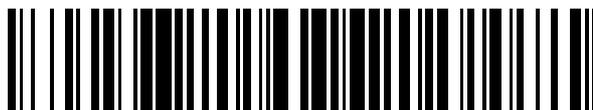


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 592 902**

51 Int. Cl.:

C07K 16/22 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 14/515 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.10.2009 PCT/EP2009/062861**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.04.2010 WO10037864**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2009 E 09736173 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.06.2016 EP 2352761**

54 Título: **Inhibición del PIGF para el tratamiento de la leucemia positiva para el cromosoma Filadelfia**

30 Prioridad:

02.10.2008 US 195140 P

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

02.12.2016

73 Titular/es:

**VIB VZW (50.0%)
Rijvisschestraat 120
9052 Gent, BE y
LIFE SCIENCES RESEARCH PARTNERS VZW
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**CARMELIET, PETER y
LOGES, SONJA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 592 902 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

Inhibición del PIGF para el tratamiento de la leucemia positiva para el cromosoma Filadelfia.

5 Campo de la invención

La presente solicitud se refiere al campo del cáncer, en particular de la leucemia. Más en particular, se refiere al tratamiento de la leucemia positiva para el cromosoma Filadelfia (Ph+). Esto se consigue a través de la inhibición del factor de crecimiento placentario (PIGF). Por lo tanto, se proporcionan métodos para el tratamiento de la leucemia Ph+ mediante el uso de inhibidores del PIGF, en particular mediante el uso de un anticuerpo anti-PIGF. Un tipo de leucemia en particular que se contempla tratar de esta forma es la leucemia mielógena crónica (LMC), especialmente también en pacientes en los que los inhibidores convencionales de la BCR/ABL, tales como el imatinib, no consiguen tener un efecto terapéutico suficiente.

15 Antecedentes

El cromosoma Filadelfia, también conocido como translocación Filadelfia, es una anomalía cromosómica específica que se asocia con la leucemia mielógena crónica (LMC). Es el resultado de una translocación recíproca entre el cromosoma 9 y el 22, y se designa específicamente como t(9;22)(q34;q11). La presencia de esta translocación es una prueba muy sensible de la LMC, dado que el 95 % de los pacientes con LMC presentan esta anomalía. El restante 5 % de los pacientes con LMC normalmente tienen una translocación críptica que es invisible en las preparaciones de cromosomas en bandas G, o una variante de translocación que implica otro cromosoma o cromosomas, así como el brazo largo de los cromosomas 9 y 22. Sin embargo, la mera presencia del cromosoma Filadelfia (Ph) no es lo suficientemente específica como para diagnosticar una LMC, dado que también se encuentra en el 25-30 % de los casos de leucemia linfoblástica aguda (LLA) en adultos (y en el 2-10 % de los casos pediátricos de LLA).

No obstante, estas enfermedades son claramente distintas. La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es una forma de leucemia en la que los leucocitos inmaduros y malignos se multiplican de forma continua y se producen con exceso en la médula ósea. La LLA provoca daños y la muerte por el desplazamiento de las células normales de la médula ósea, y al diseminarse (metastatizar) a otros órganos. La LLA es más habitual en la niñez y en la adolescencia, con un pico de incidencia a los 4-5 años de edad, y otro pico a una edad avanzada. La tasa de curación global en niños es del 85 %, y aproximadamente el 50 % de los adultos tiene una supervivencia exenta de enfermedad a largo plazo. "Aguda" se refiere al estado inmaduro indiferenciado de los linfocitos circulantes ("blastos"), y a la rápida progresión de la enfermedad, que puede ser mortal en entre unas semanas y unos meses si no se trata. El tratamiento de la leucemia aguda puede incluir quimioterapia, esteroides, terapia por radiación, tratamientos combinados intensivos (incluyendo trasplantes de médula ósea o de células madre) y factores de crecimiento.

