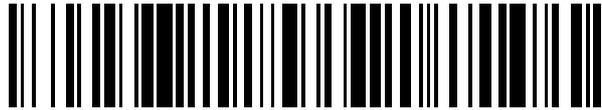


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 482 342**

21 Número de solicitud: 201232037

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**27.12.2012**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**01.08.2014**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2013/070923**

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)**

**Serrano nº 117  
28006 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**TORIBIO GARCÍA, María Luisa;  
GONZÁLEZ GARCÍA, Sara;  
GARCÍA PEYDRÓ, Marina;  
ALCAIN SÁNCHEZ, Juan y  
FUENTES VILLAREJO, Patricia**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

54 Título: **TRATAMIENTO TERAPÉUTICO DE LEUCEMIAS LINFOBLÁSTICAS AGUDAS T y B Y  
LINFOMAS HUMANOS POR INHIBICIÓN DEL RECEPTOR DE INTERLEUQUINA-7 (IL-7R)**

57 Resumen:

La presente invención se refiere al tratamiento terapéutico de leucemias linfoblásticas agudas (LLA) humanas de células T y B (LLA-T y LLA-B) y linfomas humanos, por inhibición del receptor de interleuquina-7 (IL-7R) humana. Un primer aspecto de la presente invención es un agente inhibidor o bloqueante, preferentemente un anticuerpo o un fragmento del mismo, capaz de bloquear la función de la cadena {a} del receptor de interleuquina 7 (IL-7R ) humano, para la prevención y/o el tratamiento de una LLA humana o de un linfoma humano. Asimismo, la presente invención hace referencia a una composición farmacéutica y a un modelo de identificación, expansión y mantenimiento in vivo de células iniciadoras de LLA-T y LLA-B primarias humanas con capacidad de iniciar el injerto de la leucemia en ratones inmunodeficientes, así como la caracterización de estas células iniciadoras de LLA-T y LLA-B como células que expresan altos niveles del IL-7R.

ES 2 482 342 A1

## TRATAMIENTO TERAPÉUTICO DE LEUCEMIAS LINFOBLÁSTICAS AGUDAS T y B Y LINFOMAS HUMANOS POR INHIBICIÓN DEL RECEPTOR DE INTERLEUQUINA-7 (IL-7R)

### DESCRIPCIÓN

#### Sector de la técnica

5 La presente invención forma parte del sector de la química y la farmacia, en concreto se refiere al uso terapéutico de agentes inhibidores del receptor de la interleuquina 7 (IL-7) humana para el tratamiento y/o la prevención de la leucemia linfoblástica aguda (LLA) humana de células T y B (LLA-T y LLA-B, respectivamente), extensible a linfomas T y B. La presente invención también hace referencia a la identificación del IL-7R como un marcador de las células que inician y mantienen las leucemias LLA-T y LLA-B (LICs).

10

#### Estado de la técnica

15 La LLA es un tumor agresivo que aparece por la transformación oncogénica de los progenitores linfoides T o B durante su desarrollo (LLA-T y LLA-B, respectivamente), y constituye el cáncer infantil más frecuente (Pui *et al.*, 2008). Existen grandes similitudes entre las LLAs y los linfomas, especialmente entre las LLA-T y los linfomas T, por lo que la mayoría de los oncólogos clínicos coinciden en que ambas entidades representan dos manifestaciones de la misma enfermedad que, de hecho, suelen tratarse con las mismas terapias (Aifantis *et al.*, 2008). El término LLA se utiliza, por tanto, para definir ambas patologías.

20 La LLA, especialmente la LLA-T, tiene un mal pronóstico, aunque el desarrollo de tratamientos de quimioterapia intensiva en las últimas décadas ha incrementado notablemente la esperanza de vida de los pacientes con LLA de ambos tipos celulares. Sin embargo, la quimioterapia tiene una gran toxicidad y la frecuencia de recaídas, que constituye la principal causa del fracaso del tratamiento, sigue siendo muy alta (del orden del 20%). Además, la supervivencia a 5 años en estos casos no es mayor del 11%, lo que revela una tasa de mortalidad extremadamente alta de los pacientes no respondedores al tratamiento convencional de quimioterapia (Hunger *et al.*, 2011). Por tanto, es urgente desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para prevenir y/o tratar las recidivas y reducir la mortalidad.

25 La mayoría de las recaídas de la LLA ocurren en fases tempranas post-tratamiento y reflejan la resistencia al mismo de una población clonal de células que ya estaban presentes en el momento del diagnóstico (Bailey *et al.*, 2006), y que son las responsables del inicio, la propagación y el mantenimiento de la leucemia, por lo que se denominan células iniciadoras de la leucemia (LIC, del inglés *leukemia initiating cell*), o células madre leucémicas (LSC, del inglés *leukemia stem cell*). El éxito del tratamiento frente a la LLA dependerá, por tanto, de la eficiente eliminación de las LICs. Aunque se han realizado importantes esfuerzos para desarrollar nuevos tratamientos que cumplan este objetivo (Pui y Jeha, 2007), el desarrollo de drogas específicas frente a las LICs que reduzcan la frecuencia de recidivas está todavía en sus fases iniciales. Esta labor es compleja, ya que las LICs representan menos del 1% de la población leucémica total y aún no se han encontrado marcadores específicos de estas células. En consecuencia, el éxito de cualquier nueva terapia depende del desarrollo de estrategias que permitan identificar a las LICs de las LLA-T y LLA-B y caracterizarlas, para avanzar en el diseño de nuevas maniobras que permitan eliminarlas.

30 Entre las moléculas que se han identificado recientemente como posibles dianas de intervención terapéutica en LLA-T y LLA-B se encuentra un grupo de moléculas de señalización que participan en la supervivencia y/o proliferación de las células linfoides normales (Maude *et al.*, 2012). En este grupo se incluyen mTOR, PI3K y quinasas de la familia JAK, que se asocian a receptores de membrana para factores de crecimiento linfoides, como son el receptor de la interleuquina-7 (IL-7R) y el de la timopoyetina derivada del estroma tímico (TSLP-R). La activación aberrante de las vías de señalización PI3K/mTOR y/o JAK/STAT es una importante característica de las LLAs (Maude *et al.*, 2012; Tasian *et al.*, 2012) que determina la proliferación de las células leucémicas de manera independiente de la unión de factores de crecimiento (IL-7 y TSLP) a sus correspondientes receptores de membrana (IL-7R y TSLP-R). Por ello, la utilización de drogas específicas capaces de inhibir la hiperactivación de las vías de señalización JAK/STAT y PI3K/mTOR se prevé como una eficaz estrategia terapéutica para el tratamiento de la mayoría de las leucemias y linfomas, incluyendo aquellas con mutaciones activadoras en las moléculas de señalización asociadas al IL-7R o al TSLP-R (Maude *et al.*, 2012; Tasian *et al.*, 2012), o mutaciones activadoras en los propios receptores IL-7R y TSLP-R (Zenatti *et al.*, 2011; Shochat *et al.*, 2011; Mullighan *et al.*, 2009; Tasian *et al.*, 2012). Estas terapias se encuentran en fase preclínica o en ensayos clínicos en la actualidad, y su relevancia clínica es aún desconocida.

50

No obstante, se sabe que, además de PI3K/mTOR y JAK/STAT, existen otras vías acopladas a los receptores IL-7R y TSLP-R, como por ejemplo MAPK/ERK, que regulan funcionalmente a las anteriores, lo que aumenta el espectro de posibles dianas implicadas en la supervivencia y proliferación de las células leucémicas. Esta heterogeneidad hace previsible la necesidad del uso combinado de diferentes drogas, específicas de rutas de activación individuales, lo que puede suponer un considerable aumento de la toxicidad del tratamiento. Por tanto, el reto actual está en la intervención terapéutica simultánea de todas las vías de señalización acopladas a los receptores IL-7R y TSLP-R y susceptibles de hiperactivación en leucemias y linfomas.

Dentro de las posibilidades de intervención terapéutica simultánea estaría la inhibición de las vías de señalización a nivel del propio receptor. El receptor IL-7R se expresa durante el desarrollo de los linfocitos T y B, y el TSLP-R es exclusivo de los linfocitos B, y ambos se mantienen en una alta proporción de las correspondientes leucemias LLA-T y/o LLA-B (Dibirdik *et al.*, 1991; De Waele *et al.*, 2001) y linfomas (Dalloul *et al.*, 1992; Frishman *et al.*, 1993). El IL-7R está constituido por la cadena IL-7R $\alpha$  y una cadena  $\gamma_c$ , común a otros receptores de citoquinas, que heterodimerizan en presencia de IL-7 (Goodwin *et al.*, 1990; Noguchi *et al.*, 1993), lo que induce la activación de las vías de señalización mencionadas. A su vez, el TSLP-R es un heterodímero formado por IL-7R $\alpha$  y una cadena específica codificada por el gen *CRLF2*. Por tanto, ambos receptores comparten la cadena IL-7R $\alpha$ , por lo que esta molécula es una potencial diana común en leucemias de células T y B. Diferentes estudios indican que las leucemias LLA-B y LLA-T y diferentes tipos de linfomas T y B son capaces de responder a IL-7 o TSLP *in vitro*, (Touw *et al.*, 1990; Benjamin *et al.*, 1994; Nishii *et al.*, 1999; Barata *et al.*, 2004; Sasson *et al.*, 2010; González-García *et al.* 2009; Dalloul *et al.*, 1992; Frishman *et al.*, 1993), lo que reforzaría la relevancia de los receptores IL-7R y TSLP-R como dianas de intervención terapéutica.

Sin embargo, el sello característico de las leucemias y linfomas es la independencia de factores de crecimiento (Hanahan and Weinberg, 2000), por lo que el bloqueo funcional de los receptores para IL-7 o TSLP, o incluso su eliminación de la superficie celular, no se ha considerado hasta el momento como una estrategia terapéutica prometedora. Además, se desconoce la relevancia de estos receptores en la fisiopatología de las ALLs *in vivo*, o en la capacidad de generación tumoral de las LICs, que es finalmente responsable de las resistencias a los tratamientos y/o de las recaídas de las ALLs. Esta información es esencial para el diseño de terapias específicas que, estando dirigidas frente a una única molécula, por ejemplo IL-7R $\alpha$ , puedan incidir de forma generalizada en la mayoría de LLAs y linfomas T y B.

En esta invención se identifica la expresión del IL-7R como un marcador de las LICs de las leucemias LLA-T y LLA-B, cuya inhibición funcional impide el injerto y la expansión leucémica *in vivo*.

### **Breve Descripción de la Invención**

Un primer aspecto de la presente invención es un compuesto útil para tratar Leucemias Linfoblásticas Agudas de células T (LLA-T) o Leucemias Linfoblásticas Agudas de células B (LLA-B) caracterizado por que inhibe la señalización de los receptores de membrana IL-7R y TSLP-R que contienen la cadena alfa del receptor de Interleuquina 7 (IL-7R $\alpha$ ).

En otra realización preferente de la presente invención, se hace referencia al agente inhibidor anteriormente descrito, caracterizado por que dicho agente es un anticuerpo o un fragmento del mismo, capaz de reconocer específicamente y/o selectivamente la proteína IL-7R $\alpha$  y bloquear la unión de su ligando, IL-7 o TSLP.

La presente invención hace referencia también a una composición farmacéutica y/o medicamento caracterizada/o por comprender al menos un agente inhibidor descrito anteriormente. Preferentemente, dicha composición farmacéutica y/o medicamento se caracteriza por que comprende una cantidad terapéuticamente aceptable de al menos un vehículo, y/o un excipiente, y/o un aditivo.

En otro aspecto de la invención, se hace referencia a un modelo de identificación, expansión y mantenimiento *in vivo* de células LICs de LLA-T y LLA-B primarias humanas con capacidad de iniciar el injerto de la leucemia en ratones inmunodeficientes NOD/SCID/ $\gamma_c^{null}$  (NSG), y a la caracterización de estas LICs como células que expresan altos niveles del IL-7R.

En otra realización preferente de la presente invención se hace referencia al modelo de xenotransplante anteriormente descrito, caracterizado por constituir un modelo pre-clínico para el estudio *in vivo* de la expansión y supervivencia de las células leucémicas y de sus LICs, así como de la eficiencia terapéutica de un tratamiento.

### **Descripción de las figuras**

**Figura 1. Expresión de IL-7Rs funcionales en líneas celulares derivadas de leucemias LLA-T y LLA-B humanas.**

(A) Expresión de IL-7R en líneas celulares LLA-T y LLA-B analizadas mediante tinción con un anticuerpo anti-IL-7R $\alpha$  y citometría de flujo. (B) Análisis por RT-PCR de la expresión de ARNm del gen *IL7R* que codifica para IL-7R $\alpha$  humana (SEQ ID No. 2) en líneas LLA-T (KOPTK1 y P12/ICHIKAWA) en las que no se detecta expresión de la proteína en membrana. (C) Estimulación con IL-7 de células CUTLL1 y detección mediante *Western Blot* de la activación por fosforilación de las vías JAK/STAT5, PI3K/AKT y MAPK/ERK.

**Figura 2. La expresión constitutiva del IL-7R es una característica de las células leucémicas primarias de pacientes con LLA-T.**

Expresión de IL-7R en células leucémicas de médula ósea de tres pacientes (T-ALL5, T-ALL8 y T-ALL9) analizada mediante tinción con un anticuerpo anti-IL-7R $\alpha$  y citometría de flujo.

**Figura 3. La expresión constitutiva del IL-7R en leucemias primarias LLA-T humanas confiere una ventaja de proliferación y mayor capacidad de injerto *in vivo* a las células leucémicas.**

(A) Esquema del sistema experimental de xenotrasplante de leucemias primarias LLA-T humanas en ratones inmunodeficientes NOD/SCID/ $\gamma$ c<sup>null</sup> (NSG). (B) Caracterización fenotípica de las células leucémicas procedentes de una LLA-T primaria humana (T-ALL5) tras su injerto en diferentes órganos linfoides del huésped y expresión del IL-7R (negro) superpuesta a los niveles de expresión de IL-7R en las células del paciente previamente al trasplante (blanco). Las gráficas de la derecha muestran los números relativos de células IL-7R+ y la intensidad de fluorescencia de la expresión del IL-7R en las células LLA-T recuperadas en los diferentes órganos del ratón con respecto a las trasplantadas del paciente (n=3). Se observa la expansión selectiva de células con niveles aumentados del IL-7R respecto a las células pre-trasplante, lo que indica su ventaja de crecimiento y su mayor capacidad de injerto *in vivo*.

**Figura 4. La expresión constitutiva del IL-7R en leucemias primarias LLA-B humanas confiere una ventaja de proliferación y mayor capacidad de injerto *in vivo* a las células leucémicas.**

(A) Caracterización fenotípica y niveles de expresión del IL-7R en diferentes muestras de pacientes diagnosticados de LLA-B. Se indican los porcentajes de células positivas para cada marcador analizadas por citometría de flujo. (B) Caracterización fenotípica de las células leucémicas derivadas de una LLA-B humana (LLA-401) que colonizan diferentes órganos tras su trasplante en ratones inmunodeficientes. Las gráficas de la derecha muestran los números relativos de células IL-7R+ y la intensidad de fluorescencia de la expresión del IL-7R en las células LLA-B recuperadas en los diferentes órganos del ratón (n=3). Se observa la expansión selectiva de células con niveles aumentados del IL-7R respecto a las células pre-trasplante, lo que indica su ventaja de crecimiento y su mayor capacidad de injerto *in vivo*.

