejo secundario (panel superior de la Figura 2A y Figura 2B).

Se detectó la elastasa citoplásmica como sigue: por tinción para citometría de flujo intracelular después de fijación en paraformaldehído al 4% durante 20 min y permeabilización en tritón al 0,5% durante 10 min (panel inferior de la Fig 2A). Usando esta propuesta, los autores de la presente invención encontraron altos niveles de elastasa en la superficie de las células de AML. Además por FACS, los autores de la presente invención confirmaron la presencia de elastasa unida a membrana por microscopía de inmunofluorescencia (Figura 2B).

Además, los autores de la presente invención no encontraron co-localización entre CXCR4 y elastasa (datos no mostrados).

Estos resultados sugieren que las células de AML no sólo segregan elastasa independientemente del estímulo externo, sino que también expresan constitutivamente elastasa unida homogéneamente a la superficie celular. Cepinskas et al. (*Journal of Cell Science*, 112, 1937, 1999) indicaron que la elastasa unida a membrana en neutrófilos activados es catalíticamente activa y resistente a la proteólisis por las proteasas circulantes. Por tanto, la elastasa unida a membrana en las células de AML puede permitir que las células de AML atraviesen la barrera endotelial de la médula ósea y facilitar su diseminación en la circulación.

Ejemplo 3. El inhibidor de elastasa disminuye la migración inducida por SDF-1 de las células de AML. Para estudiar el papel de la elastasa en la migración de las células de AML, los autores de la presente invención evaluaron el efecto de la inhibición de elastasa sobre la migración de las células de AML espontánea o inducida por SDF-1, por un ensayo *in vitro* en placas *Transwell*. El ensayo de migración se realizó como sigue: un total de 600 mL de RPMI suplementado FCS al 10% en presencia o ausencia de 125 ng/mL de SDF-1 humano recombinante (rhSDF-1) (PeproTech, Rocky Hill, NJ) se añadió a la cámara inferior de placas *Transwell* de 24 pocillos de Costar con filtros de poros de 5 µm (Corning, NY). Cien mil células primarias leucémicas de MNC o de líneas de células de AML con o sin tratamiento previo durante 30 minutos con el inhibidor de elastasa (EI) MeOSuc-AAPV-CMK (10 µg/mL Calbiochem, La Jolla, CA) o anticuerpo monoclonal anti-elastasa de neutrófilos anti-humano de ratón (50-100 µL de 70 µg/mL, Dako, Glostrup, Dinamarca) se añadieron a la cámara superior y se dejaron que migraran hasta la cámara inferior durante 4 horas a 37°C. Las células que migraron se recogieron en la cámara inferior y se contaron utilizando un FACS Calibur (Becton Dickinson).

Los resultados obtenidos por el ensayo *in vitro* mostraron que la pre-incubación de las células primarias y las líneas de células de AML, durante 30 minutos con 5-10 µg/mL de EI, redujeron significativamente la migración dependiente de SDF-1 de las células ($p = 0,039$) (Fig. 3A). También se redujo la migración espontánea en ausencia de SDF-1, (datos no mostrados). Con el fin de confirmar el papel de la elastasa en la migración de las células de AML, los autores de la presente invención utilizaron en el mismo ensayo, en lugar de EI, anticuerpos anti-elastasa neutralizantes o el inhibidor de proteasas, inhibidor de $\alpha 1$ -antitripsina (100 µg/mL) (Figuras 3B y C respectivamente). Los resultados obtenidos con el anticuerpo y con el inhibidor de proteasas fueron similares a los resultados obtenidos con EI y confirmaron el papel de la elastasa en la migración de las células de AML.

Estas observaciones demuestran que la elastasa es importante tanto para la migración espontánea de las células de AML como para la dependiente de SDF-1. Para analizar si la disminución de la migración por la inhibición de elastasa es debida finalmente a la reducción en la expresión de CXCR4, los autores de la presente invención examinaron el efecto de la inhibición de elastasa sobre la expresión de CXCR4 en la AML. Se encontró que el EI no cambiaba el nivel de la expresión de CXCR4 en la superficie celular cuando se examinó por FACS (datos no mostrados). Por tanto, parece que la elastasa en la migración de las células de AML no actúa en la regulación de CXCR4.

La migración de las células requiere transposiciones citoesqueléticas y se demostró que el SDF-1 induce las transposiciones citoesqueléticas, lo que conduce a la formación de protrusiones y polarización celular (Avigdor et al., *Blood*, 2004 Apr 15; 103(8):2981-9. Epub 2004 Jan 15.). Cuando las células leucémicas se trataron previamente con el inhibidor de elastasa (EI), se impidió la formación de protrusiones inducidas por SDF-1 (Fig. 3D). Es digno de mención que el EI también suprimió la polarización de las células basales en ausencia de SDF-1. Estos resultados sugieren que la elastasa participa en la movilidad de las células leucémicas por regulación directa de las transposiciones citoesqueléticas y la polarización celular.

Puesto que el ensayo *Transwell* se realizó en filtros sin recubrimiento, el efecto observado no es debido a la degradación de las macromoléculas de la matriz extracelular (ECM). En realidad, los autores de la presente invención demostraron que la inhibición de elastasa evitó la polarización celular y la formación de protrusiones, lo que implica la regulación por la elastasa de las transposiciones citoesqueléticas.