La leucemia mielógena (o mielóide) crónica (LMC), por otro lado, es una forma de leucemia caracterizada por un aumento y un crecimiento no regulado de células predominantemente mieloides en la médula ósea, y la acumulación de estas células en la sangre; por lo tanto, es una enfermedad mieloproliferativa. La LMC es un trastorno clonal de las células madre de la médula ósea en el que el principal hallazgo es la proliferación de los granulocitos maduros (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y de sus precursores. Históricamente se ha tratado con quimioterapia, interferón y trasplantes de médula ósea, aunque ahora también hay disponibles terapias dirigidas, y se usan como estándar de tratamiento.

El intercambio de partes de los cromosomas 9 y 22 observado en el cromosoma Filadelfia da lugar a un gen de fusión BCR-ABL (Melo, 1996). Es decir, parte del gen de la BCR ("breakpoint cluster region" o región de ruptura) del cromosoma 22 (región q11) se fusiona con parte del gen ABL del cromosoma 9 (región q34). Abl representa "Abelson", el nombre de un virus de leucemia que porta una proteína similar. Se generan dos tipos de transcritos BCR-ABL (que producen las isoformas p185 y p210, denominadas según su peso molecular aparente en kDa) debido a la ruptura de la región BCR. El gen fusionado "BCR-ABL" se localiza en el cromosoma resultante más corto 22. El ABL porta un dominio que puede añadir grupos fosfato a residuos de tirosina (una tirosina quinasa), y el producto del gen de fusión BCR-ABL también es una tirosina quinasa (Faderl et al., 1999).

La proteína de fusión BCR-ABL interactúa con la subunidad del receptor común β de la interleucina 3. El transcrito BCR-ABL está continuamente activo y no requiere una activación por parte de otras proteínas mensajeras celulares. A su vez, el BCR-ABL activa una cascada de proteínas que controlan el ciclo celular, acelerando la división celular. Además, la proteína BCR-ABL inhibe la reparación del ADN, provocando una inestabilidad genómica y haciendo que la célula sea más susceptible a desarrollar otras anomalías genéticas, y favoreciendo potencialmente la progresión de la LMC desde una fase crónica hacia una crisis blástica intratable. Se cree que la acción de tirosina quinasa de la proteína BCR-ABL es la causa fisiopatológica de la leucemia mielógena crónica. Se han desarrollado terapias dirigidas que inhiben específicamente la actividad de la proteína BCR-ABL. La primera de estas fue el imatinib (comercializado en su forma de sal de mesilato con el nombre comercial Glivec® o Gleevec®). Estos y otros inhibidores de la tirosina quinasa pueden inducir una remisión completa de la LMC, confirmando la importancia fundamental de la BCR-ABL en la LMC (Hehlmann et al., 2007). También se notificó un éxito limitado cuando se

trataba la LLA positiva para el cromosoma Filadelfia (Ph+) con inhibidores de la BCR-ABL (Yanada y Naoe, 2006; Piccaluga et al., 2006).

5 A pesar del hecho de que la introducción del imatinib y de los inhibidores de la BCR/ABL de segunda generación (por ejemplo, dasatinib) ha revolucionado el tratamiento de los pacientes con leucemias positivas para el cromosoma Filadelfia (Ph+), es un problema conocido que las células de leucemia persisten incluso en pacientes tratados con éxito, y algunos pacientes desarrollan resistencia y finalmente una recaída (Swords et al., 2007; Buchert, 2007; Li y Li, 2007; Kujawski y Talpaz, 2007). Las razones de estos inconvenientes no se han resuelto completamente.

10 Por lo tanto, sería ventajoso tener opciones adicionales para el tratamiento de los pacientes con leucemia positiva para el cromosoma Filadelfia, particularmente de aquellos pacientes que no responden al tratamiento con inhibidores de la BCR-ABL.