**Figura 5. Las células iniciadoras de la leucemia (LICs) linfoblástica aguda T se caracterizan por la expresión constitutiva de altos niveles del IL-7R.**

Análisis fenotípico de las LICs de la LLA-T, definidas funcionalmente en el modelo convencional de xenotrasplante seriado. El análisis por citometría de flujo presenta los cambios en los niveles de expresión de IL-7R en las células leucémicas procedentes de la médula ósea de tres pacientes diagnosticados de LLA-T (T-ALL5, T-ALL8 y T-ALL9), tras dos xenotrasplantes consecutivos en ratones inmunodeficientes NSG. Se observa el enriquecimiento sucesivo *in vivo* en células con niveles aumentados del IL-7R respecto a las células pre-trasplante, lo que indica que la expresión del IL-7R es una característica de aquellas células leucémicas con mayor capacidad de injerto y de proliferación *in vivo*, denominadas LICs.

**Figura 6. Silenciamiento de la expresión y función de IL-7R $\alpha$  en líneas leucémicas LLA-T humanas por shRNA.**

(A) Representación esquemática de los sitios de reconocimiento en el ARNm del gen *IL7R* humano por los shRNAs sh1-5 (de secuencias SEQ ID No. 3–7 respectivamente), utilizados para silenciar la expresión de IL-7R $\alpha$ . (B) Expresión de IL-7R $\alpha$  en la membrana de células CUTLL1 infectadas con vectores lentivirales que contienen los diferentes shRNAs frente al *IL7R*. Se muestra el porcentaje de células positivas tras 4 días de selección con puromicina. (C) Expresión en membrana de IL-7R $\alpha$  en las líneas CUTLL1, HPB-ALL y SUPT1 infectadas con los diferentes shRNAs frente al *IL7R*. Los datos representan las medias  $\pm$  SEM de al menos 3 experimentos independientes. (D) Expresión relativa de ARNm de *IL7R* analizada mediante PCR cuantitativa en células HPB-ALL infectadas con los diferentes shRNAs. Los valores se normalizaron a la expresión endógena de *GAPDH*. (E) Expresión en la membrana de IL-7R $\alpha$  (izquierda) y expresión intracelular de fosfo-STAT5 (derecha) por citometría de flujo en células HPB-ALL silenciadas para *IL7R* con sh4 (SEQ ID No. 6) o transducidas con un shRNA control (shsc, SEQ ID No. 8) y estimuladas con IL-7 durante 30 minutos.

**Figura 7. El silenciamiento de la expresión constitutiva del IL-7R por shRNA es funcional *in vivo* en líneas celulares LLA-T y bloquea la expansión tumoral.**

(A, D) Eficiencia de transducción (% de células GFP<sup>+</sup>) y expresión en membrana de IL-7R $\alpha$  analizadas por citometría de flujo en células de las líneas leucémicas LLA-T HPB-ALL (A) y CUTLL1 (D) trasplantadas en ratones inmunodeficientes tras su infección con los vectores sh5 (SEQ ID No. 7) o shsc (SEQ ID No.8). (B, E) Expresión de CD4 y de IL-7R analizada por citometría de flujo en células de un tumor representativo derivado de

la línea HPB-ALL (B) o CUTLL1 (E) mostradas en (A, D). Los histogramas de la derecha muestran la expresión de IL-7R $\alpha$  en las células GFP<sup>+</sup> vs las células GFP<sup>-</sup>. Los histogramas sombreados representan la tinción con un anticuerpo isotípico irrelevante. Los números indican el porcentaje de células positivas. (C, F) Números relativos (% de células GFP<sup>+</sup>) de células transducidas con sh5 (SEQ ID No. 7) o shsc (SEQ ID No. 8) en los tumores desarrollados *in vivo* a partir de células HPB-ALL (C) o CUTLL1 (F). Las barras representan la media  $\pm$  SEM del análisis de 5 ratones de cada grupo inyectados con HPB-ALL y 2 ratones de cada grupo inyectados con CUTLL1. Se indica la significación estadística de los resultados. La gráfica inferior en (C) representa la intensidad media de fluorescencia  $\pm$  SEM de la expresión del IL-7R en los tumores HPB-ALL generados *in vivo* (n=5).

**Figura 8. El silenciamiento de la expresión constitutiva del IL-7R por shRNA es funcional *in vivo* en líneas celulares LLA-B y bloquea la expansión tumoral.**

(A) Eficiencia de transducción (% de células GFP<sup>+</sup>) y expresión en membrana de IL-7R $\alpha$  analizadas por citometría de flujo en células de la línea leucémica LLA-B NALM-6 trasplantadas en ratones inmunodeficientes tras su infección con vectores portadores de sh5 (SEQ ID No. 7) o de shsc control (SEQ ID No. 8). (B) Tasa de crecimiento tumoral *in vivo* de las células NALM-6 mostradas en (A). (C) Caracterización fenotípica mediante citometría de flujo de un tumor representativo de cada grupo utilizando anticuerpos anti-CD19 y anti-IL-7R $\alpha$ . El histograma de la izquierda muestra la expresión del IL-7R en las células GFP<sup>+</sup> y las células GFP<sup>-</sup>. Los histogramas sombreados representan la tinción con un anticuerpo isotípico irrelevante. Se indica el porcentaje de células positivas. (D) Cuantificación del porcentaje de células transducidas (% de células GFP<sup>+</sup>) (arriba) y de la intensidad media de fluorescencia (abajo) de la expresión en membrana del IL-7R determinada por citometría de flujo. Las barras representan la media  $\pm$  SEM del análisis de 3 ratones de cada grupo. Se indica la significación estadística de los resultados.

**Figura 9. La inhibición de la expresión constitutiva del IL-7R por shRNA en leucemias primarias LLA-T humanas es una eficiente estrategia para impedir el injerto y la progresión tumoral *in vivo*.**

(A) Modelo experimental preclínico utilizado como prueba de concepto de la eficiencia terapéutica de agentes inhibidores del IL-7R para el tratamiento de la LLA humana. Se utilizaron dos leucemias LLA-T (T-ALL5 y T-ALL8) que se trasplantaron en ratones NSG como método de expansión. La estrategia de inhibición utilizada fue el silenciamiento del gen *IL-7R* mediante infección con vectores lentivirales portadores de un ARN de interferencia frente a IL-7R $\alpha$  (sh5, SEQ ID No. 7). Las transducciones se realizaron en las células leucémicas expandidas *in vivo* tras el xenotrasplante, mediante su co-cultivo *in vitro* sobre la línea estromal OP9-DL4 e IL-7 en presencia del vector lentiviral. La transducción con el shRNA control (shsc, SEQ ID No. 8) se utilizó como referencia de la progresión tumoral *in vivo*, analizada tras el xenotrasplante de las células control transducidas en ratones NSG. Se muestra la cuantificación por citometría de flujo del número de células de las leucemias T-ALL5 y T-ALL8 infectadas con los vectores lentivirales portadores de los shRNA (caracterizadas por la expresión de GFP) en el momento del xenotrasplante, así como de las células leucémicas silenciadas o control identificadas en los órganos indicados 8 semanas postrasplante. n>7, \*\*p<0,01.

**Figura 10. El bloqueo de la unión de IL-7 al IL-7R con un anticuerpo monoclonal anti-IL-7R $\alpha$  inhibe la activación dependiente de IL-7 de las vías MAPK/ERK, PI3K/AKT y JAK/STAT5 y reprime la expansión de leucemias LLA-T primarias humanas.**

(A) Expresión de IL-7R $\alpha$  en progenitores primarios de linfocitos T humanos aislados de timo postnatal (timocitos DN2). (B) Activación de las vías MAPK/ERK y PI3K/AKT en timocitos humanos DN2 en respuesta a IL-7 analizada por *Western Blot*. (C) Proliferación relativa de timocitos DN2 tratados con un anticuerpo (Ac) bloqueante frente a IL-7R $\alpha$  o con un anticuerpo anti-isotípico control en co-cultivos con estroma OP9-DL4 e IL-7. (D) Análisis mediante *Western Blot* de la activación de STAT5 tras la estimulación con IL-7 en la línea leucémica HPB-ALL pre-tratada con el Ac anti-IL-7R $\alpha$  o con un Ac control. (E) Proliferación relativa y (F) ciclo celular, analizado por citometría de flujo, de células de la línea HPB-ALL cultivadas *in vitro* en ausencia de IL-7 y en presencia del Ac anti-IL-7R $\alpha$  o de un Ac control. (G) Inhibición de la proliferación celular *in vitro* de la leucemia primaria humana T-ALL5 por el Ac anti-IL-7R $\alpha$  en un co-cultivo con OP9-DL4 e IL-7.

**Descripción Detallada de la Invención**

individuos con alto riesgo de desarrollar o padecer la enfermedad, como por ejemplo individuos que han sido tratados previamente de esta misma enfermedad, con este u otro tipo de tratamiento (p. ej. quimioterapia), y que habiéndose recuperado tienen una alta probabilidad de desarrollar recidivas.

5 En la presente invención, el término "tratamiento" se refiere a la función de eliminar las células leucémicas y la enfermedad en pacientes con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda humana, preferentemente LLA-T o LLA-B, y/o linfomas T o B.

En la presente invención, el término "leucemia linfoblástica aguda (LLA)" se refiere a un cáncer hematológico caracterizado por la transformación oncogénica de los progenitores linfoides durante su desarrollo.

10 En la presente invención, el término "leucemia T linfoblástica aguda (LLA-T)" o "leucemia linfoblástica aguda de tipo células T" se refiere a un cáncer hematológico caracterizado por la por la transformación oncogénica de los progenitores de los linfocitos T durante su desarrollo.

En la presente invención, el término "leucemia B linfoblástica aguda (LLA-B)" o "leucemia linfoblástica aguda de células B" se refiere a un cáncer hematológico caracterizado por la por la transformación oncogénica de los progenitores de los linfocitos B durante su desarrollo.

15 En la presente invención, el término "agente inhibidor de la función de la cadena  $\alpha$  del receptor de la interleuquina 7" se refiere a al menos un anticuerpo y/o un fragmento del mismo, capaz de reconocer específicamente y/o selectivamente la proteína IL-7R $\alpha$  y bloquear la unión de su ligando, o a vectores de silenciamiento génico, que comprenden al menos una secuencia oligonucleotídica complementaria al gen *IL7R*, preferentemente, del gen *IL7R* humano con SEQ ID No. 1. SEQ ID No. 1 es la secuencia de cDNA correspondiente a la secuencia codificante del ARN mensajero de la cadena alfa del receptor de la interleuquina 7 humana (*IL7R*) de *Homo sapiens* (Base de datos del NCBI; Número de acceso: NM\_002185.2).

20

En la presente invención, el término "receptor de interleuquina 7 (IL-7R)" se refiere al heterodímero constituido por la cadena IL-7R $\alpha$  y la cadena  $\gamma$ c, común a otros receptores de citoquinas. En particular, la "cadena  $\alpha$  del receptor de interleuquina 7 (IL-7R $\alpha$ )" se refiere a una de las dos subunidades que forma parte de los receptores IL-7R y TSLP-R y está codificada por el gen *IL7R* humano, preferentemente por el gen *IL7R* con secuencia SEQ ID No. 1. En este caso, la secuencia de aminoácidos de la cadena  $\alpha$  del IL-7R corresponde a la secuencia traducida de la región codificante 90-1469 de SEQ ID No. 1 y consiste en SEQ ID No. 2.

25

Como agentes bloqueantes de la función de IL-7R $\alpha$ , la presente invención hace referencia a aquellos agentes conocidos por un experto en la materia. A continuación se citan los siguientes ejemplos de manera no limitante:

30 a) anticuerpos anti-IL7R $\alpha$ , preferentemente anticuerpos monoclonales, capaces de unirse/ reconocer/reaccionar específicamente y/o selectivamente a/con el sitio de unión de ligando en la proteína IL-7R $\alpha$  humana (Pandrau-García *et al.*, 1994) codificada por el gen *IL7R* con SEQ ID No. 1 y producir la inhibición de la señalización mediada por el receptor IL-7R y/o TSLP-R (Levin *et al.*, 1999);

35 b) fragmentos de anticuerpos anti-ILR $\alpha$  responsables de la unión al receptor IL-7R $\alpha$  humano, y por tanto de inducir efectos iguales o similares a los de los anticuerpos definidos anteriormente;

En la presente invención, el término "gen *IL7R*" se refiere preferentemente al gen humano con SEQ ID No. 1 que codifica para la proteína IL-7R $\alpha$  SEQ ID No. 2.

En la presente invención, el término "anticuerpo anti-IL7R $\alpha$ " se refiere de forma no limitante a moléculas de inmunoglobulinas que contienen un sitio de fijación de antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona) con el receptor proteico humano IL-7R $\alpha$  codificado por el gen *IL7R* con SEQ ID No. 1, y un fragmento Fc capaz de fijar complemento. Preferentemente, dicho anticuerpo inhibe la unión de la IL-7 con la proteína IL-7R $\alpha$  humana, y neutraliza así la función biológica de la proteína, como por ejemplo, y sin carácter limitante, el anticuerpo anti-IL-7R $\alpha$  R34-34. No se excluyen del término las porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas. Ejemplos de porciones de moléculas de inmunoglobulinas inmunológicamente activas incluyen los fragmentos F(ab) y F(ab')<sub>2</sub>, los cuales pueden ser generados tratando el anticuerpo con una enzima tal como la pepsina, que contienen un sitio de fijación de antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona) con la molécula de la invención a la que reconocen, pero carecen del fragmento Fc y no son capaces de fijar complemento. Preferentemente, también se incluyen péptidos específicos bloqueantes. Los anticuerpos pueden ser policlonales (incluyen típicamente anticuerpos distintos dirigidos contra determinantes o epítopos distintos) o monoclonales (dirigidos contra un único determinante en el antígeno). El anticuerpo monoclonal puede ser alterado bioquímicamente o mediante manipulación genética, o puede ser sintético, careciendo, posiblemente, el anticuerpo en su totalidad o en partes, de porciones que no son necesarias para el

40

45

50

reconocimiento del receptor proteico IL7R $\alpha$  y estando sustituidas por otras que comunican al anticuerpo propiedades ventajosas adicionales. El anticuerpo puede ser también recombinante, quimérico, humanizado, sintético o una combinación de cualquiera de los anteriores.

5 Un "anticuerpo o polipéptido recombinante" (rAC) es un anticuerpo que ha sido producido en una célula hospedadora transformada o transfectada con el ácido nucleico codificante del anticuerpo frente a la molécula IL-7R $\alpha$ , o que produce el anticuerpo contra la molécula IL-7R $\alpha$  como resultado de la recombinación homóloga.

Un "anticuerpo quimérico" es aquella molécula inmunoglobulina que mediante técnicas de ingeniería genética ha sido modificada para que su parte variable o Fab mantenga las características originales y su parte constante o Fc sea reconocido por las células humanas.

10 El término "anticuerpo humanizado", tal como se entiende en la presente invención se refiere a una inmunoglobulina que conserva una región determinante de complementariedad (CDR) procedente de la inmunoglobulina monoclonal original (por ejemplo, inmunoglobulina donadora) y regiones de marco conservado variables sustancialmente de una inmunoglobulina aceptora humana. La frase "sustancialmente de una inmunoglobulina aceptora humana" significa que la mayoría o los restos de marco conservado clave proceden de  
15 la secuencia aceptora humana, permitiendo sin embargo la sustitución de restos en ciertas posiciones por restos seleccionados para mejorar la actividad de la inmunoglobulina humanizada (por ejemplo, alterar la actividad de tal forma que imite más la actividad de la inmunoglobulina donadora) o seleccionados para reducir la inmunogenicidad de la inmunoglobulina humanizada.

20 Se entiende por el término "anticuerpo sintético", como se usa en la presente memoria, un anticuerpo que se genera usando la tecnología de ADN recombinante tal como, por ejemplo, un anticuerpo expresado por un bacteriófago. Debería considerarse también que el término significa un anticuerpo que se ha generado mediante la síntesis de una molécula de ADN que codifica el anticuerpo y que dicha molécula de ADN expresa una proteína de anticuerpo, o una secuencia aminoacídica específica del anticuerpo, en el que la secuencia de ADN o aminoacídica se ha obtenido usando la tecnología de secuenciación de ADN o aminoácidos sintéticos que está  
25 disponible y es bien conocida en la materia.