Los resultados muestran que la inhibición de elastasa bien por inhibidores de elastasa, $\alpha 1$ -antitripsina o anticuerpos neutralizantes de elastasa, afectó a la migración de las células de AML, tanto la espontánea como la inducida por SDF-1. Por tanto, los resultados muestran que la elastasa es necesaria para la migración de las células de AML.

Ejemplo 4. La elastasa es necesaria para dirigir las células de AML humana a la BM de NOD/SCID. El modelo pre-clínico de ratones NOD/SCID inmunodeficientes permite el injerto de células madre de AML humana e imita muchos aspectos de AML humana (Lapidot, *Nature*, 1994 Feb 17; 367(6464):645-8.).

Con el fin de evaluar el efecto de la inhibición de elastasa sobre la migración *in vivo* (o migración dirigida) de las células de AML humana a la BM, se inyectaron células mononucleares (MNC) de AML primaria (5×10^6) a ratones NOD/SCID B2mnull irradiados sub-letalmente, no tratados o después de incubación durante 30 minutos con EI (10 µg/mL).

Más específicamente, las MNC de AML humana primaria, células de AML enriquecidas en CD34+ o células de la CB a las dosis celulares indicadas se pusieron en suspensión en 500 mL de RPMI con FCS al 10% incubada durante 30 minutos a 37°C con o sin inhibidor de elastasa (10 µg/mL) antes de la inyección a los ratones a través de la vena dorsal de la cola. Se sacrificaron los ratones 16 horas después del trasplante, se recogieron células de la BM arrastradas tanto del fémur como de la tibia y se volvieron a poner en suspensión en una suspensión de una sola célula. Se determinó el porcentaje de células humanas por inmunotinción con el anticuerpo monoclonal anti-CD45 humano-FITC (Immuno Quality Products, Groningen, Países Bajos). Se bloquearon los receptores Fc humanos con plasma humano (1%) y los receptores Fc de muridos con CD16-CD32 anti-ratón (Pharmingen) (1:50). Se usaron anticuerpos para control del isotipo con el fin de excluir las células falsas positivas (BD). Después de la tinción, se analizaron las células en un citómetro FACS Calibur (BD) que utiliza el programa informático Cell Quest.

Los resultados obtenidos muestran que la migración dirigida de las células de M2 y M4 de AML primaria en la BM de ratones NOD/SCID disminuyó significativamente en células tratadas con EI en comparación con las células control no tratadas (Fig. 4 A/B). Curiosamente, la migración dirigida de las células de M1 y M5 de AML primaria no fueron inhibidas sino que aumentaron bastante (Fig. 4A).

- 5 A continuación se examinó la migración dirigida de células enriquecidas en CD34+ después de la inhibición de elastasa. Con el fin de analizar poblaciones de células madre primitivas similares, se compararon células CD34+ de la CB con células enriquecidas en CD34+ de AML primaria de otros tres pacientes ($1,5-3 \times 10^6$) con diferentes subtipos FAB. Como con las MNC de algunos pacientes, se observó la inhibición de células enriquecidas en CD34+ de AML primaria. La inhibición de elastasa disminuyó la migración dirigida de las células de enriquecidas en CD34+ con relación a las células de BM de muridos (Fig. 4C), mientras que aumentó la migración dirigida de células CD34+ normales (Fig. 4C). Considerados juntos, estos resultados indican que la elastasa tiene un efecto opuesto sobre la migración dirigida de las células CD34+ normales y de las células de la leucemia mieloide.

Ejemplo 5. La salida de las células de AML desde la BM hasta la circulación es inhibida por la administración *in vivo* de inhibidor de elastasa. El G-CSF induce la salida de células madre desde la BM hasta la circulación (movilización). Parece que la movilización es causada por varios cambios en el microambiente hematopoyético de la BM que incluyen la degradación de VCAM-1, del receptor c-kit y del SDF-1 por enzimas proteolíticas, tales como catepsina G y elastasa. [Petit, *Nat Immunol.*, 2002 Jul; 3(7):687-94, 2002; Levesque, 2003 *J. Clin. Invest.* 2003 Jan; 111(2):187-96, Levesque *Exp. Hematol.* 2003 Feb; 31(2):109-17]. El bloqueo de elastasa impide la movilización inducida por el G-CSF (Petit and Lapidot *Exp. Hematol.*, 2002 Sep; 30(9):973-81, 2002). Las células leucémicas expresan un alto nivel de varias proteasas, tales como MMP-2, MMP-9, MT1-MMP (Ries et al., *Clinical Cancer Research* 1999, (5) 1115) y elastasa. En vista del hallazgo de los autores de la presente invención de que la elastasa tiene un papel en la regulación de la movilidad y la migración dirigida de las células de AML (Ejemplos 3 y 4), dichos autores suponen que, de todas las proteasas expresadas por las células de AML, la elastasa puede facilitar la salida de las células de AML desde la BM hasta la circulación.