Sumario de la invención

15 Es un objeto de la solicitud proporcionar nuevas metodologías terapéuticas para el tratamiento de las leucemias positivas para el cromosoma Filadelfia (Ph+). Particularmente, se contempla que también sea capaz de proporcionar unas metodologías útiles para aquellos pacientes en los que los inhibidores de la BCR-ABL, como el imatinib, no son (o ya no son) una terapia adecuada. Sorprendentemente, se ha averiguado que la inhibición del factor de crecimiento placentario (PIGF), a pesar de que este factor no es expresado en las líneas celulares leucémicas, da como resultado una supervivencia significativamente prolongada en ratones leucémicos. Además, esta supervivencia prolongada es independiente del estado de mutación de la BCR-ABL, al contrario de lo que se observa con los inhibidores de la BCR-ABL.

25 Por lo tanto, según un primer aspecto, se contempla el uso de un inhibidor del factor de crecimiento placentario para el tratamiento de la leucemia positiva para el cromosoma Filadelfia. También se contempla el uso de un inhibidor del factor de crecimiento placentario para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la leucemia positiva para el cromosoma Filadelfia.

30 Asimismo, se proporcionan métodos para el tratamiento de la leucemia positiva para el cromosoma Filadelfia en un sujeto en necesidad de los mismos, que comprende la administración de un inhibidor del PIGF al sujeto. Por supuesto, el objetivo es mejorar así los síntomas o finalmente el tratamiento de la leucemia Ph+ en el sujeto en necesidad del mismo.

35 Según algunas realizaciones en particular, el inhibidor del factor de crecimiento placentario proporcionado en los usos y los métodos descritos en el presente documento es un inhibidor selectivo del factor de crecimiento placentario. Particularmente, el inhibidor selectivo es un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une específicamente al factor de crecimiento placentario. Dicho anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal. Según algunas realizaciones en particular, el anticuerpo o un fragmento del mismo que se une específicamente al factor de crecimiento placentario es un anticuerpo monoclonal. Según algunas realizaciones adicionales en particular, es un anticuerpo monoclonal murino. Según otras realizaciones adicionales más en particular, los anticuerpos monoclonales murinos pueden estar humanizados, es decir, ser versiones humanizadas de los anticuerpos monoclonales de ratón elaborados mediante la tecnología del ADN recombinante, partiendo de las secuencias del ADN genómico de ratón y/o humanas que codifican para las cadenas H y L, o a partir de clones de ADNc que codifican para las cadenas H y L. Según algunas realizaciones alternativas, el anticuerpo o el fragmento del mismo es un anticuerpo humano (o un fragmento del mismo), en particular un anticuerpo monoclonal humano.

50 Según algunas realizaciones en particular, el fragmento del anticuerpo que se une específicamente al PIGF es un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂ o un fragmento variable de cadena única (scFv).

Según algunas realizaciones alternativas en particular, el inhibidor selectivo es un nanocuerpo contra el PIGF. Según algunas otras realizaciones más en particular, el inhibidor del PIGF no es un inhibidor selectivo. Un ejemplo particular del mismo es un inhibidor del VEGFR-1, tal como un anticuerpo VEGFR-1 o un fragmento del mismo.

55 Se proporcionan métodos y usos de los inhibidores del PIGF para el tratamiento de leucemias positivas para el cromosoma Filadelfia (Ph+). Según algunas realizaciones en particular, la leucemia positiva para el cromosoma Filadelfia es la leucemia mielógena crónica (LMC). Según en algunas realizaciones alternativas, la leucemia Ph+ es la leucemia linfoblástica aguda (LLA), tal como, por ejemplo, la B-LLA (en la que los linfocitos B son células leucémicas) o la T-LLA (en la que las células leucémicas son los linfocitos T).