En una realización preferida, el agente bloqueante de la función de IL-7R $\alpha$  según se definió anteriormente se selecciona del grupo que consiste en: un anticuerpo anti-IL7R $\alpha$  capaz de unirse/reconocer/reaccionar específicamente y/o selectivamente a/con la proteína IL-7R $\alpha$  codificada por el gen *IL7R* con SEQ ID No. 1 e inhibir la unión de ligando y neutralizar la función biológica de la proteína IL-7R $\alpha$  humana, un fragmento de dicho  
30 anticuerpo responsable de la unión a IL-7R $\alpha$  del anticuerpo y cualquier combinación de los mismos.

En una realización preferida de la anterior, el anticuerpo anti-IL7R $\alpha$  es un anticuerpo monoclonal y más preferentemente es un anticuerpo monoclonal humanizado, capaz de unir complemento humano y/o tener actividad celular citotóxica dependiente de anticuerpo (ADCC), donde dichos anticuerpos están dirigidos frente a la cadena IL-7R $\alpha$ . Según la invención, y sin que sirva de limitación, ejemplos de anticuerpos monoclonales bloqueantes anti-IL7R $\alpha$  humano son los descritos en Pandrau-García *et al.*, 1994.  
35

Un segundo aspecto de la invención hace referencia a una composición farmacéutica y/o medicamento que comprende al menos una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente bloqueante de la función de IL-7R $\alpha$  según cualquiera de los definidos anteriormente. La composición farmacéutica y/o medicamento anterior resulta de utilidad para su uso en el tratamiento y/o prevención de la leucemia linfoblástica aguda humana, tanto de células T como de células B, y puede comprender además del agente bloqueante o principio activo, al menos un vehículo, y/o un excipiente y/o un aditivo farmacéuticamente aceptable.  
40

De acuerdo con la presente invención, la administración de las composiciones farmacéuticas de la invención se llevará a cabo con una "dosis terapéuticamente eficaz", siendo suficiente para que demuestre un beneficio para el paciente, por lo general preferentemente relacionado con una disminución del número de células iniciadoras de la leucemia (LIC) LLA-T y/o LLA-B, o de la capacidad replicativa de las mismas en el paciente. Tal beneficio puede suponer la mejora de al menos un síntoma relacionado con la leucemia linfoblástica aguda. La prescripción del tratamiento, es decir, las decisiones sobre las dosis, periodicidad, duración, etc., recaerá bajo la responsabilidad del médico general o del especialista que atienda al paciente infectado.  
45

En el ámbito de la presente invención, el término "dosis terapéuticamente eficaz" o "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad (o cantidad por unidad de masa del individuo al que se le administra) de un fármaco o agente bloqueante que ocasiona un efecto terapéutico detectable en un individuo o un grupo de individuos a los que les es administrada, ocasionando mínimos efectos secundarios o tóxicos. La cantidad terapéuticamente eficaz útil para producir un efecto terapéutico en cualquier paciente dado se puede determinar mediante técnicas convencionales bien conocidas por los especialistas en la técnica. El término "dosis terapéuticamente eficaz-50" o "dosis terapéuticamente eficaz-95" incluye un valor estadístico en el que el efecto  
50  
55

terapéutico debe ser detectable en el 50% o el 95% de los individuos a los que les es administrada. En lo relativo a los efectos tóxicos del fármaco o compuesto, es preferible que la dosis terapéutica eficaz no ocasione ninguno. Sin embargo, aunque en ocasiones puedan darse efectos tóxicos, puede llegarse a un compromiso en el que se considera que éstos son preferibles al desarrollo normal de la enfermedad o dolencia sin la administración del fármaco o compuesto, y pueden a su vez ser tratados mediante terapias adicionales.

Las composiciones farmacéuticas, de acuerdo con la presente invención, pueden comprender, además del ingrediente activo, uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, entendiéndose por "vehículo" cualquier diluyente, adyuvante o excipiente conocido por el especialista que se administra con el principio activo. Tales materiales deben no ser tóxicos y, además, no interferir con la eficacia del ingrediente activo (el agente bloqueante de la función de la cadena  $\alpha$  del IL-7R, en el caso de la presente invención). La naturaleza precisa del vehículo dependerá de la vía de administración, que puede ser oral, o mediante inyección, por ejemplo, cutánea, subcutánea o intravenosa.

Debido a que las células diana para prevenir o tratar una leucemia linfoblástica aguda se encuentran en sangre periférica, pueden estar indicando, por definición, una necesidad de acceso a la sangre para su tratamiento. En el caso de utilizar tratamientos basados en anticuerpos anti-IL-7R $\alpha$ , la vía de administración de dichos anticuerpos es preferiblemente parenteral. Como se usa en este documento, el término "parenteral" incluye la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, rectal, vaginal o intraperitoneal. De todas estas, la más preferida es la administración intravenosa. Para la inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, o bien inyección en el lugar de la dolencia, el principio activo estará en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable, que sea apirógena y que tenga un pH apropiado, estabilidad y tonicidad. Aquellos que sean expertos en la técnica podrán preparar soluciones apropiadas utilizando, por ejemplo, vehículos isotónicos tal como una inyección salina.

Los anticuerpos anti-IL-7R $\alpha$  se proporcionarán típicamente mediante la técnica convencional en un tampón farmacéuticamente aceptable, por ejemplo solución salina estéril, agua tamponada estéril, combinaciones de las anteriores, etc., y pueden contener dextrosa u otra solución de sacárido o de glicol tal como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol. Vehículos farmacéuticos adecuados y métodos para preparar agentes administrables por vía parenteral se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin, 1995. Preferiblemente, los vehículos de la invención están aprobados por la agencia reguladora de un gobierno de estado o un gobierno federal, o están enumerados en la Farmacopea Estadounidense, en la Farmacopea Europea u otra farmacopea reconocida en general para su uso en animales, y más particularmente en humanos.

Un tercer aspecto de la invención se refiere a un método de prevención y/o tratamiento de una leucemia linfoblástica aguda humana que comprende la administración a un individuo en necesidad de una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente bloqueante, y/o de una composición farmacéutica y/o medicamento como cualquiera de los definidos anteriormente.

En la presente invención, el término "individuo en necesidad" se refiere a un individuo afectado de leucemia linfoblástica aguda humana, preferentemente LLA-T o LLA-B, o con alto riesgo de desarrollar o padecer la enfermedad, como por ejemplo individuos que han sido tratados previamente de esta misma enfermedad, con este u otro tipo de tratamiento (p. ej. quimioterapia), y que habiéndose recuperado tienen una alta probabilidad de desarrollar recidivas.

Un cuarto aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de xenotrasplante sucesivo en ratón para la identificación, supervivencia, injerto y expansión de una célula iniciadora de la leucemia (LIC), que comprende inyectar *in vivo*, preferentemente por vía intravenosa, una suspensión de células leucémicas procedentes de un individuo con leucemia linfoblástica aguda (preferentemente de individuos con LLA-T y/o LLA-B), en un modelo de ratón inmunodeficiente, donde dicha LIC tiene ventaja de crecimiento y expresa el receptor IL7R $\alpha$ , y criar al ratón trasplantado. El trasplante sucesivo consiste en inyectar *in vivo*, preferentemente por vía intravenosa, en el ratón inmunodeficiente, las células leucémicas humanas expandidas en un primer ratón inmunodeficiente (preferentemente, pero no exclusivamente, en la sangre periférica, la médula ósea, el bazo, el timo, o el hígado), en sucesivos ratones, lo que permite seleccionar las células con mayor potencial de crecimiento *in vivo* y capaces de auto-renovarse y reproducir la leucemia, propiedades características de las LICs, como por ejemplo y sin carácter limitante el procedimiento descrito para la identificación de las LICs de la leucemia mielóide aguda (AML), un tipo de leucemia con un origen y tratamiento distinto de la LLA.

Por tanto, el procedimiento anterior comprende de manera general las siguientes etapas:

- inyectar preferentemente por vía intravenosa una suspensión de células ( $0.5-1 \times 10^6$  células) de pacientes diagnosticados de leucemia linfoblástica aguda de células T o de células B en un ratón inmunodeficiente, irradiado subletalmente con 1.5 Gys;

- criar al ratón durante 6-8 semanas en racks ventilados para producir la expansión de las células inyectadas en la etapa anterior;
- extraer del ratón previamente inyectado en la etapa anterior las células de leucemia expandidas preferentemente, pero no exclusivamente, en la sangre periférica, la médula ósea, el bazo, el timo, o el hígado, y caracterizadas por citometría de flujo como células leucémicas humanas por la expresión de marcadores de células humanas como por ejemplo , pero no exclusivamente, CD45;
- seleccionar y expandir las células con mayor potencial de auto-renovación, de crecimiento y de injerto *in vivo*, que son las LICs capaces de reproducir la leucemia, mediante inyección de las células de leucemia extraídas en la etapa anterior en un segundo ratón inmunodeficiente irradiado subletalmente con 1.5 Gys, y la cría de dicho ratón para producir la expansión de dichas células durante 6-8 semanas.

Adicionalmente, se pueden seleccionar LICs con mayor potencial de crecimiento y auto-renovación mediante etapas adicionales de inyección y expansión celular en sucesivos ratones a partir de las células expandidas en el segundo ratón o de las células expandidas en un ratón sucesivo anterior. De este modo, tanto en el segundo ratón como en el ratón sucesivo inyectado o trasplantado se produce el injerto de la célula iniciadora de la leucemia (LIC), permitiendo el mantenimiento, la supervivencia y/o la expansión de dicha LIC.

Según la invención, el injerto *in vivo* de la célula leucémica se refiere a la expansión de las células leucémicas humanas en los animales trasplantados, preferentemente en la médula ósea, el bazo, el timo, o el hígado.

En el procedimiento anterior, las células de leucemia hacen referencia a células linfoides procedentes preferentemente de la médula ósea o de la sangre periférica, de un individuo o paciente diagnosticado de leucemia linfoblástica aguda, incluyendo LLA-T y/o LLA-B, que pueden expresar o no niveles detectables por citometría de flujo del receptor IL7R $\alpha$ . Las células linfoides anteriores tras su trasplante en el ratón aumentan la expresión del receptor IL7R $\alpha$ , lo que indica una ventaja de crecimiento de las células con mayores niveles de expresión de IL7R $\alpha$ . En el ámbito de la presente invención, el término "célula linfoide" se refiere a una célula humana con marcadores de linfocitos T o de linfocitos B, como por ejemplo, pero no exclusivamente, CD7 o CD19, respectivamente.

En la presente invención, el término "ratón inmunodeficiente" se refiere a un ratón mutante que combina las características del fondo genético NOD/ShiLtJ, la mutación de inmunodeficiencia severa combinada (*scid*) y la deficiencia de la cadena gamma del receptor de IL-2, común a otras citoquinas, como por ejemplo el ratón mutante NOD/SCID/ $\gamma c^{null}$  (NSG) obtenido comercialmente (The Jackson Laboratory, Stock number 005557). Como resultado de estas mutaciones, los ratones NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ carecen de células maduras T, B o NK y son deficientes en señalización por citoquinas, lo que determina un mejor injerto de células madre hematopoyéticas humanas o células hematopoyéticas de sangre periférica humana, que la obtenida con otras cepas de ratón. Recientes estudios indican que el modelo NSG tiene una extraordinaria utilidad para los estudios de trasplante de células madre tumorales.

En la presente invención, el término "leucemia primaria humana" se refiere a la LLA-T o LLA-B obtenida de un paciente tras el diagnóstico y previamente a su tratamiento.

Un quinto aspecto de la invención hace referencia al uso del procedimiento de xenotrasplante en ratón anteriormente definido para estudiar clínicamente la efectividad de un tratamiento contra una leucemia linfoblástica aguda, preferentemente en el estudio clínico de la efectividad de un tratamientos con un agente bloqueante de la función de la cadena  $\alpha$  del receptor de interleuquina 7 como los definidos anteriormente en la presente invención.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

### **Ejemplos de realización de la invención**

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

**EJEMPLO 1: Las líneas celulares establecidas *in vitro* a partir de leucemias linfoblásticas agudas humanas expresan receptores IL-7R funcionales que activan las vías de señalización JAK/STAT, PI3K/AKT y MAPK/ERK en respuesta a IL-7.**

Datos descritos previamente indican que diferentes líneas celulares establecidas *in vitro* a partir de leucemias linfoblásticas agudas T y B humanas expresan receptores para IL-7 (IL-7R), aunque son independientes de IL-7 para su crecimiento (Dibirdik *et al.*, 1991; De Waele *et al.*, 2001). Un ejemplo de esta característica se muestra en la **Figura 1** donde se resume el análisis de la expresión del IL-7R mediante marcaje con un anticuerpo monoclonal (mAb) comercial anti-proteína IL-7R $\alpha$  humana (BD Biosciences) y citometría de flujo en un panel de 7 líneas celulares LLA-T (KOPTK1, P121CHIKAWA, CUTLL1, SUPT1, DND41, HPB-ALL y JURKAT) y tres líneas LLA-B (REH, NALM-6 y HPB-NUL). Como se muestra en la **Figura 1A**, la expresión del IL-7R es característica de la mayoría de las LLAs analizadas, aunque es heterogénea, observándose líneas con altos niveles de expresión, líneas con niveles de proteína bajos o indetectables, pero positivas para ARNm y líneas con niveles indetectables de proteína y ARNm (**Figura 1B**). Estudios moleculares por *Western Blot* centrados en las tres vías de señalización asociadas al IL-7R, JAK/STAT, PI3K/AKT y MAPK/ERK, demostraron la funcionalidad de los receptores expresados en las líneas leucémicas. En la **Figura 1C** se muestra que la activación del IL-7R en respuesta a IL-7 activa las tres vías en la línea LLA-T CUTLL1. Por tanto, las líneas celulares establecidas a partir de leucemias linfoblásticas agudas humanas constituyen un modelo adecuado para el estudio de la función del IL-7R.

**EJEMPLO 2: La expresión de IL-7R en leucemias linfoblásticas agudas primarias LLA-T y LLA-B humanas confiere una ventaja de expansión *in vivo* a las células leucémicas.**

Para analizar la posible contribución de la expresión del IL-7R a la fisiopatología de la leucemia LLA humana, primeramente se analizó la expresión del IL-7R en diversas muestras de leucemias primarias humanas obtenidas de la sangre y/o la médula ósea (MO) de pacientes diagnosticados de LLA-T o LLA-B. Tras el marcaje con el mAb anti-IL-7R $\alpha$  y análisis por citometría de flujo, se confirmó la expresión del IL-7R en las tres leucemias LLA-T (Figuras 2, 3) y en las cuatro leucemias LLA-B (Figura 4A) primarias analizadas, aunque se detectaron niveles variables de expresión.