- 25 Con el fin de analizar esta suposición, se inyectaron células de AML primaria ($20-40 \times 10^6$) a ratones NOD/SCID irradiados sub-letalmente para establecer el quimerismo AML humana-ratones y se observó la salida de las células de AML desde la médula ósea hasta la circulación, dos a cuatro semanas más tarde, en ratones tratados con inhibidor de elastasa en comparación con ratones no tratados.

- 30 Más específicamente, se inyectaron las MNC de AML humana primaria ($10-30 \times 10^6$) o la línea de células HEL60 de AML (20×10^6) a ratones NOD/SCID. Dos a cuatro semanas más tarde, se inyectó EI (1 mg) una vez al día durante 4 días consecutivos. Se recogió la PB de ratones asfixiados con nieve carbónica por aspiración cardiaca en tubos heparinizados y se extrajo la BM como se ha mencionado antes. Se determinó el porcentaje de células humanas por inmunofluorescencia para CD45 como se ha descrito antes.

- 35 Los resultados observados muestran que la salida de las células de AML hasta la PB disminuyó en ratones tratados con EI en comparación con ratones no tratados (Fig. 5 y Tabla B). Se observaron resultados similares tanto con células primarias humanas como con la línea de células de AML humana.

Estos resultados muestran por primera vez que la elastasa participa en la regulación de la emigración de células de AML humana desde la BM hasta la circulación y que la administración de inhibidor de elastasa puede impedir eficazmente la salida de las células de AML desde la médula ósea hasta la circulación.

- 40 Tabla B

	CTL			EI		
	BM (%)	PB (%)	PB/BM	BM (%)	PB (%)	PB/BM
Nº 1 M2	80	56	0,7	80	6	0,07
Nº 2 M4	35	5	0,14	50	2,5	0,05
Nº 3 M4	79	14	0,177	12,7	0,5	0,039

Ejemplo 6. El crecimiento de las células de AML depende de la elastasa. La AML se caracteriza por la proliferación amplia y descontrolada de las células de AML en la BM. Los autores de la presente invención comprobaron la posibilidad de que la elastasa pueda afectar a la proliferación de las células de AML.

- 45 Para determinar el papel de la elastasa en la proliferación de las células de AML, se cultivaron células de AML primaria (1×10^6 /mL), líneas de células de AML (1×10^4 /mL) o células normales enriquecidas en CD34+ de la sangre del cordón umbilical (CB) (1×10^5 /mL) en RPMI suplementado con FCS al 10% con o sin inhibidor de elastasa ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$). El número de células viables se determinó los días 0, 1, 3, 5 y 7 usando exclusión con azul tripán.

El efecto del EI sobre la tasa de proliferación de las MNC de AML primaria y de las líneas de células de AML (ML-2,

U937) se evaluó después de 3-7 días respectivamente en cultivo. El número de células primarias se redujo después de 3 días de cultivo y la adición de EI disminuyó significativamente el número de células viables de AML (Fig. 6A). Después de 7 días de cultivo aumentó el número de ML2 y U937 y se inhibió la proliferación celular al cultivar las células en presencia de EI (Fig. 6A). Por tanto, los resultados indican que la elastasa induce la proliferación de las células de AML.

Cuando se cultivaron células normales CD34+ de la CB en las mismas condiciones, la inhibición por elastasa mejoró su tasa de proliferación (Fig. 6A). Por otra parte, los autores de la presente invención encontraron que el porcentaje de células progenitoras primitivas CD34+/38- aumentó significativamente después de 3 días de cultivo en presencia de citoquinas y de EI (Fig. 6B). Por tanto, los resultados indican que la elastasa puede inhibir la proliferación de las células normales y sugiere que tiene un papel en la diferenciación de las células madre normales.

Por consiguiente, se encontró de acuerdo con la presente invención que la elastasa es necesaria para la proliferación de las células de AML y que la inhibición de la elastasa puede impedir eficazmente el crecimiento de las células de AML y, al mismo tiempo, inducir la proliferación de las células CD34+ normales manteniendo en el cultivo células madre primitivas CD34+/38- aceptables para trasplante.

Ejemplo 7. El SDF-1 aumenta la expresión de la elastasa superficial en células de AML y la disminuye en las células CD34+ normales. Los autores de la presente invención mostraron que la migración dirigida de las células malignas de AML humana y las células pre-B de ALL hasta la BM y el bazo de ratones NOD/SCID/B2mnull depende también de las interacciones SDF-1/CXCR4 [Tavor *Cancer Res.* 2004 Apr 15; 64(8):2817-24.]. Los autores de la presente invención supusieron que parte del efecto del SDF-1 sobre la migración de las células de AML puede conseguirse por medio de la regulación de la expresión de la elastasa.

Con el fin de confirmar esta suposición, se trataron células de AML primaria y células CD34+ normales de la CB con SDF-1 (200 ng/mL) durante 1 y 3 horas y se determinó por FACS la expresión de la elastasa en la superficie celular (Figura 7).

El resultado obtenido muestra que el SDF-1 tiene un efecto opuesto sobre la expresión de la elastasa en la superficie celular en la AML al que tiene sobre la expresión de la elastasa en las células CD34+ normales de la CB, mientras que el SDF-1 aumenta la elastasa en la superficie en las células de AML, disminuye la elastasa en la superficie de las células CD34+ normales de la CB.