60 Se contempla que los métodos y los usos descritos en el presente documento tengan una amplia aplicabilidad. En particular, se contempla que los inhibidores del PIGF puedan usarse para el tratamiento (o en métodos de tratamiento) de todas las leucemias positivas para el cromosoma Filadelfia, en particular también en aquellas que no pueden ser tratadas con un inhibidor de la BCR-ABL y/o en aquellas que no pueden ser tratadas sólo con un inhibidor de la BCR-ABL. Una leucemia Ph+ puede no ser tratable con un inhibidor de la BCR-ABL - o sólo con un

inhibidor de la BCR-ABL - por diversas razones. Las razones más habituales son que la leucemia puede ser (al menos parcialmente) insensible al tratamiento (o porque se ha desarrollado una resistencia/insensibilidad al menos parcial al tratamiento), o que el inhibidor de la BCR-ABL puede no ser tolerado por el paciente (por ejemplo, debido a alergias o a efectos secundarios adversos).

5 Aunque la inhibición del PIGF ofrece una metodología general para el tratamiento de las leucemias Ph+, puede ser especialmente beneficiosa en aquellos casos en los que una inhibición de la BCR-ABL, la metodología terapéutica estándar para, por ejemplo, la LMC, no consigue alcanzar el efecto terapéutico deseado. El uso de inhibidores del PIGF puede ofrecer entonces una metodología alternativa o adicional. Según algunas realizaciones específicas, el inhibidor del PIGF puede usarse junto con un inhibidor de la BCR-ABL.

Breve descripción de las figuras

15 La Figura 1 muestra la expresión del PIGF en células leucémicas, en células hematopoyéticas y en células estromales primarias de la médula ósea *in vitro*. A: cantidad de proteína PIGF secretada por las diferentes líneas celulares y células aisladas (para más detalles véase el Ejemplo 1); B: expresión del PIGF por parte de la fracción hematopoyética (CD45⁺) y la fracción no hematopoyética (CD45) de BMDSC murinas. * indica p < 0,001. BM: médula ósea.

20 En la Figura 2 se muestra la expresión del PIGF y de otras moléculas *in vivo* (para los detalles, véase el Ejemplo 2). A, B: niveles de la proteína PIGF en sangre periférica o en médula ósea en diferentes puntos temporales de la progresión de la enfermedad leucémica en ratones; C, D: proporción entre los niveles de la proteína PIGF frente a los del sVEGFR-1 en la sangre periférica o en la médula ósea en diferentes puntos temporales de la progresión de la enfermedad leucémica en ratones; E: expresión del ARNm del PIGF de médula ósea en ratones sanos y en leucémicos, * indica p < 0,002; F: caracterización de la expresión del PIGF en subpoblaciones de médula ósea, * indica p < 0,05; G: expresión del ARNm del VEGF en la médula ósea de ratones sanos y de leucémicos; H, I: los niveles de la proteína PIGF en sangre periférica o en médula ósea se correlacionan con la carga leucémica en los ratones enfermos en una fase terminal.

30 La Figura 3 muestra la proliferación de las células leucémicas mediante el PIGF (para los detalles, véase el Ejemplo 3). A, B: expresión del Npn-1 y del Npn-2 en diferentes líneas celulares leucémicas; C: inducción de proliferación en la línea celular BV-173 por parte de diferentes concentraciones de PIGF; D: inducción de proliferación por parte de 50 ng/ml de PIGF en una línea celular K562 (panel superior izquierdo), BV-173 (panel superior derecho), KCL-22 (panel inferior izquierdo) y BaF3 (panel inferior derecho), respectivamente; E: inhibición de la proliferación inducida por el PIGF en la línea celular BV-173 por parte de un anticuerpo anti-VEGFR-1; F: inhibición de la proliferación inducida por el PIGF en la línea celular BV-173 por parte de un anticuerpo anti-PIGF. BM: médula ósea; PIGF: factor de crecimiento placentario; α VEGFR-1: anticuerpo anti-receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 1; α PIGF: anticuerpo anti-PIGF.