Seguidamente se analizó la relevancia fisiopatológica *in vivo* de la expresión constitutiva del IL-7R en las leucemias LLA-T y LLA-B primarias. Para ello, se utilizó un sistema experimental de xenotrasplante de células leucémicas en ratones inmunodeficientes NOD/SCID/ $\gamma$ c<sup>null</sup> (NSG) (The Jackson Laboratory, Stock number 005557), que constituye un modelo similar al descrito para un tipo de leucemias de origen mielóide distinto de las LLA (DOI 1). Estos ratones combinan las características del fondo genético NOD/ShiLtJ, la mutación de inmunodeficiencia severa combinada (*scid*) y la deficiencia de la cadena gamma del receptor de IL-2, común a otras citoquinas. En las especificaciones técnicas de The Jackson Laboratory se indica que el resultado de estas mutaciones es un ratón NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ, que carece de células maduras T, B o NK y es deficiente en señalización por citoquinas, lo que determina un mejor injerto de células madre hematopoyéticas humanas o células hematopoyéticas maduras de sangre periférica humana, que la obtenida con otras cepas de ratón. El modelo NSG es asimismo idóneo para los estudios de trasplante de células madre tumorales. Se utilizó, por tanto, este modelo para analizar el potencial tumoral *in vivo* de las células leucémicas primarias procedentes de la médula ósea o sangre de los pacientes, y la contribución de las células que expresan IL-7R a la expansión tumoral (**Figura 3A**). Las células leucémicas (10<sup>6</sup>) se inyectaron por vía intravenosa (i.v.) en el seno orbital de ratones inmunodeficientes NSG de 6-8 semanas de edad, irradiados subletalmente con 1.5 Gy. En algunos experimentos se corroboraron los resultados en otros modelos de ratones inmunodeficientes como los Rag2-/- $\gamma$ c-/- . En el ejemplo de la **Figura 3B** se muestra que los ratones trasplantados con una leucemia LLA-T (T-ALL5) desarrollaron leucemia *in vivo* tras un periodo de 11 a 14 semanas post-trasplante, observándose un alto porcentaje (alrededor del 80%) de células leucémicas LLA-T derivadas del paciente en el bazo, la médula ósea y el timo de los ratones, y una menor proporción (14%) en la sangre. La leucemia mostró un fenotipo CD4+CD8+ similar al fenotipo de las células leucémicas del paciente, lo que indica que el modelo de xenotrasplante es muy eficiente para propagar y expandir células leucémicas LLA-T humanas (**Figura 3B**). El hallazgo más novedoso fue la observación de que las poblaciones leucémicas expandidas *in vivo* en todos los órganos analizados estaban enriquecidas en células positivas para la expresión del IL-7R, y con niveles de expresión incrementados en comparación con la población del paciente trasplantada en los ratones (**Figura 3B**).

La misma estrategia se utilizó para valorar la contribución del IL-7R a la expansión *in vivo* de leucemias LLA-B humanas primarias. Se utilizaron las cuatro LLA-B primarias mostradas en la **Figura 4A**. Los resultados obtenidos para una de ellas se muestran como ejemplo en la **Figura 4B**, donde se observa que, al igual que en las LLA-T, las células de la LLA-B primaria que injertan y se expanden eficientemente *in vivo* en los diferentes órganos de los animales trasplantados representan una población enriquecida en células que expresan elevados niveles del IL-7R en su superficie, significativamente superiores a los de las células aisladas del paciente (**Figura 4B**).

En conclusión, los datos indican que las células leucémicas de las LLA-T y LLA-B que se expanden con mayor eficiencia *in vivo* son aquellas que expresan mayores niveles del IL-7R, lo que revela una importante función del IL-7R en la progresión tumoral.

**EJEMPLO 3: Expresión constitutiva de altos niveles del IL-7R en LICs de leucemia linfoblástica aguda LLA-T humana.**

Los resultados mostrados en el **Ejemplo 2** sugieren que la expresión del IL-7R puede ser un marcador funcional de las LICs, o células iniciadoras de la leucemia, en las leucemias linfoblásticas agudas humanas. Las dos características de las LICs son su capacidad de auto-renovación y su potencial de injertar y reproducir la leucemia de forma permanente. Estas funciones son propias de aquellas células que mantienen su potencial leucémico *in vivo* tras sucesivos trasplantes. Para analizar si las células IL-7R+ de las LLAs poseen las funciones propias de las LICs, realizamos dos trasplantes sucesivos de estas leucemias en ratones NSG, según el procedimiento de xenotrasplante sucesivo en ratón descrito en la descripción detallada de la invención. En la **Figura 5** se muestran los resultados de los trasplantes realizados con tres leucemias LLA-T primarias obtenidas de la sangre de los pacientes (T-ALL5, T-ALL8 y T-ALL9), que se trasplantaron por vía intravenosa ( $0.5 \times 10^6$  células) en ratones NSG de 6-8 semanas de edad irradiados subletalmente con 1.5 Gy. A las 8-10 semanas post-trasplante, las células leucémicas se aislaron de las MO de los ratones y se trasplantaron de nuevo ( $0.5 \times 10^6$  células) en ratones NSG. Transcurridas 8-10 semanas del segundo trasplante, se analizaron las células leucémicas humanas en los diferentes órganos del ratón observándose que, en todas las leucemias analizadas, las células que se expanden *in vivo* en los animales tras los dos trasplantes sucesivos se enriquecen progresivamente en células positivas para el IL-7R con niveles incrementados de expresión en la membrana. Por tanto, las células IL-7R+ de la LLA-T son además LICs cuya ventaja de expansión tumoral se revela *in vivo* por xenotrasplantes sucesivos. Por analogía, y conforme a los datos de la **Figura 4**, las células IL-7R+ expandidas *in vivo* a partir de leucemias LLA-B deben incluir LICs y, conforme a la expresión del IL7R en linfomas (Daloul et al., 1992), se prevé la existencia de LICs con IL-7R funcionales para los linfomas T y B.

**EJEMPLO 4: Eficiente inhibición de la expresión del IL-7R *in vitro* en líneas celulares de leucemias LLA-T humanas mediante silenciamiento del gen *IL7R* que codifica para la cadena IL-7R $\alpha$  por transducción con vectores lentivirales portadores de shRNAs.**

La expresión constitutiva del IL-7R en las LICs de las LLAs humanas sugiere que estos receptores pueden ser relevantes dianas funcionales susceptibles de manipulación terapéutica. Para analizar de forma directa la contribución del IL-7R a la capacidad tumoral de las LLA-T, se eliminó la expresión del IL-7R en líneas celulares ALL siguiendo estrategias de silenciamiento de gen *IL7R* mediante transducción con vectores lentivirales que contienen horquillas o "short hairpins" de ARN (shRNA), capaces de inducir específicamente la degradación del ARNm del gen *IL7R* que codifica para la cadena IL-7R $\alpha$ , o de bloquear la traducción proteica. Se analizó independientemente el efecto de cinco shRNAs distintos (sh1-5) obtenidos comercialmente (SIGMA) con secuencias SEQ ID No. 3-7, y complementariedad en diferentes zonas del ARNm del *IL7R* (**Figura 6A**), sobre la expresión en la membrana de la proteína IL-7R $\alpha$ . Como control, se utilizaron las mismas células transducidas con un vector lentiviral portador de un shRNA irrelevante o "scrumble" (shsc) con secuencia SEQ ID No. 8.

Mediante citometría de flujo se observó que tres de los cinco shRNAs (sh2 o SEQ ID No. 4, sh4 o SEQ ID No. 6, y sh5 o SEQ ID No. 7) eran capaces de inducir el silenciamiento de IL-7R $\alpha$  a nivel proteico en más del 90% de las células CUTLL1 y SUPT1, mientras que sh1 con SEQ ID No. 3 y sh3 con SEQ ID No. 5, no fueron igualmente eficientes (**Figura 6B, C**). En la línea HPB-ALL, los shRNAs inhibidores sh2, sh4 y sh5, silenciaron la expresión de la proteína IL-7R $\alpha$  en una población minoritaria (**Figura 6C**), aunque el silenciamiento a nivel de ARNm fue más acusado (**Figura 6D**). A pesar de este efecto parcial, las células HPB-ALL silenciadas en las que pudo detectarse IL-7R en la membrana mostraron niveles de expresión significativamente menores que los controles (**Figura 6E**, izqda.), y estos niveles parecían ser insuficientes para inducir una respuesta óptima a la IL-7, a juzgar por la deficiente fosforilación de su efector STAT5 (**Figura 6E**, dcha.). Por tanto, es posible silenciar de forma estable la expresión del IL-7R y bloquear su función *in vitro* en líneas celulares leucémicas mediante la transducción de shRNAs.

**EJEMPLO 5: Eficiente silenciamiento *in vivo* de la expresión del IL-7R en líneas celulares de leucemias LLA-T y LLA-B: Inhibición de la expansión celular y la diseminación *in vivo*.**

Para analizar la eficiencia *in vivo* de la estrategia de silenciamiento diseñada, utilizamos una adaptación del sistema de xenotrasplante descrito en la descripción detallada de la invención, consistente en la inyección subcutánea de líneas celulares leucémicas humanas LLA-T y LLA-B ( $2 \times 10^6$  células) en el flanco derecho de ratones NSG. En este sistema se generan tumores subcutáneos que llegan a colonizar los órganos linfoides secundarios y finalmente establecen metástasis en diferentes órganos, entre ellos el sistema nervioso central, lo que recapitula los eventos que se suceden en los pacientes de LLA. Las líneas tumorales humanas LLA-T y LLA-B en estudio se infectaron con los vectores lentivirales portadores del shRNA frente al *IL7R* (sh5, SEQ ID No. 7) o del control shsc (SEQ ID No. 8), utilizando en ambos casos GFP como marcador. Tras la infección, las células se trasplantaron en ratones inmunodeficientes en los que se analizó el injerto y crecimiento de tumores sólidos subcutáneos a lo largo del tiempo.

En el caso de las LLA-T, se utilizaron dos líneas que expresan altos niveles del IL-7R: CUTLL1 y HPB-ALL (**Figura 1A**). Los porcentajes de transducción (% de células GFP+) de las líneas CUTLL1 o HPB-ALL trasplantadas fueron mayores del 50% y la transducción con sh5 resultó siempre en una disminución significativa de los niveles de expresión del IL-7R en la membrana (**Figura 7A, D**). En las **Figuras 7B y 7E** se muestra que

5 todos los ratones inyectados con células LLA-T con expresión constitutiva del IL-7R, transducidas con sh5 (SEQ ID No. 7) o con shsc (SEQ ID No. 8), desarrollaron tumores con cinéticas similares, que fueron palpables a partir de la tercera o cuarta semana post-trasplante. Sin embargo, la composición de los tumores en ambos casos fue distinta. Los tumores generados en ratones trasplantados con células HPB-ALL (**Figura 7B**) o CUTLL1 (**Figura 7E**) transducidas con sh5 (SEQ ID No. 7) estaban constituidos casi exclusivamente por células no transducidas, negativas para GFP (75-90%), que conservaban la expresión del IL-7R en la superficie celular. En efecto, las células GFP+ silenciadas con sh5 (SEQ ID No. 7) prácticamente desaparecieron *in vivo* en estos animales, lo que pone de manifiesto su reducido potencial tumoral. Es importante destacar que, aunque se detectó una pequeña población residual de células GFP+ transducidas con sh5 en los tumores generados *in vivo*, estas células expresaban niveles significativamente reducidos, aunque detectables, del IL-7R, con respecto a las células no transducidas o a los controles shsc (**Figura 7C, panel inferior**), lo que demuestra la eficiencia del silenciamiento *in vivo*. Por el contrario, los tumores derivados de las líneas transducidas con el shsc control (SEQ ID No. 8) mantenían una relación constante de células GFP+ y GFP- indicativa de un potencial oncogénico equivalente al de las células transducidas control y las no transducidas (**Figura 7B, C y 7E, F**).

15 La misma estrategia se utilizó para analizar el efecto del silenciamiento del IL-7R en células leucémicas LLA-B con expresión constitutiva del IL-7R, utilizando como modelo la línea NALM-6 (**Figura 1**), transducida con vectores portadores de sh5 (SEQ ID No. 7) o shsc control (SEQ ID No. 8) (**Figura 8**). Los resultados fueron idénticos a los obtenidos con las líneas LLA-T, ya que todos los animales desarrollaron tumores, pero la población transducida con sh5 contribuyó de forma muy minoritaria a la generación tumoral *in vivo*, en comparación con las células no transducidas o transducidas con el vector control portador de shsc. De nuevo, la población residual portadora de sh5 mostró niveles reducidos de expresión del IL-7R (**Figura 8C, D**). Por tanto, la estrategia de silenciamiento del IL-7R con shRNAs es eficiente *in vivo* y, más importante, demuestra la participación del IL-7R en la expansión leucémica *in vivo* de líneas celulares LLA-T y LLA-B capaces de proliferar *in vitro* de manera independiente de IL-7 y/o TSLP.

25 **EJEMPLO 6. La inhibición de la expresión constitutiva del IL-7R en leucemias primarias LLA-T humanas constituye una eficiente estrategia terapéutica para bloquear el injerto y la expansión tumoral de la LLA-T *in vivo*.**

Se desconoce cuál es la contribución del IL-7R que se expresa constitutivamente en las leucemias LLA primarias humanas al mantenimiento y expansión de la leucemia *in vivo*. Para aclarar este aspecto, se establecieron modelos preclínicos de xenotrasplante de leucemias LLA, en las que se silenció la expresión del IL-7R por transducción con shRNA. Se utilizaron células leucémicas procedentes de pacientes diagnosticados de LLA-T transducidas con el shIL-7R sh5 (SEQ ID No. 7) previamente a su trasplante en ratones inmunodeficientes NSG. Como control se usaron las mismas leucemias transducidas con shsc (SEQ ID No. 8). Por restricción en el número de células primarias disponibles, algunos experimentos se realizaron con células leucémicas de la sangre de los pacientes ( $10^6$ ) que se trasplantaron y expandieron *in vivo* durante 11-14 semanas por xenotrasplante en ratones inmunodeficientes. Las células expandidas en la MO de estos ratones se aislaron y se transdujeron con vectores lentivirales portadores de sh5 (SEQ ID No. 7) o shsc (SEQ ID No. 8) en co-cultivos con estroma OP9-DL4 suplementados con IL-7 y, posteriormente, se trasplantaron en nuevos ratones (**Figura 9A**). Se observó que las eficiencias de transducción lentiviral (y también retroviral, datos no mostrados) se incrementaba considerablemente al usar células humanas *ex vivo* recién extraídas de los pacientes o expandidas en los ratones, en comparación con las células criopreservadas de los pacientes (**Figura 9B, D**). Los datos obtenidos con dos leucemias independientes, T-ALL5 y T-ALL8, mostraron que el silenciamiento del IL-7R resultaba en un bloqueo dramático del injerto y de la expansión tumoral de las leucemias primarias *in vivo* en diferentes órganos del ratón (médula ósea, bazo, hígado, timo), en comparación con las leucemias transducidas con shsc control (**Figura 9C,E**). Por tanto, el silenciamiento del IL-7R en leucemias primarias T-ALL que expresan constitutivamente el IL-7R constituye una eficiente estrategia terapéutica para inhibir el injerto y la expansión leucémica *in vivo*. En consecuencia, la mera expresión del receptor IL-7R en la membrana de las células LLA-T y/o la unión de la IL-7 al IL-7R expresado en la LLA-T son cruciales para la expansión leucémica *in vivo*.

50 **EJEMPLO 7. La función del IL7R en leucemias linfoblásticas agudas humanas LLA-T y LLA-B puede ser bloqueada mediante el empleo de anticuerpos monoclonales anti-IL7R $\alpha$  en lo que lo convierte en una diana terapéutica.**

Los datos proporcionados en el **Ejemplo 6** sugieren la posibilidad de que la expresión del IL-7R en las células primarias de la LLA-T es funcionalmente relevante para la expansión leucémica *in vivo* debido a su capacidad de unión a la IL-7 producida *in vivo* en el modelo de xenotrasplante y de transmisión de las correspondientes señales de proliferación celular. Para analizar esta posibilidad se examinó la capacidad de proliferación de las leucemias LLA tras el bloqueo de la unión de IL-7 al IL-7R con un anticuerpo monoclonal obtenido comercialmente, dirigido frente a la cadena IL-7R $\alpha$  (Imgenex, clon R34-34). En primer lugar, corroboramos la capacidad bloqueante del anticuerpo en progenitores intratímicos de linfocitos T humanos (timocitos en el estadio DN2), que expresan altos niveles del IL-7R y son dependientes de IL-7 para su proliferación (**Figura 10A**). El tratamiento con el anticuerpo inhibió la señalización celular inducida por IL-7 (**Figura 10B**), así como la proliferación *in vitro* de los timocitos DN2 en co-cultivos con estroma OP9-DL4 e IL-7 (**Figura 10C**). Asimismo, el

anticuerpo resultó muy eficiente bloqueando la unión de IL-7 al IL-7R en la línea celular HPB-ALL en la que inhibió drásticamente la activación de la vía JAK/STAT5 en respuesta a la IL-7 (**Figura 10D**), aunque no afectó la viabilidad celular (**Figura 10E**) o la capacidad de proliferación (**Figura 10F**) de las células HPB-ALL *in vitro*, como era esperable, debido a su independencia de IL-7.