Por tanto, a la vista de los resultados obtenidos, el SDF-1 afecta a la migración de las células de AML, en contraste con la migración de las células CD34+ normales, aumentando la expresión de la elastasa en la superficie celular.

Ejemplo 8. Cultivos celulares. Se cultivaron las líneas de células: U937, HL60, ML2 y ML1 de la leucemia mieloide humana (Hadassah University Hospital, Jerusalem, Israel) en RPMI con suero fetal de ternero (FCS) al 10%.

Células humanas: se obtuvieron células humanas de la sangre del cordón umbilical (CB) de partos a término y células de sangre periférica (PB) y/o de BM, de 15 pacientes de AML recién diagnosticada. La diagnosis de la leucemia se basó en la evaluación morfológica habitual, frotis de inmunofenotipado y citoquímicos que usan la clasificación FAB.

Las muestras se diluyeron 1:1 en disolución salina tamponada con fosfato (PBS). Se recogieron células mononucleares (MNC) de baja densidad después de separación estándar en Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) y se lavaron en PBS. Las células CD34+ se enriquecieron utilizando el kit de aislamiento de células MACS y el clasificador magnético de células AutoMacs (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Alemania) según las instrucciones del fabricante, obteniéndose una pureza mayor del 95%. Las células se usaron recientes o congeladas en FCS más de dimetilsulfóxido al 10% (DMSO) para conservación en nitrógeno líquido.

REFERENCIAS

Aprikyan AA, Dale DC. *Mutations in the neutrophil elastase gene in cyclic and congenital neutropenia.* *Curr. Opin. Immunol.* 2001;13:535-538.

Ginzberg HH, Cherapanov V, Dong Q, et al. *Neutrophil-mediated epithelial injury during transmigration: role of elastase.* *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2001;281:G705-717

Bank U, Ansorge S. *More than destructive: neutrophil-derived serine proteases in cytokine bioactivity control.* *J. Leukoc. Biol.* 2001;69:197-206

Lee WL, Downey GP. *Leukocyte elastase: physiological functions and role in acute lung injury.* *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001;164:896-904

Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA. 1996 "A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)" *J. Exp. Med.* 184, 1101-1109,

Drize N, Chertkov J, Samoilina N, Zander A. 1996 "Effect of cytokine treatment (granulocyte colony-stimulating factor

- and stem cell factor) on hematopoiesis and the circulating pool of hematopoietic stem cells in mice." *Exp. Hematol.* 24, 816-822.
- Duhrsen U, Villeval JL, Boyd J, Kannourakis G, Morstyn G, Metcalf D. 1988 "Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on hematopoietic progenitor cells in cancer patients." *Blood* 72, 2074-2081.
- 5 El Ouriaghli F, Fujiwara H, Melenhorst JJ, et al. Neutrophil elastase enzymatically antagonizes the in vitro action of G-CSF: implications for the regulation of granulopoiesis. *Blood*. 2003;101:1752-1758
- El Ouriaghli F, Sloand E, Mainwaring L, et al. Clonal dominance of chronic myelogenous leukemia is associated with diminished sensitivity to the antiproliferative effects of neutrophil elastase. *Blood*. 2003;102:3786-3792
- Grisham and Thorgeirsson, in *Stem Cells, C.S. Ed.* (Academic Press, San Diego, CA, 1997), chap, 8.
- 10 Heissig B, Hattori K, Dias S, et al. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell*. 2002;109:625-637
- Hunter MG, Druhan LJ, Massullo PR, et al. Proteolytic cleavage of granulocyte colony-stimulating factor and its receptor by neutrophil elastase induces growth inhibition and decreased cell surface expression of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Am. J. Hematol.* 2003;74:149-155
- 15 Kim and Broxmeyer 1998 "In vitro behavior of hematopoietic progenitor cells under the influence of chemoattractants: stromal cell-derived factor-1, steel factor, and the bone marrow environment." *Blood*, 1, 100-110.
- Kim CH, Broxmeyer HE. SLC/exodus2/6Ckine/TCA4 induces chemotaxis of hematopoietic progenitor cells: differential activity of ligands of CCR7, CXCR3, or CXCR4 in chemotaxis vs. suppression of progenitor proliferation. *J. Leuk. Biol.* 1999; 66:455
- 20 Kollet O, Spiegel A, Peled A, Petit I, Byk T, Hershkovitz R, Guetta E, Barkai G, Nagler A, Lapidot T. "Rapid and efficient homing of human CD34(+)/CD38(-/low)/CXCR4(+) stem and progenitor cells to the bone marrow and spleen of NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice" *2001 Blood* 97, 3283-91.
- Lagasse et al. 2000 "Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo." *Nature Medicine* 6, 1229-34.
- 25 Lagasse et al. 2001 "Toward regenerative medicine." *Immunity* 14, 425-36.
- Lapidot 2001 *Ann. NY Acad. Sci.* "Mechanism of human stem cell migration and repopulation of NOD/SCID and B2mnull NOD/SCID mice. The role of SDF-1/CXCR4 interactions" 938, 83-95
- Lotti et al. *Journal of Virology*. 2002 "Transcriptional targeting of lentiviral vectors by long terminal repeat enhancer replacement. 76 (8) 3996-4007.
- 30 Mazo IB, von Andrian UH. 1999 "Adhesion and homing of blood-borne cells in bone marrow microvessels." *Journal of leukocyte Biology* 66, 25-32.
- Novelli, M. et al. 1996 "Polyclonal origin of colonic adenomas in an XO/XY patient with FAP". *Science* 272, 1187-1190
- 35 Novikoff PM, Yam A, Oikawa I. "Blast-like cell compartment in carcinogen-induced proliferating bile ductule." *Am. J. Pathol.* 1996 May;148(5):1473-92.
- Papayannopoulou T. 1999 "Hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. A continuing quest for etiologic mechanisms." *Ann. N Y Acad. Sci.* 872, 187-197; discussion 197-9.
- Peled A, Petit I, Kollet O, Magid M, Ponomaryov T, Byk T, Nagler A, Ben-Hur H, Many A, Shultz L, Lider O, Alon R, Zipori D, Lapidot T. 1999 "Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4." *Science* 283, 845-848.
- 40 Peled A, Grabovsky V, Habler L, Sandbank J, Arenzana-Seisdedos F, Petit I, Ben-Hur H, Lapidot T, Alon R. 1999 "The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow." *The Journal of Clinical Investigation*, 104, 1199-1211.
- Petersen et al. 1999 "Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells". *SCIENCE* 284, 1168-70.
- 45 Papayannopoulou T. Current mechanistic scenarios in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. *Blood*. 2004;103:1580-1585. Epub 2003 Nov 1586.
- Ponomaryov T, Peled A, Petit I, et al. "Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function." *J. Clin. Invest.* 2000;106:1331-1339.