40 En la Figura 4 se muestra la inducción por una interacción paracrina entre las células leucémicas y las BMDSC *in vitro* (A-D), así como con medio condicionado de células leucémicas (E). A: expresión del PIGF en las BMDSC, en la línea celular BV-173 y en cocultivo (BMDSC + BV); B: expresión del PIGF en células S17, en la línea celular BV-173 y en cocultivo; C: proliferación de células leucémicas BV-173 solas y en cocultivo con BMDSC, e inhibición por parte de un anticuerpo anti-PIGF; D: proliferación de las BMDSC solas y en cocultivo con células leucémicas BV-173, e inhibición por parte de un anticuerpo anti-PIGF; E: regulación por aumento del PIGF en células S17 mediante una incubación con un medio condicionado de células leucemias (BV-173). BV: línea celular BV-173; α PIGF: anticuerpo anti-PIGF.

45 Figura 5 A: supervivencia de ratones PIGF^{-/-} leucémicos y WT; B: supervivencia de ratones leucémicos cruzados (para los detalles, véase el Ejemplo 5); C: supervivencia de ratones portadores de una leucemia inducida por células linfáticas BaF3 BCR-ABL+, tratadas bien con un anticuerpo anti-PIGF o bien con un anticuerpo de control; D, E: análisis mediante FACS de una leucemia BCR-ABL+ en una fase temprana (d15) y en una fase tardía (d28) y efecto de la inhibición con un anticuerpo anti-PIGF; F: histología de médula ósea de ratones de control y leucémicos en fase terminal tratados con anti-PIGF; G: supervivencia en un modelo de ratón de LMC sensible al imatinib, tratado bien con un anticuerpo anti-PIGF o bien con un anticuerpo de control; H: supervivencia en un modelo de ratón de LMC resistente al imatinib, tratado bien con un anticuerpo anti-PIGF o bien con un anticuerpo de control. α PIGF: anticuerpo anti-PIGF; d: días; T315I: la mutación T315I de la proteína de fusión BCR-ABL. Para más detalles, véase el Ejemplo 6.

55 La Figura 6 muestra la inhibición de la hipervascularización y de la fibrosis de la médula ósea tras un tratamiento anti-PIGF (véase el Ejemplo 7). A, C: densidad vascular de la médula ósea (MVD) en ratones trasplantados en falso tratados con un anticuerpo de control y tratados con anti-PIGF con una leucemia en fase terminal; B, D: longitud de las fibras de reticulina⁺ y fibrosis de la médula ósea en ratones trasplantados en falso tratados con un anticuerpo de control y tratados con anti-PIGF con una leucemia en fase terminal.

60 En la Figura 7 se muestran los datos de la expresión del PIGF en una LMC humana (A-D, Ejemplo 8), así como los datos que correlacionan la expresión del PIGF y el tratamiento con imatinib en ratones (E) y en seres humanos (F, Ejemplo 9). A: niveles plasmáticos del PIGF en diferentes estadios de la LMC (controles sanos, fase crónica y crisis blástica), * indica p < 0,0001; B: niveles plasmáticos del PIGF en médula ósea de pacientes con LMC; C: correlación entre los niveles del PIGF y la cantidad de transcritos de BCR/ABL en una LMC humana; D: QRT-PCR de la expresión del PIGF en controles sanos, en células leucémicas y en células estromales de pacientes con LMC; E: niveles del PIGF en la médula ósea de ratones leucémicos sin tratar y sanos, y de ratones

leucémicos tratados con imatinib; F: niveles del PIGF en sujetos humanos sanos y en pacientes con diferentes niveles de respuesta al imatinib (IM). Para los detalles, véase el Ejemplo 9.