- 5 Una vez comprobada la función bloqueante del anticuerpo anti-IL-7R $\alpha$  R34-34, analizamos su efecto sobre la proliferación de células leucémicas primarias en respuesta a IL-7 en el sistema OP9-DL4. Utilizamos células de una LLA-T (T-ALL5) con niveles altos de expresión del IL-7R (**Figura 5**) y observamos que el Ac anti-IL-7R $\alpha$  inhibía significativamente la proliferación de estas células en respuesta a la IL-7 (**Figura 10G H**). Por tanto, la unión de la IL-7 a su receptor expresado constitutivamente en leucemias LLA primarias desempeña una relevante función en la expansión leucémica, que puede ser inhibida mediante el tratamiento con anticuerpos anti- IL-7R $\alpha$ , lo que indica que el receptor IL-7R $\alpha$  es una relevante diana de intervención terapéutica.
- 10

### Lista de secuencias de la invención

- 15 SEQ ID No. 1: Gen IL-7R. Secuencia codificante del ARN mensajero de la cadena alfa del receptor de la interleuquina 7 humana (IL7R). Tipo de secuencia: cDNA. Longitud de la secuencia: 1809 bases nucleotídicas. Origen de la secuencia: Homo sapiens. Base de datos del NCBI. (Número de acceso: NM\_002185.2). Región codificante: aminoácidos 90-1469.
- SEQ ID No. 2: Proteína IL-7R. Secuencia polipeptídica de la cadena alfa del receptor de la interleuquina 7 humana (IL7R). Tipo de secuencia: Proteína. Longitud de la secuencia: 459 aminoácidos. Origen de la secuencia: Homo sapiens. Base de datos del NCBI. (Número de acceso: NP\_002176.2).
- 20 SEQ ID No. 3: shRNA1 (sh1). Secuencia de nucleótidos del shRNA número 1 frente a la cadena alfa del IL-7R. Tipo de secuencia: RNA. Longitud de la secuencia: 58 bases nucleotídicas. Origen de la secuencia: Secuencia artificial (Sigma-Aldrich, TRCN0000058228). Secuencias complementarias al gen de IL-7Ra que conformaran la horquilla de RNA: aminoácidos 5-25 y aminoácidos 32-53. Región complementaria del gen IL-7Ra: aminoácidos 679-699 de la SEQ. ID. No 1.
- 25 SEQ ID No. 4: shRNA2 (sh2). Secuencia de nucleótidos del shRNA número 2 frente a la cadena alfa del IL-7R. Tipo de secuencia: RNA. Longitud de la secuencia: 58 bases nucleotídicas. Origen de la secuencia: Secuencia artificial (Sigma-Aldrich, TRCN0000058229). Secuencias complementarias al gen de IL-7Ra que conformaran la horquilla de RNA: aminoácidos 5-25 y aminoácidos 32-53. Región complementaria del gen IL-7Ra: aminoácidos 272-292 de la SEQ. ID. No 1.
- 30 SEQ ID No. 5: shRNA3 (sh3). Secuencia de nucleótidos del shRNA número 3 frente a la cadena alfa del IL-7R. Tipo de secuencia: RNA. Longitud de la secuencia: 58 bases nucleotídicas. Origen de la secuencia: Secuencia artificial (Sigma-Aldrich, TRCN0000058230). Secuencias complementarias al gen de IL-7Ra que conformaran la horquilla de RNA: aminoácidos 5-25 y aminoácidos 32-53. Región complementaria del gen IL-7Ra: aminoácidos 1369-1416 de la SEQ. ID. No 1.
- 35 SEQ ID No. 6: shRNA4 (sh4). Secuencia de nucleótidos del shRNA número 4 frente a la cadena alfa del IL-7R. Tipo de secuencia: RNA. Longitud de la secuencia: 58 bases nucleotídicas. Origen de la secuencia: Secuencia artificial (Sigma-Aldrich, TRCN0000058231). Secuencias complementarias al gen de IL-7Ra que conformaran la horquilla de RNA: aminoácidos 5-25 y aminoácidos 32-53. Región complementaria del gen IL-7Ra: aminoácidos 1174-1194 de la SEQ. ID. No 1.
- 40 SEQ ID No. 7: shRNA5 (sh5). Secuencia de nucleótidos del shRNA número 5 frente a la cadena alfa del IL-7R. Tipo de secuencia: RNA. Longitud de la secuencia: 58 bases nucleotídicas. Origen de la secuencia: Secuencia artificial (Sigma-Aldrich, TRCN0000058232). Secuencias complementarias al gen de IL-7Ra que conformaran la horquilla de RNA: aminoácidos 5-25 y aminoácidos 32-53. Región complementaria del gen IL-7Ra: aminoácidos 390-410 de la SEQ. ID. No 1.
- 45 SEQ ID No. 8: shRNA scumble (shsc). Secuencia de nucleótidos de un shRNA que no reconoce ningún gen humano ni de ratón. Tipo de secuencia: RNA. Longitud de la secuencia: 58 bases nucleotídicas. Origen de la secuencia: Secuencia artificial (Sigma-Aldrich, SHC002). Secuencias que conformaran la horquilla de RNA: aminoácidos 5-25 y aminoácidos 32-53.

**Bibliografía**

- Aifantis I, Raetz E, Buonamici S. Molecular pathogenesis of T-cell leukaemia and lymphoma. *Nat Rev Immunol*. 2008 May;8(5):380-90. doi: 10.1038/nri2304.
- 5 Bailey LC, Lange BJ, Rheingold SR, Bunin NJ. Bone-marrow relapse in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol*. 9: 873-883. 2008.
- Barata JT, Silva A, Brandao JG, Nadler LM, Cardoso AA, Boussiotis VA. Activation of PI3K is indispensable for interleukin 7-mediated viability, proliferation, glucose use, and growth of T cell acute lymphoblastic leukemia cells. *J Exp Med* 200:659-669. 2004.
- 10 Benjamin D, Sharma V, Knobloch TJ, Armitage RJ, Dayton MA, and Goodwin RG. Human B cell lines constitutively secrete IL-7 and express IL-7 receptors. *J Immunol*, 152: 4749–4757. 1994.
- Dalloul A, Laroche L, Bagot M, Mossalayi MD, Fourcade C, Thacker DJ et al. Interleukin-7 is a growth factor for Sezary lymphoma cells. *J Clin Invest*, 90:1054–1060. 1992.
- 15 De Waele M, Renmans W, Vander Gucht K, Jochmans K, Schots R, Otten J et al. Growth factor receptor profile of CD34+ cells in AML and B-lineage ALL and in their normal bone marrow counterparts. *Eur J Haematol*, 66: 178–187. 2001.
- Dibirdik I, Langlie MC, Ledbetter JA, Tuel-Ahlgren L, Obuz V, Waddick KG, Gajl-Peczalska K, Schieven GL, Uckun FM. Engagement of interleukin-7 receptor stimulates tyrosine phosphorylation, phosphoinositide turnover, and clonal proliferation of human T-lineage acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood* 78:564-570. 1991.
- 20 Frishman J, Long B, Knospe W, Gregory S and Plate J. Genes for interleukin 7 are transcribed in leukemic cell subsets of individuals with chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*, 177: 955–964. 1993.
- González-García S, García-Peydró M, Martín-Gayo E, Ballestar E, Esteller M, Bornstein R, de la Pompa JL, Ferrando AA, Toribio ML. CSL-MAML-dependent Notch1 signaling controls T lineage-specific IL-7R $\alpha$  gene expression in early human thymopoiesis and leukemia. *J Exp Med* 206:779-791. 2009.
- 25 Goodwin RG, Friend D, Ziegler SF, Jerzy R, Falk BA, et al. Cloning of the human and murine interleukin-7 receptors: demonstration of a soluble form and homology to a new receptor superfamily. *Cell* 60: 941-941. 1990.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646-674. 2011
- Hunger SP, Raetz EA, Loh ML and Mullighan ChG. Improving outcomes for high risk ALL: Translating new discoveries into clinical care. *Pediatr Blood Cancer* 56: 984-993. 2011.
- 30 Levin SD, Koelling RM, Friend SL, Isaksen DE, Ziegler SF, Perlmutter RM, Farr AG. Thymic stromal lymphopoietin: a cytokine that promotes the development of IgM+ B cells in vitro and signals via a novel mechanism. *J Immunol*, 162:677-683.1999.
- 35 Maude SL, Tasian SK, Vincent T, Hall JW, Sheen C, Roberts KG, Seif AE, Barrett DM, Chen IM, Collins JR, Mullighan CG, Hunger SP, Harvey RC, Willman CL, Fridman JS, Loh ML, Grupp SA, Teachey DT. Targeting JAK1/2 and mTOR in murine xenograft models of Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 120:3510-3518. 2012.
- Mullighan CG, Collins-Underwood JR, Phillips LA, Loudin MG, Liu W, Zhang J, Ma J, Coustan-Smith E, Harvey RC, Willman CL, Mikhail FM, Meyer J, Carroll AJ, Williams RT, Cheng J, Heerema NA, Basso G, Pession A, Pui CH, Raimondi SC, Hunger SP, Downing JR, Carroll WL, Rabin KR. Rearrangement of CRLF2 in B-progenitor- and Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. 41:1243-1246. 2009b.
- 40 Nishii, K, Katayama N, Miwa H, Shikami M, Masuya M, Shiku H et al. Survival of human leukaemic B-cell precursors is supported by stromal cells and cytokines: association with the expression of bcl-2 protein. *Br J Haematol*, 105: 701–710. 1999.
- Noguchi M, Nakamura Y, Russell SM, Ziegler SF, Tsang M, Cao X, Leonard WJ. Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-7 receptor. *Science* 262: 1877–1880.1993.

Pandrau-Garcia D, de Saint-Vis B, Saeland S, Renard N, Ho S, Moreau I, Banchereau J, and Galizzi J-P. Growth inhibitory and agonistic signals of Interleukin-7 (IL-7) can be mediated through the CDw127 IL-7 receptor. *Blood* 83: 3613-3619.1994.

5 Pui CH, Jeha S. New therapeutic strategies for the treatment of acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Drug Discov.* 6: 149-165. 2007

Pui CH, Robinson LL and Look TA. Acute Lymphoblastic leukemia. *The Lancet*: 371: 1030-1043. 2008.

10 Sasson SC, Smith S, Seddiki N, Zaunders JJ, Bryant A, Koelsch KK, Weatherall C, Munier ML, McGinley C, Yeung J, Mulligan SP, Moore J, Cooper DA, Milliken S, Kelleher AD. IL-7 receptor is expressed on adult pre-B-cell acute lymphoblastic leukemia and other B-cell derived neoplasms and correlates with expression of proliferation and survival markers. *Cytokine* 50:58-68. 2010.

Shochat C, Tal N, Bandapalli OR, Palmi C, Ganmore I, te Kronnie G, Cario G, Cazzaniga G, Kulozik AE, Stanulla M, Schrappe M, Biondi A, Basso G, Bercovich D, Muckenthaler MU, Izraeli S. Gain-of-function mutations in interleukin-7 receptor- $\alpha$  (IL7R) in childhood acute lymphoblastic leukemias. *J Exp Med.* 208:901-908. 2011.

15 Tasian SK, Doral MY, Borowitz MJ, Wood BL, Chen IM, Harvey RC, Gastier-Foster JM, Willman CL, Hunger SP, Mullighan CG, Loh ML. Aberrant STAT5 and PI3K/mTOR pathway signaling occurs in human *CRLF2*-rearranged B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 120: 833-842. 2012.

Touw I, Pouwels K, van Agthoven T, van Gorp R, Budel L, Hoogerbrugge H et al. Interleukin-7 is a growth factor of precursor B and T acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 75: 2097–2101. 1990.

20 Zenatti PP, Ribeiro D, Li W, Zuurbier L, Silva MC, Paganin M, Tritapoe J, Hixon JA, Silveira AB, Cardoso BA, Sarmiento LM, Correia N, Toribio ML, Kobarg J, Horstmann M, Pieters R, Brandalise SR, Ferrando AA, Meijerink JP, Durum SK, Yunes JA, Barata JT. Oncogenic IL7R gain-of-function mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet.* 43:932-939. 2011.

**REIVINDICACIONES**

1. Uso de un agente bloqueante de la función de la cadena  $\alpha$  del receptor de interleuquina 7 (IL-7R $\alpha$ ) humano codificada por el gen *IL7R* con SEQ ID No. 1, donde dicho agente es un anticuerpo anti-IL7R $\alpha$  capaz de reconocer específicamente y/o selectivamente la proteína IL-7R $\alpha$  humana codificada por el gen *IL7R* con SEQ ID No. 1, y/o un fragmento de dicho anticuerpo responsable de su unión a IL-7R $\alpha$ , para la preparación de una composición farmacéutica o medicamento útil para la prevención y/o el tratamiento de una leucemia linfoblástica aguda humana o de un linfoma humano.  
5
2. Uso del agente bloqueante según la reivindicación 1, donde el anticuerpo es monoclonal.
3. Uso del agente bloqueante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado.  
10
4. Una composición farmacéutica y/o medicamento caracterizada/o por comprender al menos una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-IL7R $\alpha$  capaz de reconocer específicamente y/o selectivamente la proteína IL-7R $\alpha$  humana codificada por el gen *IL7R* con SEQ ID No. 1, y/o un fragmento de dicho anticuerpo responsable de su unión a IL-7R $\alpha$ , para su uso en la prevención y/o el tratamiento de una leucemia linfoblástica aguda humana T y/o B o de un linfoma humano.  
15
5. La composición farmacéutica y/o medicamento según la reivindicación 4 caracterizada/o por que comprende además al menos un vehículo, y/o un excipiente, y/o un aditivo farmacéuticamente aceptable.
6. La composición farmacéutica y/o medicamento según la reivindicación 4 ó 5, caracterizada/o por que el anticuerpo es monoclonal.
7. La composición farmacéutica y/o medicamento según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, caracterizada/o por que dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado.  
20

FIGURA 1.