- Rosu-Myles M, Gallacher L, Murdoch B, Hess DA, Keeney M, Kelvin D, Dale L, Ferguson SS, Wu D, Fellows F, Bhatia M. 2000 "The human hematopoietic stem cell compartment is heterogeneous for CXCR4 expression." PNAS 97, 14626-14631.
- 5 Siena S, Bregni M, Brando B, Ravagnani F, Bonadonna G, Gianni AM., 1989 "Circulation of CD34+ hematopoietic stem cells in the peripheral blood of high-dose cyclophosphamide-treated patients: enhancement by intravenous recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor." Blood 74,1905-1914.
- Suzuki et al. Intern. Immunol. 1998 "Loss of SDF-1 receptor expression during positive selection in the thymus" 10 8 1049-1056.
- 10 Sweeny, EA., Priestley, G., Nakamoto, B., Papayannopoulou, T. 2000 "Sulfated Polysaccharides Increase levels of SDF-1 in Monkeys and Mice: Involvement in Mobilization of Stem/Progenitor Cells." Abstracts of the 42nd annual meeting of the American Society of Haematology, December 1-5.
- Tanaka et al. 1999 "Fetal microchimerism alone does not contribute to the induction of primary biliary cirrhosis" Hepatology, 30, 833-838.
- To LB, Haylock DN, Simmons PJ, et al. *The biology and clinical uses of blood stem cells.* Blood. 1997;89:2233-2258.
- 15 Wolfe et al. 1985 J. Mol. Biol. "Isolation and characterization of an alphoid centromeric repeat family from the human Y chromosome." 182, 477-485.
- Zheng et al. Nat. Biotechnology 2000 "Genomic integration and gene expression by a modified adenoviral vector." 18, 176-180.

REIVINDICACIONES

1. El uso de un inhibidor de elastasa en la fabricación de un medicamento para evitar o inhibir la salida de células de la AML desde la médula ósea hasta la sangre en pacientes que padecen AML, o
- 5 para evitar o inhibir la proliferación de células de la AML.
2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, para el tratamiento de leucemia aguda.
3. El uso de acuerdo con la reivindicación 2, para el tratamiento de AML.
4. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el inhibidor es un anticuerpo neutralizante de elastasa o MeOSuc-AAPV-CMK o α 1-antitripsina.
- 10 5. Un inhibidor de elastasa para uso en la prevención o inhibición de la salida de células de AML desde la médula ósea hasta la sangre de pacientes que padecen AML o para el uso en la prevención o inhibición de la proliferación de células de AML.
6. El inhibidor de elastasa de la reivindicación 5, para uso en el tratamiento de la leucemia aguda.
7. El inhibidor de elastasa de la reivindicación 6, para uso en el tratamiento de AML.
- 15 8. Un inhibidor de elastasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en donde el inhibidor es un anticuerpo neutralizante de elastasa o MeOSuc-AAPV-CMK o α 1-antitripsina.