Descripción detallada

5

Definiciones

La presente invención se describirá con respecto a algunas realizaciones en particular y con referencia a ciertos dibujos, pero la invención no está limitada por los mismos, sino únicamente por las reivindicaciones. Cualquier signo de referencia de las reivindicaciones no debe ser interpretado como limitante del ámbito. Los dibujos descritos son únicamente esquemáticos y no son limitantes. En los dibujos, el tamaño de algunos de los elementos puede estar exagerado y no estar dibujado a escala con fines ilustrativos. Cuando se usa el término "que comprende" en la presente descripción y en las reivindicaciones, no excluye otros elementos o etapas. Cuando se usa un artículo indefinido o definido cuando se hace referencia a un nombre singular, por ejemplo, "un" o "uno/a", "el/la", éste incluye un plural de ese nombre salvo que se haya indicado específicamente otra cosa.

Adicionalmente, los términos primero, segundo y tercero, y similares, en la descripción y en las reivindicaciones, se usan para distinguir entre elementos similares, y no necesariamente para describir un orden secuencial o cronológico. Debe apreciarse que los términos así usados son intercambiables en las circunstancias apropiadas, y que las realizaciones de la invención descritas en el presente documento son susceptibles de llevarse a cabo en otras secuencias distintas a las descritas o ilustradas en el presente documento.

Se proporcionan los siguientes términos o definiciones únicamente para ayudar a comprender la invención. Salvo que se definan específicamente en el presente documento, todos los términos usados en el presente documento tienen el mismo significado al que tendrían para un experto en la materia de la presente invención. Los profesionales consultarán particularmente Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Press, Plainview, Nueva York (1989); y Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (Suplemento 47), John Wiley & Sons, Nueva York (1999), para las definiciones y los términos de la técnica. No debe interpretarse que las definiciones proporcionadas en el presente documento tienen un ámbito menor al comprendido por un experto habitual en la materia.

"Factor de crecimiento placentario" o "PIGF", según se usa en el presente documento, se refiere a un miembro de la subfamilia del VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), en particular al PIGF humano (GeneID 5228; RefSeqs (independientemente de las construcciones del genoma) NM_002632.4 (ARNm) y NP_002623.2 (proteína)). Salvo que se especifique de otro modo, el término "PIGF" puede referirse al gen así como a sus productos, tales como el ARN del PIGF (lo más particularmente, el ARNm del PIGF) y a la proteína PIGF. Se pretende que todas las isoformas del PIGF estén incluidas en la definición del PIGF.

El término leucemia "positiva para el cromosoma Filadelfia" o "Ph+", según se usa en el presente documento, se refiere a enfermedades en las que se confirma que hay presente una translocación Filadelfia. El cromosoma Filadelfia es el resultado de la translocación t(9;22)(q34;q11) (translocación Filadelfia). Se han documentado al menos dos formas alternativas de translocación del cromosoma Filadelfia, pero ambos puntos de ruptura alternativos dan como resultado la unión de diferentes conjuntos de exones de la BCR (OMIM *151410) del cromosoma 22 en un subconjunto común de los exones del gen ABL (OMIM *189980) localizado en el cromosoma 9. Por lo tanto, la fusión puede dar como resultado 2 productos oncogénicos quiméricos alternativos denominados p210(BCR-ABL) y p185(BCR-ABL), denominados en su conjunto en el presente documento "BCR-ABL" (incluido en OMIM *151410 y *189980). La activación de la actividad de la tirosina quinasa del ABL es necesaria para el potencial oncogénico del oncogén quimérico. Dado que la presencia del gen quimérico BCR-ABL (y de sus productos génicos) es una característica de las leucemias Ph+, las "Ph+" también pueden denominarse leucemias "positivas para BCR-ABL" o "BCR-ABL+", para indicar la presencia del gen de fusión. Nótese que las translocaciones o las mutaciones que dan como resultado la generación de un gen quimérico funcional BCR-ABL (es decir, BCR-ABL+) también se clasificarán por lo tanto en el presente documento como "Ph+", independientemente del mecanismo de translocación. Éste puede ser el caso, por ejemplo, con translocaciones más complejas.