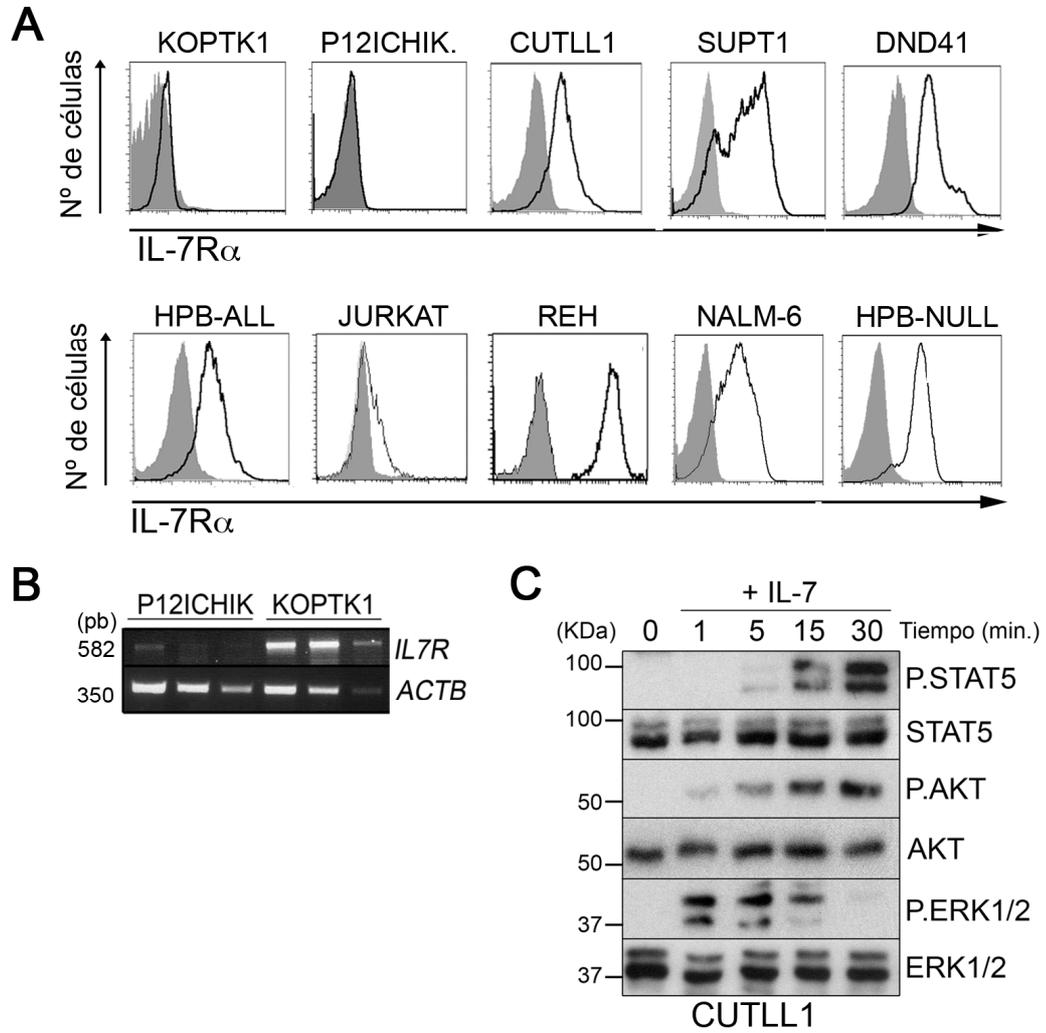


Figura 2.

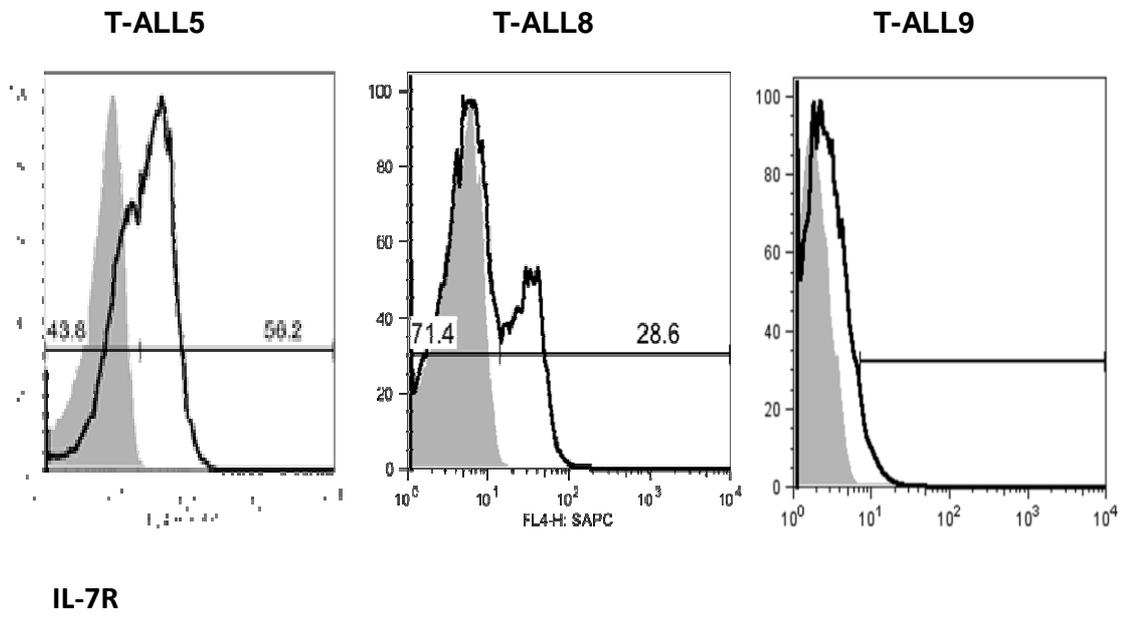
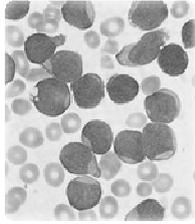


FIGURA 3.

A

Células de MO de paciente LLA-T

Inyección i.v.  
 $1 \times 10^6$  céls./ratón NSG (6-8 sem.)  
 1.5 Gy irradiación.



**11-14 semanas**  
 Desarrollo de leucemia  
 Análisis de timo, bazo, MO y sangre

B

T-ALL5

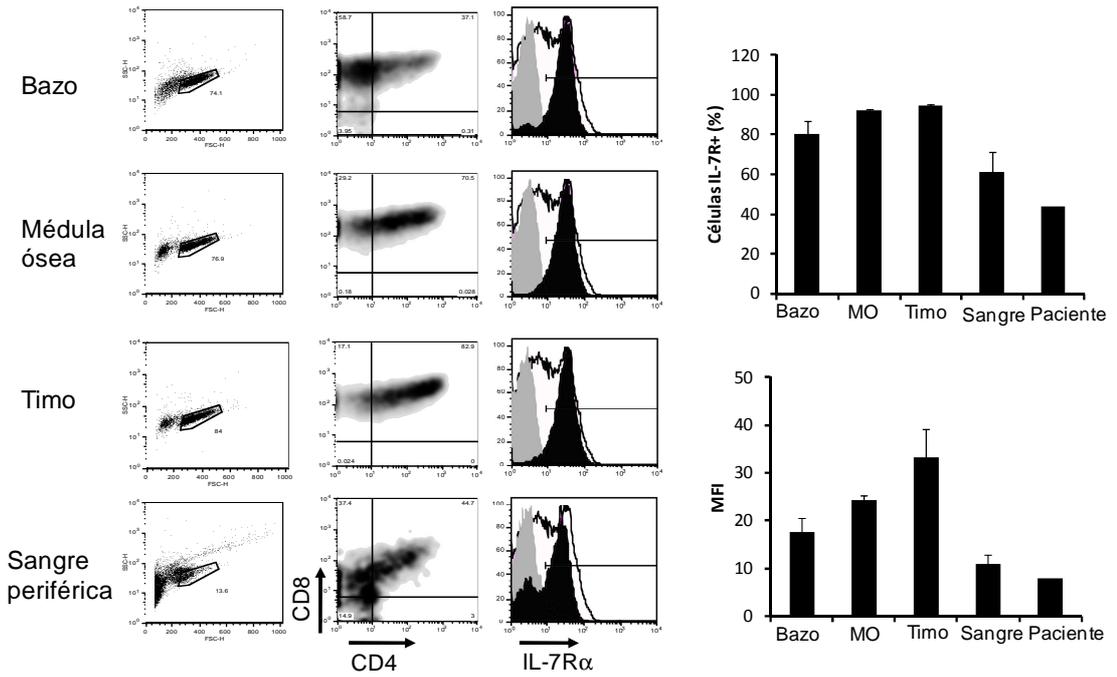


FIGURA 4.

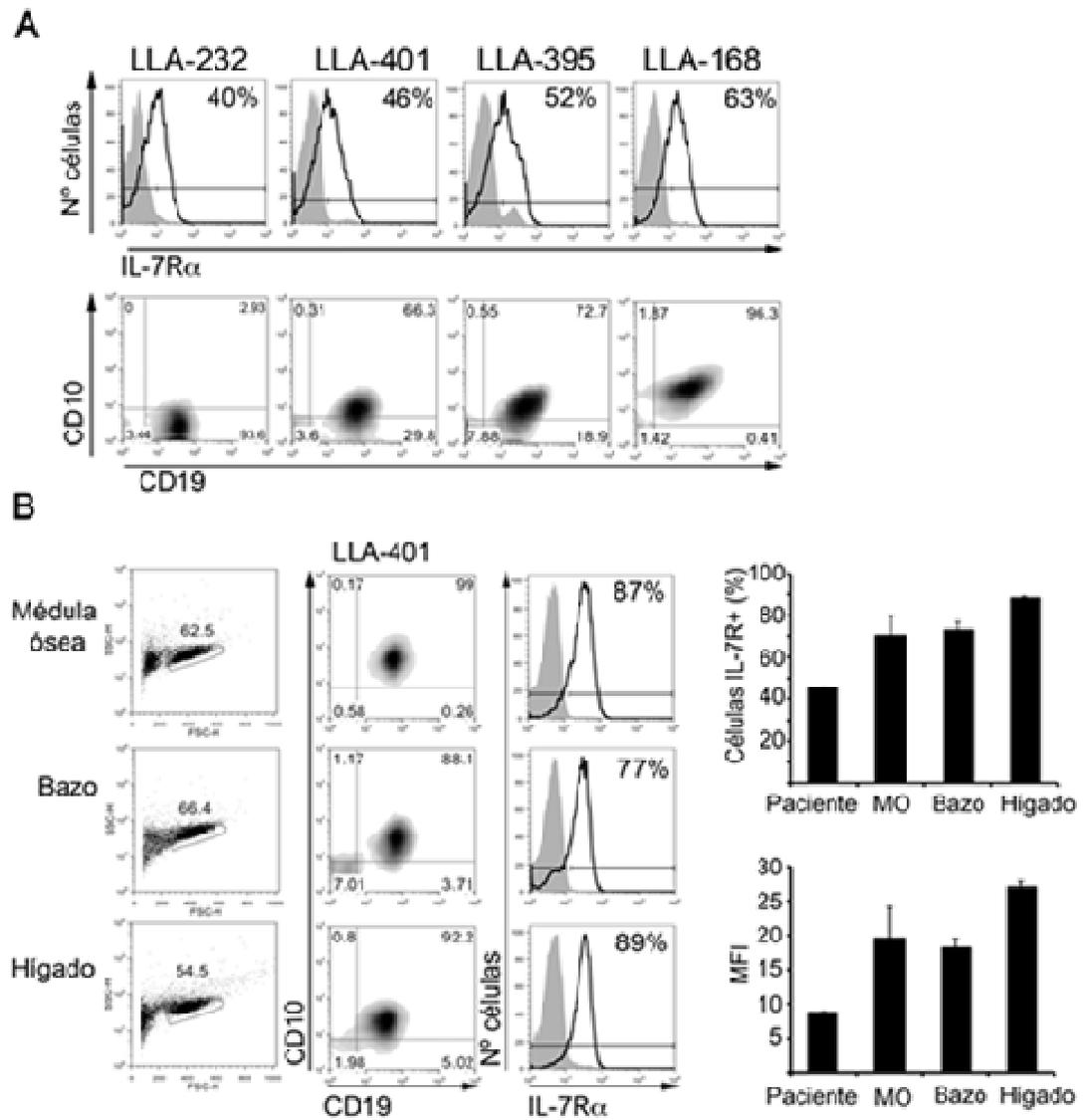
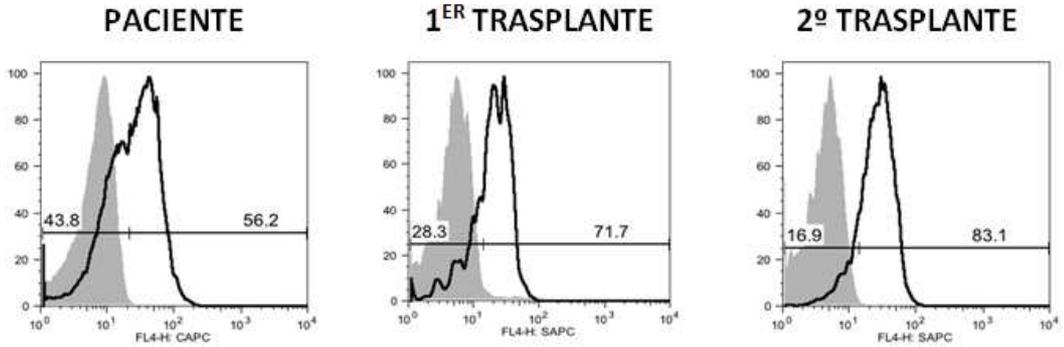
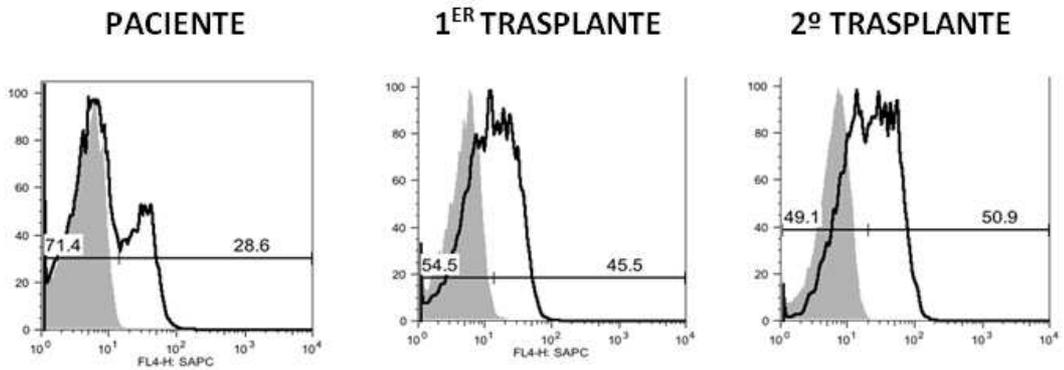


FIGURA 5.

**T-ALL5**



**T-ALL8**



**T-ALL9**

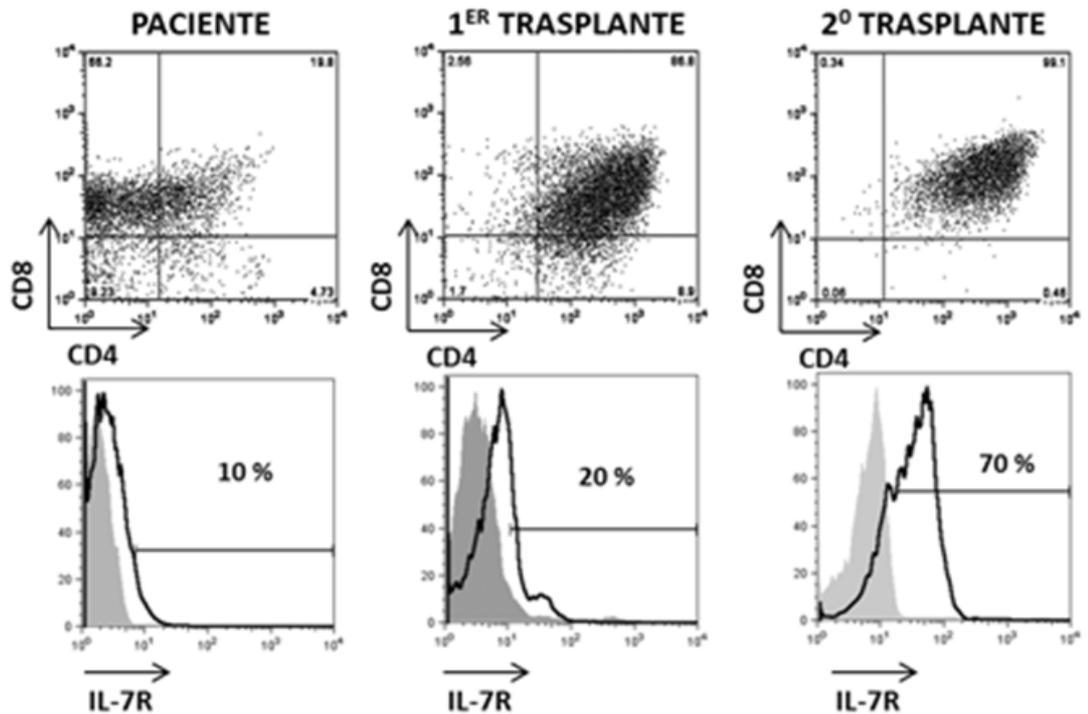


FIGURA 6.