FIGURA 1

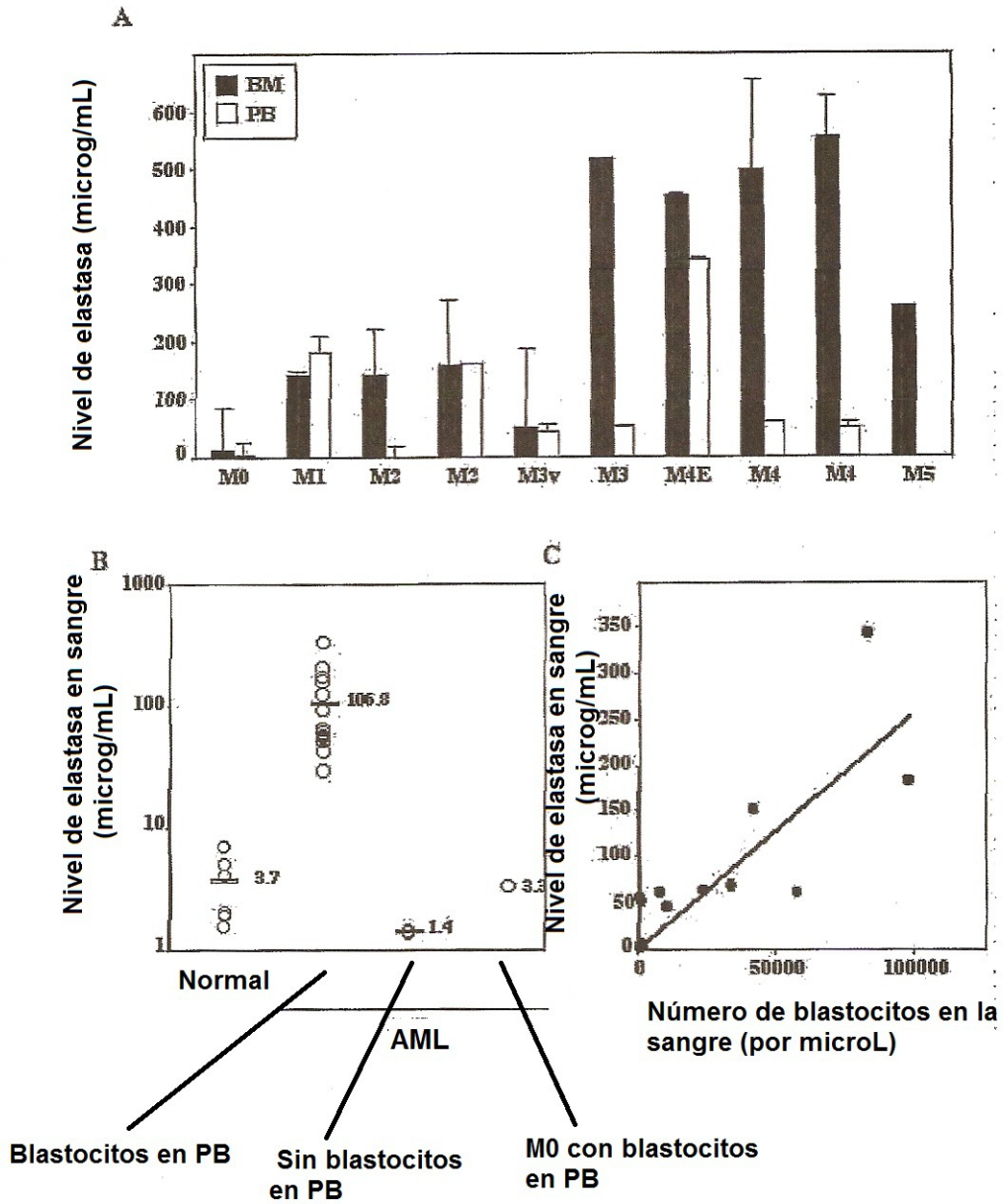


FIGURA 2

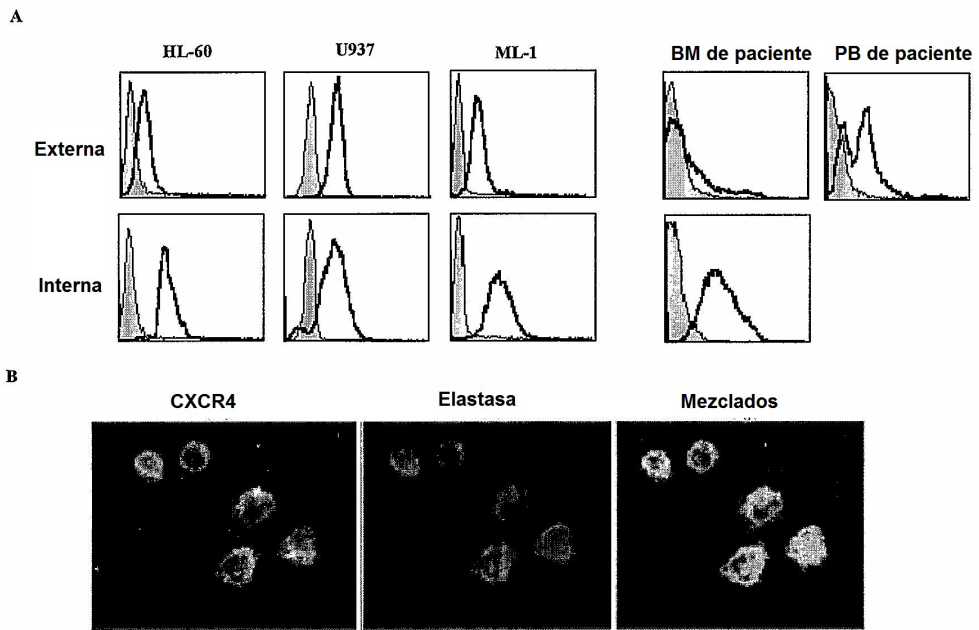


FIGURA 3

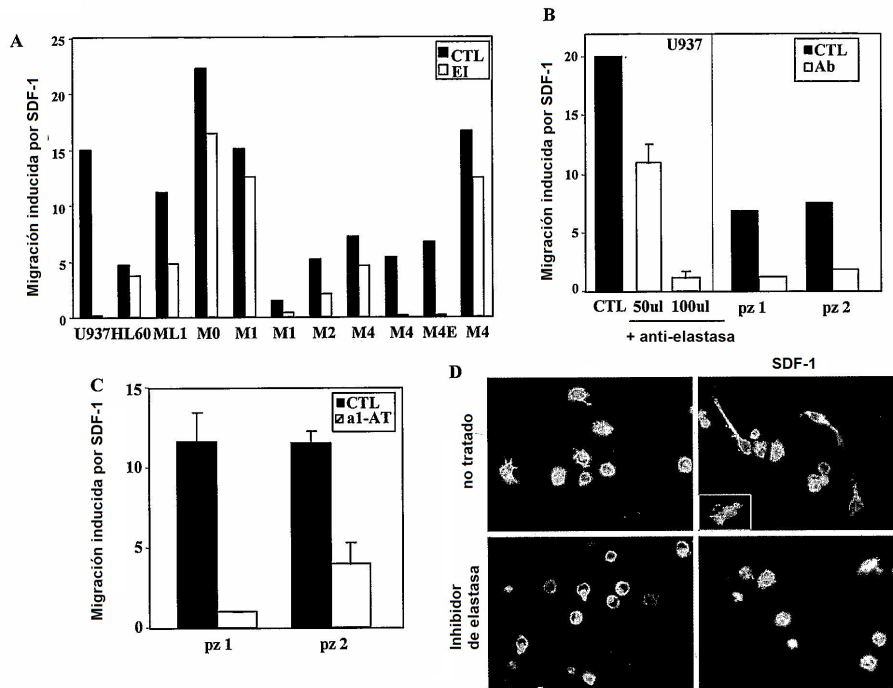


FIGURA 4

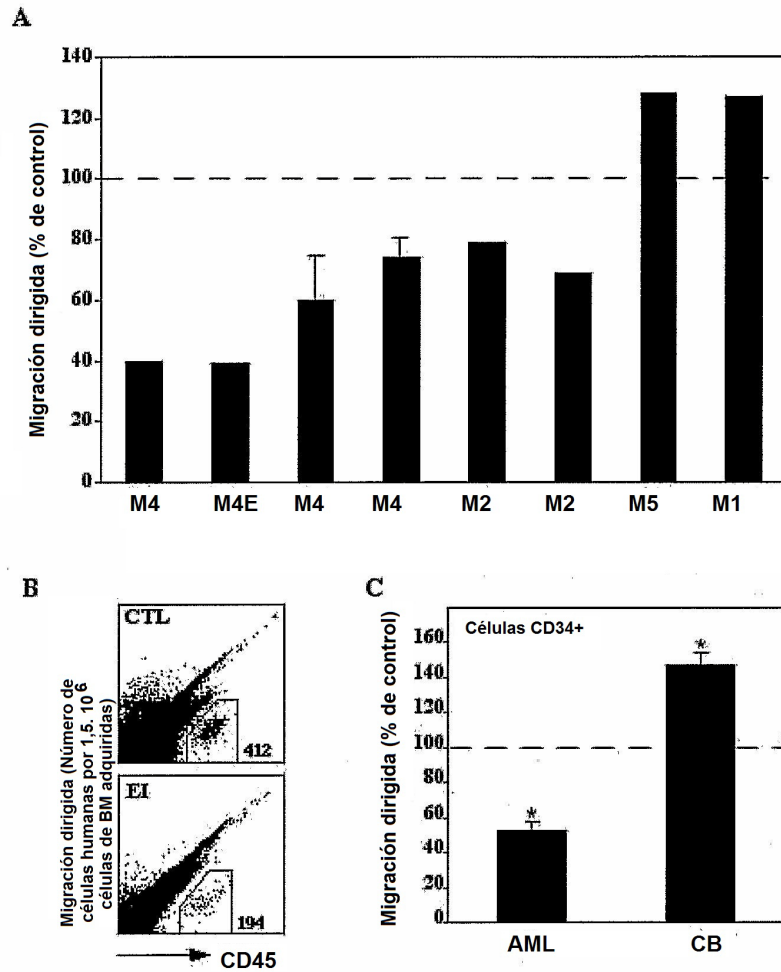


FIGURA 5

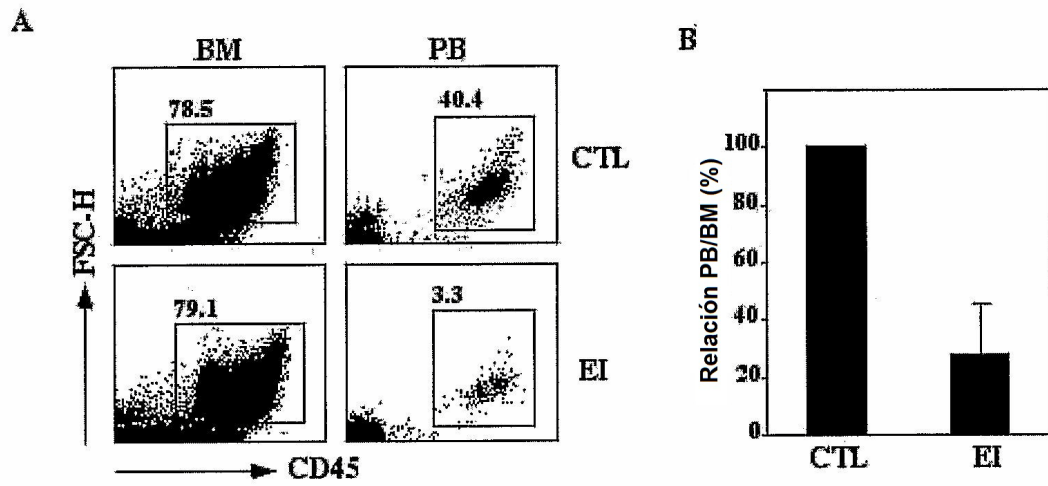