Un "inhibidor selectivo del factor de crecimiento placentario" según se usa en la solicitud es una molécula o un compuesto que inhibe la función o la ruta de señalización del PIGF sin interferir en la función fisiológica de otras moléculas. En particular, un inhibidor selectivo del PIGF no interferirá en la función del VEGF. Por lo tanto, como ejemplo no limitante, un compuesto dirigido específicamente contra el PIGF (por ejemplo, un anticuerpo anti-PIGF) es un inhibidor selectivo, mientras que los compuestos que también se dirigen al VEGF (tales como los compuestos basados en el VEGFR1) o que se dirigen a receptores compartidos VEGF/PIGF- (por ejemplo, un anticuerpo contra el VEGFR1 o el sVEGFR-1) es normalmente un inhibidor no selectivo.

"Leucemia mielógena crónica", "leucemia mielóide crónica" o "LMC", según se usa en el presente documento, se refiere a un trastorno clonal mieloproliferativo de una célula madre pluripotente con una anomalía citogenética específica (el cromosoma Filadelfia), que implica células mieloides, eritroides, megacariocíticas, linfoides B y a veces infoides T, pero no los fibroblastos de médula ósea (OMIM #608232; Silver, 2003).

"Leucemia linfocítica aguda", "leucemia linfoblástica aguda" o "LLA" según se usa en la solicitud se refiere a una forma aguda de leucemia en la que los leucocitos inmaduros se multiplican de forma continua y se sobreproducen en la médula ósea. Algunos ejemplos de LLA incluyen T-LLA y B-LLA. Un subconjunto en particular del grupo heterogéneo de casos de LLA también es positivo para el cromosoma Filadelfia, es decir, es Ph+ o BCR- ABL+ (Radich, 2001; Alvarado et al., 2007).

Según se usa en la solicitud, un "inhibidor de la BCR-ABL" es una molécula o un compuesto que inhibe la expresión o la función del gen quimérico BCR-ABL o de su producto génico. Nótese que no es necesario que el inhibidor de la BCR-ABL sea específico para la BCR-ABL. Por ejemplo, puede ser un inhibidor de tirosina quinasa que se dirige a más de únicamente la tirosina quinasa BCR-ABL. Un inhibidor de la BCR-ABL es bien conocido como terapia dirigida en la leucemia Ph+, un ejemplo típico pero no limitante es el imatinib. En la solicitud se incluyen otros ejemplos.

"Tratar" según se usa en la solicitud significa conseguir una mejora significativa de uno o más de los síntomas clínicos asociados con la leucemia Ph+. Dependiendo de la situación, la mejora significativa puede clasificarse cuantitativamente o cualitativamente. Los criterios cualitativos pueden ser, por ejemplo, el bienestar del paciente. En el caso de una evaluación cuantitativa, la mejora significativa es una mejora normalmente mayor del 10 %, mayor del 20 %, mayor del 25 %, mayor del 30 %, mayor del 40 %, mayor del 50 %, mayor del 60 %, mayor del 70 %, mayor del 75 %, mayor del 80 %, mayor del 90 %, mayor del 95 % o de un 100 % o más con respecto a la situación previa a la administración del inhibidor del PIGF. Por supuesto, si la mejora se expresa como una disminución (por ejemplo, en el número de células malignas presentes en una muestra de un paciente), la mejora no puede ser mayor del 100 %. El marco temporal a lo largo del cual se evalúa la mejora dependerá del tipo de criterio observado y puede determinarlo un experto en la materia.

Es un aspecto importante de la invención proporcionar métodos y usos de los inhibidores del factor de crecimiento placentario para el tratamiento de la leucemia positiva para el cromosoma Filadelfia. También se enseña el uso de los inhibidores del factor de crecimiento placentario para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la leucemia positiva para el cromosoma Filadelfia.