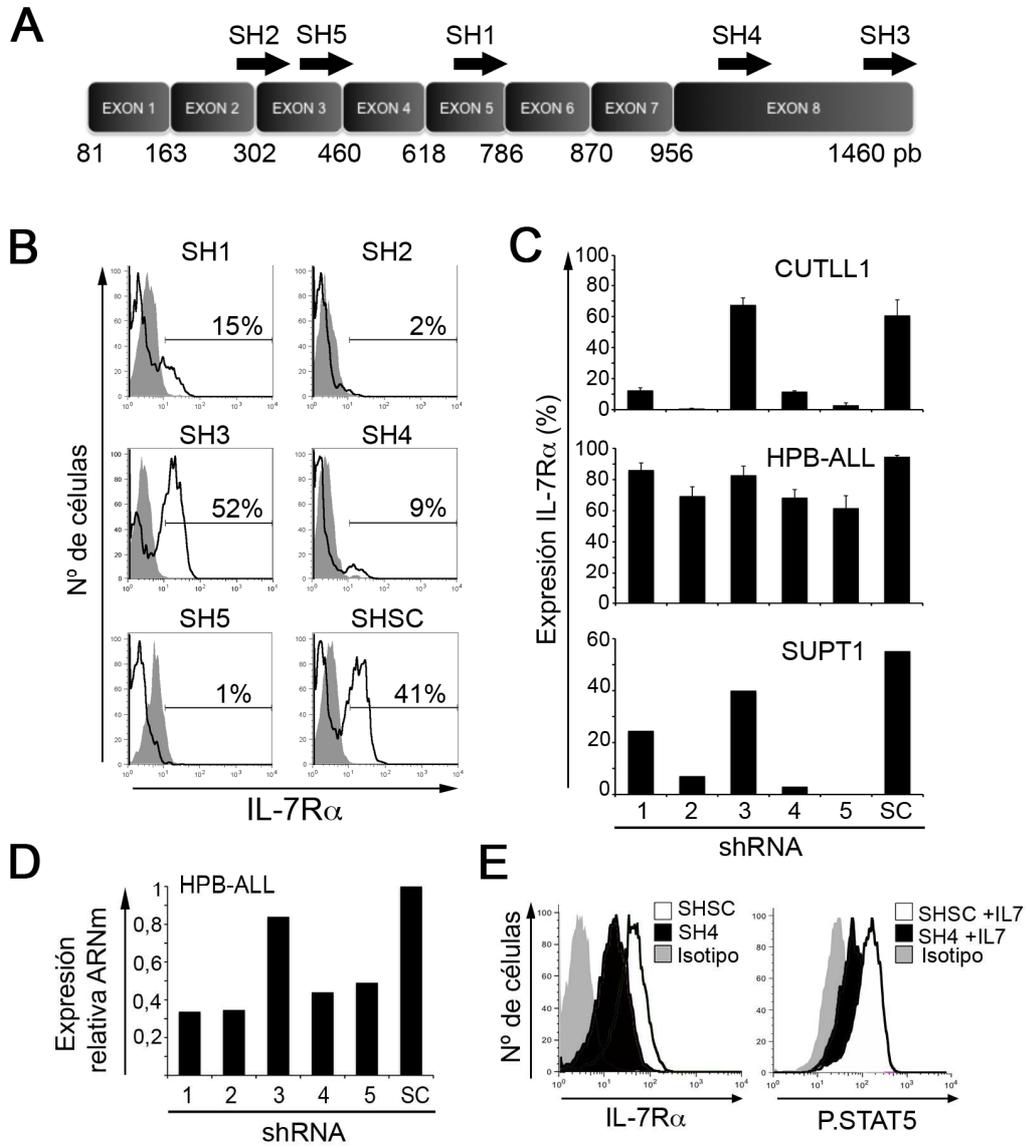


FIGURA 7.

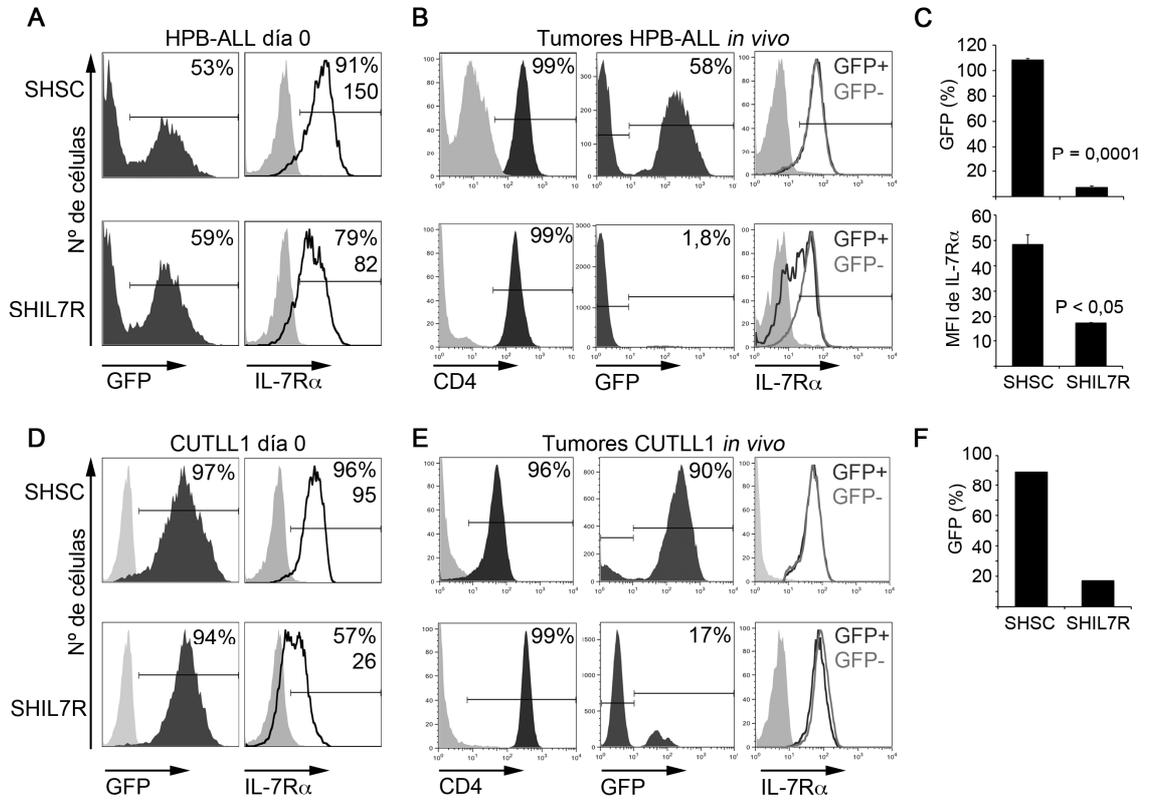


FIGURA 8.

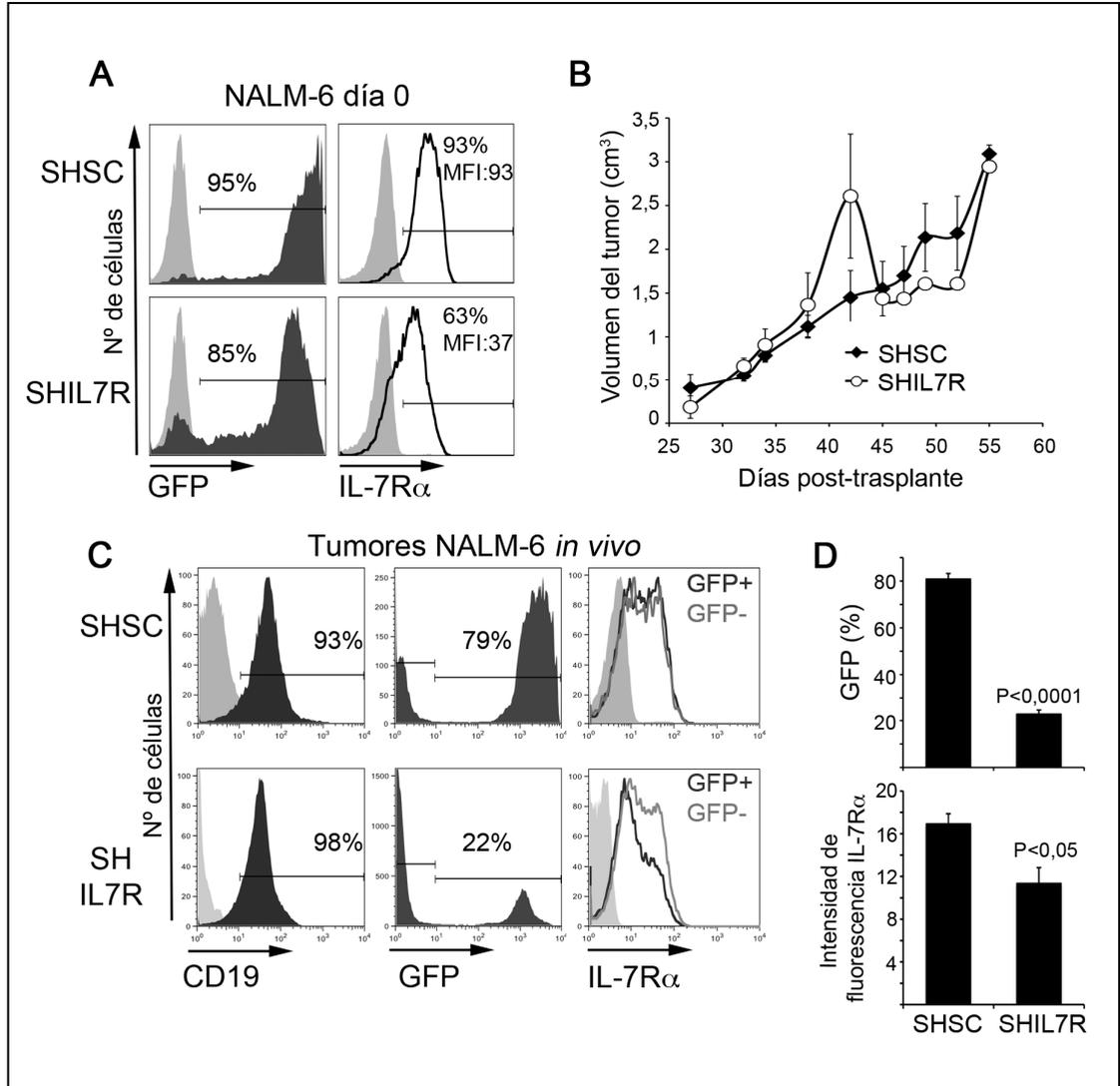
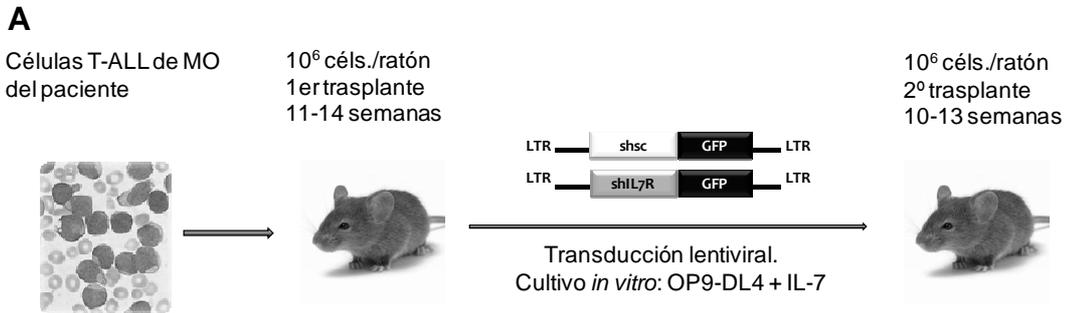


FIGURA 9.



**B**  
T-ALL5

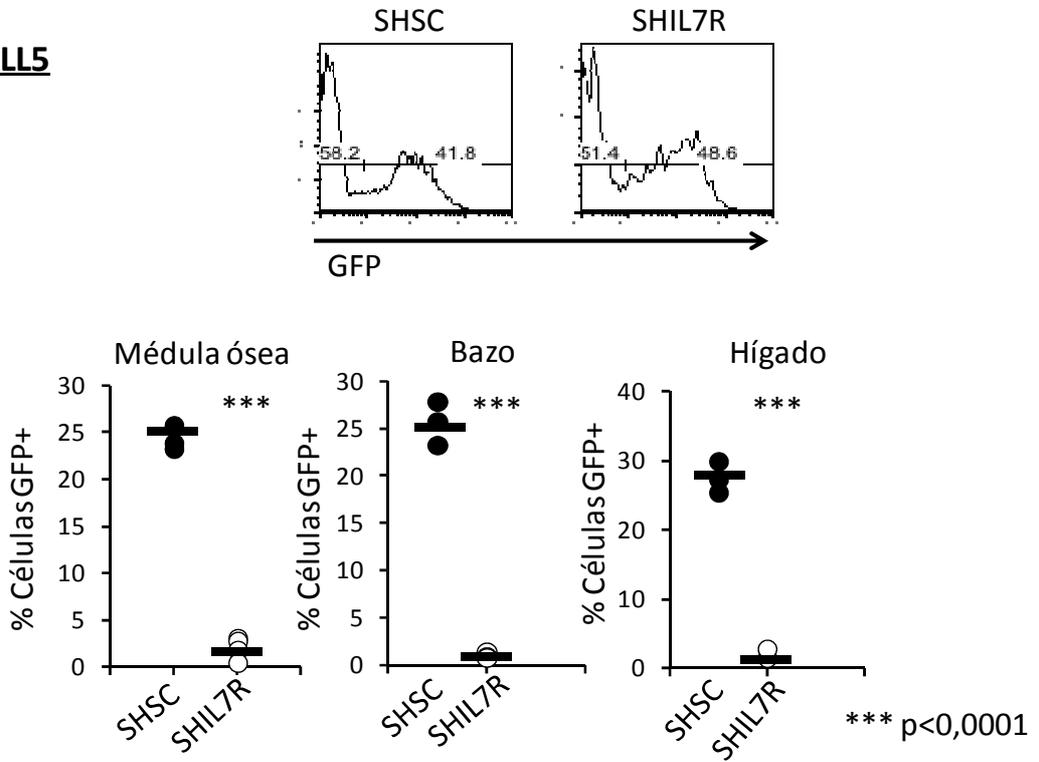


FIGURA 9.