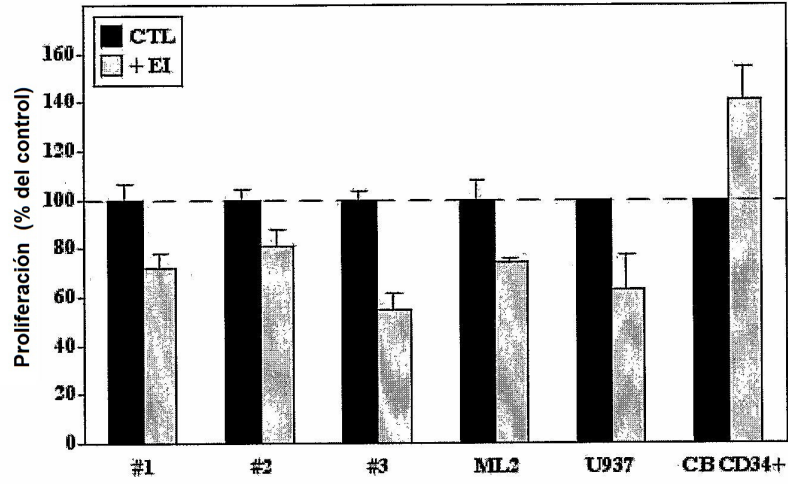


FIGURA 6

A



B

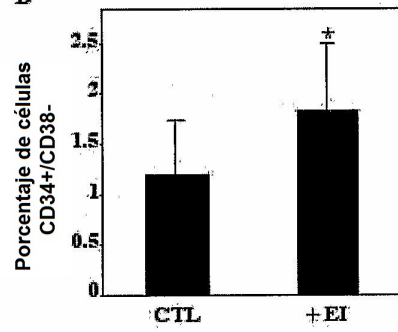
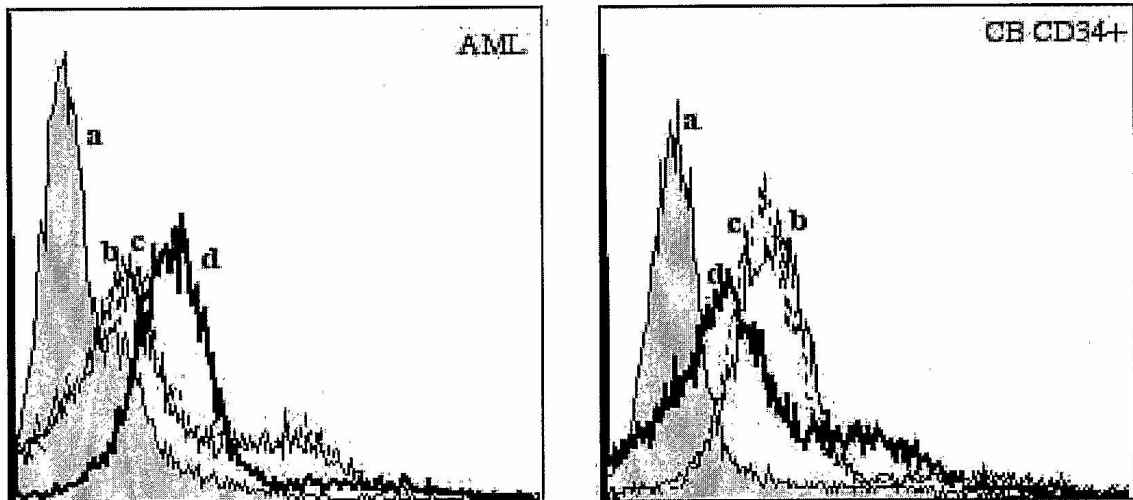


FIGURA 7



Nuevos datos:

El SDF-1 aumenta la expresión de elastasa en la superficie de células de AML y disminuye en células CD34+ normales.

Las células de AML primarias y las células CD34+ de CB fueron tratadas con SDF-1 (200 ng/ml) durante 1 y 3 horas. La expresión de elastasa se determinó por FACS: (a) control del isotipo: (b) células no tratadas, (c) una hora con SDF-1, y (d) 3 horas con SDF-1.