**C**  
**T-ALL8**

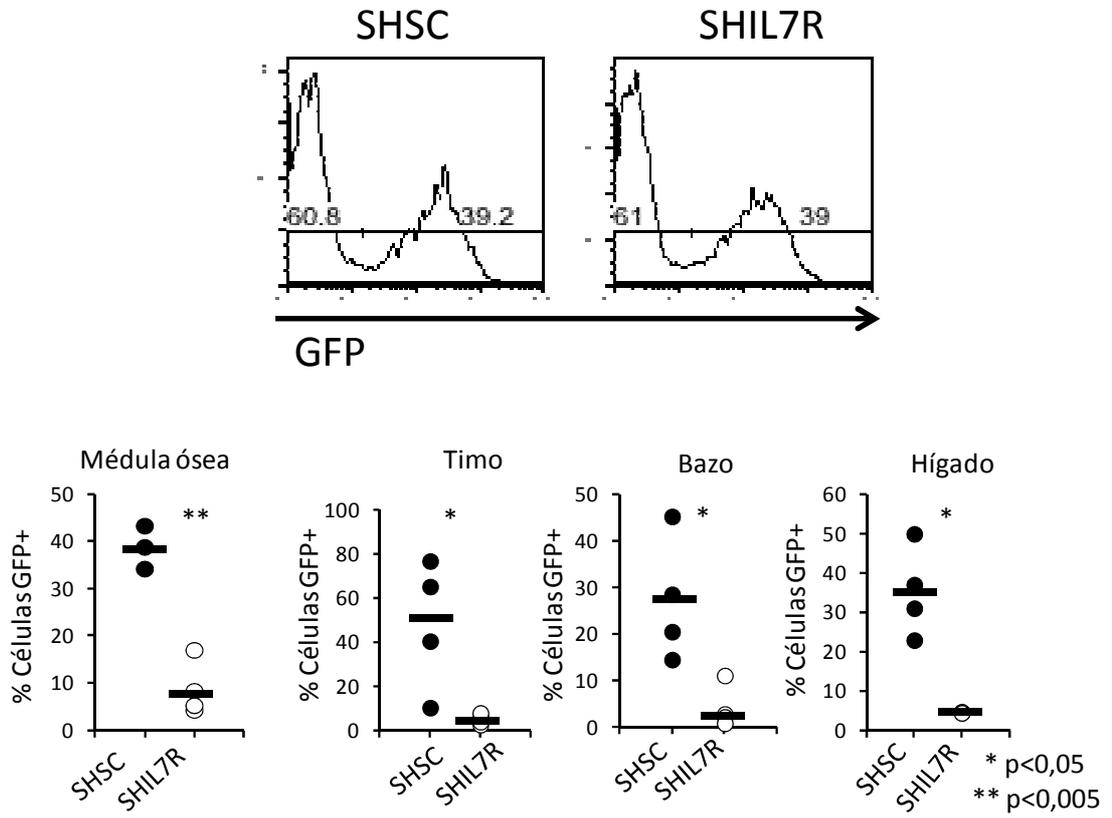
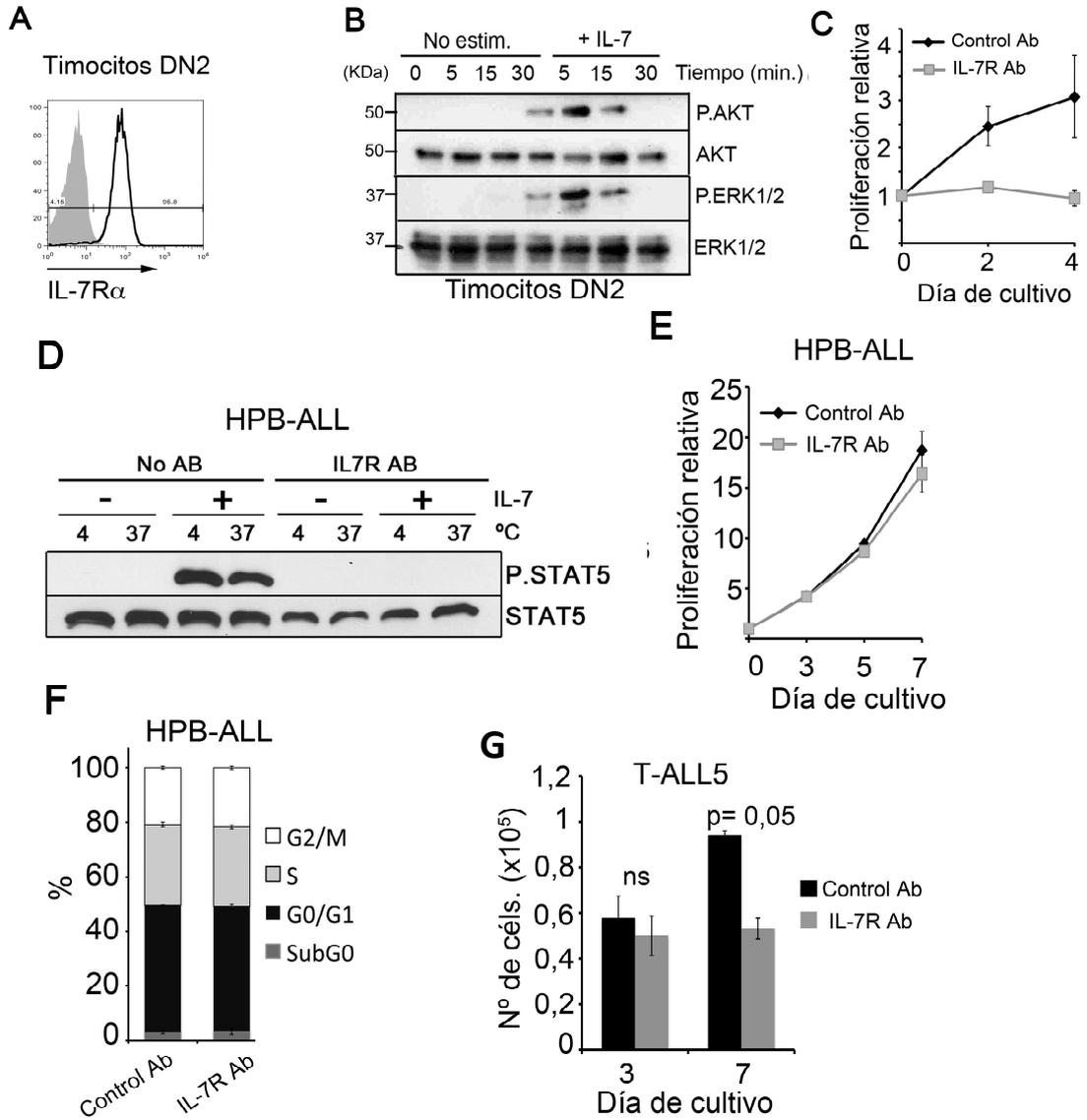


FIGURA 10.



# ES 2 482 342 A1

## SEQUENCE LISTING

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

<120> TRATAMIENTO TERAPEUTICO DE LEUCEMIAS LINFOBLASTICAS AGUDAS T y B Y LINFOMAS HUMANOS POR INHIBICION DEL RECEPTOR DE INTERLEUQUINA-7 IL-7R

<130> 5120220 MARIA LUISA TORIBIO

<160> 8

<170> BiSSAP 1.0

<210> 1

<211> 1809

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> source

<222> 1..1809

<223> /mol\_type="DNA"  
/note="Secuencia codificante del ARN mensajero de la cadena alfa del receptor de la interleuquina 7 humana"  
/organism="Homo sapiens"

<400> 1

gtcttctctcc ctcctctcct tcctcttact ctcattcatt tcatacacac tggctcacac  
60

atctactctc tctctctatc tctctcagaa tgacaattct aggtacaact tttggcatgg  
120

ttttttcttt acttcaagtc gtttctggag aaagtggcta tgctcaaaat ggagacttgg  
180

aagatgcaga actggatgac tactcattct catgctatag ccagttggaa gtgaatggat  
240

cgcagcactc actgacctgt gcttttgagg acccagatgt caacatcacc aatctggaat  
300

ttgaaatatg tggggccctc gtggaggtaa agtgcoctgaa tttcaggaaa ctacaagaga  
360

tatatttcat cgagacaaag aaattcttac tgattggaaa gagcaatata tgtgtgaagg  
420

ttggagaaaa gagtctaacc tgcaaaaaaa tagacctaac cactatagtt aaacctgagg  
480

ctccttttga cctgagtgtc gtctatcggg aaggagccaa tgactttgtg gtgacattta  
540

atacatcaca cttgcaaaaag aagtatgtaa aagttttaat gcacgatgta gcttaccgcc  
600

aggaaaagga tgaaaacaaa tggacgcatg tgaatttatc cagcaciaag ctgacactcc  
660

tgcagagaaa gctccaaccg gcagcaatgt atgagattaa agttcgatcc atccctgatc  
720

actattttaa aggcttctgg agtgaatgga gtccaagtta ttacttcaga actccagaga  
780

# ES 2 482 342 A1

tcaataatag ctcaggggag atggatccta tcttactaac catcagcatt ttgagttttt  
840

tctctgtcgc tctgttggtc atcttggcct gtgtgttatg gaaaaaaagg attaagccta  
900

tcgatggcc cagtctcccc gatcataaga agactctgga acatctttgt aagaaaccaa  
960

gaaaaaattt aaatgtgagt ttcaatcctg aaagtttctt ggactgccag attcataggg  
1020

tggatgacat tcaagctaga gatgaagtgg aaggttttct gcaagatacg tttcctcagc  
1080

aactagaaga atctgagaag cagaggcttg gaggggatgt gcagagcccc aactgcccatt  
1140

ctgaggatgt agtcatcact ccagaaagct ttggaagaga ttcattccctc acatgcttgg  
1200

ctgggaatgt cagtgcattg gacgccccta ttctctctc ttccaggtcc ctgactgca  
1260

gggagagtgg caagaatggg cctcatgtgt accaggacct cctgcttagc cttgggacta  
1320

caaacagcac gctgccccct ccattttctc tccaatctgg aatcctgaca ttgaaccag  
1380

ttgctcaggg tcagcccatt cttacttccc tgggatcaaa tcaagaagaa gcatatgtca  
1440

ccatgtccag cttctacca aaccagtga gtgtaagaaa cccagactga acttaccttg  
1500

agcgacaaag atgatttaa agggaagtct agagttccta gtctccctca cagcacagag  
1560

aagacaaaat tagcaaaacc ccactacaca gtctgcaaga ttctgaaaca ttgctttgac  
1620

cactcttctt gagttcagtg gcaactcaaca tgagtcaaga gcatcctgct tctaccatgt  
1680

ggatttggtc acaaggttta aggtgaccca atgattcagc tatttaaaaa aaaagagga  
1740

aagaatgaaa gagtaaagga aatgattgag gagtgaggaa ggcaggaaga gagcatgaga  
1800

ggaaaaaaaa  
1809

<210> 2

<211> 459

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..459

<223> /mol\_type="protein"

/note="Secuencia polipeptidica de la cadena alfa del receptor

ES 2 482 342 A1

de la interleuquina 7 humana"  
 /organism="Homo sapiens"

<400> 2

Met Thr Ile Leu Gly Thr Thr Phe Gly Met Val Phe Ser Leu Leu Gln  
 1 5 10 15  
 Val Val Ser Gly Glu Ser Gly Tyr Ala Gln Asn Gly Asp Leu Glu Asp  
 20 25 30  
 Ala Glu Leu Asp Asp Tyr Ser Phe Ser Cys Tyr Ser Gln Leu Glu Val  
 35 40 45  
 Asn Gly Ser Gln His Ser Leu Thr Cys Ala Phe Glu Asp Pro Asp Val  
 50 55 60  
 Asn Ile Thr Asn Leu Glu Phe Glu Ile Cys Gly Ala Leu Val Glu Val  
 65 70 75 80  
 Lys Cys Leu Asn Phe Arg Lys Leu Gln Glu Ile Tyr Phe Ile Glu Thr  
 85 90 95  
 Lys Lys Phe Leu Leu Ile Gly Lys Ser Asn Ile Cys Val Lys Val Gly  
 100 105 110  
 Glu Lys Ser Leu Thr Cys Lys Lys Ile Asp Leu Thr Thr Ile Val Lys  
 115 120 125  
 Pro Glu Ala Pro Phe Asp Leu Ser Val Val Tyr Arg Glu Gly Ala Asn  
 130 135 140  
 Asp Phe Val Val Thr Phe Asn Thr Ser His Leu Gln Lys Lys Tyr Val  
 145 150 155 160  
 Lys Val Leu Met His Asp Val Ala Tyr Arg Gln Glu Lys Asp Glu Asn  
 165 170 175  
 Lys Trp Thr His Val Asn Leu Ser Ser Thr Lys Leu Thr Leu Leu Gln  
 180 185 190  
 Arg Lys Leu Gln Pro Ala Ala Met Tyr Glu Ile Lys Val Arg Ser Ile  
 195 200 205  
 Pro Asp His Tyr Phe Lys Gly Phe Trp Ser Glu Trp Ser Pro Ser Tyr  
 210 215 220  
 Tyr Phe Arg Thr Pro Glu Ile Asn Asn Ser Ser Gly Glu Met Asp Pro  
 225 230 235 240  
 Ile Leu Leu Thr Ile Ser Ile Leu Ser Phe Phe Ser Val Ala Leu Leu  
 245 250 255  
 Val Ile Leu Ala Cys Val Leu Trp Lys Lys Arg Ile Lys Pro Ile Val  
 260 265 270  
 Trp Pro Ser Leu Pro Asp His Lys Lys Thr Leu Glu His Leu Cys Lys  
 275 280 285  
 Lys Pro Arg Lys Asn Leu Asn Val Ser Phe Asn Pro Glu Ser Phe Leu  
 290 295 300  
 Asp Cys Gln Ile His Arg Val Asp Asp Ile Gln Ala Arg Asp Glu Val  
 305 310 315 320  
 Glu Gly Phe Leu Gln Asp Thr Phe Pro Gln Gln Leu Glu Glu Ser Glu  
 325 330 335  
 Lys Gln Arg Leu Gly Gly Asp Val Gln Ser Pro Asn Cys Pro Ser Glu  
 340 345 350  
 Asp Val Val Ile Thr Pro Glu Ser Phe Gly Arg Asp Ser Ser Leu Thr  
 355 360 365  
 Cys Leu Ala Gly Asn Val Ser Ala Cys Asp Ala Pro Ile Leu Ser Ser  
 370 375 380  
 Ser Arg Ser Leu Asp Cys Arg Glu Ser Gly Lys Asn Gly Pro His Val  
 385 390 395 400  
 Tyr Gln Asp Leu Leu Ser Leu Gly Thr Thr Asn Ser Thr Leu Pro  
 405 410 415  
 Pro Pro Phe Ser Leu Gln Ser Gly Ile Leu Thr Leu Asn Pro Val Ala  
 420 425 430  
 Gln Gly Gln Pro Ile Leu Thr Ser Leu Gly Ser Asn Gln Glu Glu Ala  
 435 440 445  
 Tyr Val Thr Met Ser Ser Phe Tyr Gln Asn Gln  
 450 455

<210> 3

<211> 58

<212> RNA

## ES 2 482 342 A1

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..58

<223> /mol\_type="RNA"

/note="Secuencia de nucleotidos del shRNA numero 1 frente a la cadena alfa del IL-7R"

/organism="Artificial Sequence"

<400> 3

ccggcggcag caauguauga gauuacucga guaaucucau acauugcugc cguuuuug  
58

<210> 4

<211> 58

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..58

<223> /mol\_type="RNA"

/note="Secuencia de nucleotidos del shRNA numero 2 frente a la cadena alfa del IL-7R"

/organism="Artificial Sequence"

<400> 4

ccggcccaga ugucaacauc accaacucga guuggugaug uugacaucug gguuuuug  
58

<210> 5

<211> 58

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..58

<223> /mol\_type="RNA"

/note="Secuencia de nucleotidos del shRNA numero 3 frente a la cadena alfa del IL-7R"

/organism="Artificial Sequence"

<400> 5

ccggccauuc uuacuucccu gggaucucga gaucccaggg aaguaagaau gguuuuug  
58

<210> 6

<211> 58

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<222> 1..58

<223> /mol\_type="RNA"

/note="Secuencia de nucleotidos del shRNA numero 4 frente a la cadena alfa del IL-7R"

/organism="Artificial Sequence"

<400> 6

ccgggaagag auucaucccu cacaucucga gaugugaggg augaaucucu uuuuuuug

## ES 2 482 342 A1

58

<210> 7  
<211> 58  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<221> source  
<222> 1..58  
<223> /mol\_type="RNA"  
/note="Secuencia de nucleotidos del shRNA numero 5 frente a la  
cadena alfa del IL-7R"  
/organism="Artificial Sequence"

<400> 7  
ccggcugauu ggaaagagca auauacucga guauauugcu cuuuccaau aguuuuug  
58

<210> 8  
<211> 58  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<221> source  
<222> 1..58  
<223> /mol\_type="RNA"  
/note="Secuencia de nucleotidos de un shRNA que no reconoce  
ningun gen humano ni de raton"  
/organism="Artificial Sequence"

<400> 8  
ccggcaacaa gaugaagagc accaacucga guuggugcuc uucaucuugu uguuuuuug  
58