Los inhibidores del factor de crecimiento placentario (PIGF) son particularmente inhibidores selectivos del PIGF, de forma que no interfieran con otras moléculas. En particular, los inhibidores selectivos del PIGF no deberían interferir con la función del VEGF. Según algunas realizaciones en particular, el inhibidor del PIGF no es un inhibidor del VEGF.

Según algunas realizaciones alternativas en particular, el inhibidor del PIGF no es un inhibidor del VEGFR1. Según algunas realizaciones específicas, el inhibidor del PIGF no se basa en el VEGFR1.

Los inhibidores puede neutralizar la actividad del PIGF al interferir en su síntesis, traducción, dimerización, unión al receptor y/o transducción de las señales mediada por la unión al receptor. Debería entenderse que la neutralización de la actividad del PIGF es la supresión de la actividad del PIGF en al menos el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o incluso del 100 %.

Los inhibidores del PIGF, en particular los inhibidores selectivos, son conocidos en la materia. Según algunas realizaciones en particular, los inhibidores selectivos son anticuerpos. El término "anticuerpo" o "anticuerpos" se refiere a un anticuerpo caracterizado por estar dirigido específicamente contra el PIGF o cualquier derivado funcional del mismo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, particularmente del tipo F (ab')₂, F (ab) o Fv de cadena única (scFv), o cualquier tipo de anticuerpo recombinante derivado de los mismos. Los anticuerpos anti-PIGF descritos en el presente documento, incluyendo los antiseros policlonales específicos preparados contra el PIGF o cualquier derivado funcional de los mismos, no presentan reactividad cruzada con otras proteínas. Según algunas realizaciones en particular, los anticuerpos anti-PIGF son anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales pueden producirse, por ejemplo, mediante cualquier hibridoma responsable que se pueda formar según los métodos clásicos a partir de las células esplénicas de un animal, particularmente de un ratón o de una rata inmunizados contra el PIGF o cualquier derivado funcional de las mismas, y de células de una línea celular de mieloma, y que pueda ser seleccionado por la capacidad del hibridoma para producir los anticuerpos monoclonales que reconocen el PIGF o cualquier derivado funcional de los mismos que se haya usado inicialmente para la inmunización de los animales.

Según algunas realizaciones en particular, la preparación de los anticuerpos monoclonales contra el PIGF humano puede llevarse a cabo, por ejemplo, como sigue: se acopla una proteína de fusión PIGF recombinante humana, que consiste en los aminoácidos codificados por el PIGF o un fragmento del mismo, a una S-transferasa de glutatión (GST) y se expresa en *Escherichia coli* y se purifica mediante una cromatografía de afinidad sobre glutatión inmovilizado (Amersham Biosciences). El PIGF recombinante humano también puede obtenerse en R&D Systems Inc. 614 McKinley Place N. E. Minneapolis, MN 55413, EE.UU. (264-PG-010, 264-PG-010/CF, 264-PG-050 o 264-PG-050/CF), en Research Diagnostics Inc, Pleasant Hill Road, Flanders NJ 07836, EE.UU. (PIGF-1 recombinante humano: n° de cat. RDI-300-015 y n° de cat. RDI-300-016 y PIGF-2 recombinante humano: n° de cat. RDI-300-019) o en ALEXIS Corporation, CH-4415 Lausanne, Suiza (factor de crecimiento placentario 2 (humano) (recombinante)

nº de cat. RLT-300-020).

El PLGF recombinante humano se mezcla con una cantidad igual de un coadyuvante, y la mezcla obtenida se administra después subcutáneamente a ratones macho Balb/c (de 8 semanas de edad al comienzo de la inmunización) en una cantidad correspondiente a una cantidad de PIGF de 100 µg por 1 ratón (primovacunación).

Después de aproximadamente 21 días puede llevarse a cabo la inmunización mediante la administración subcutánea de la misma forma a la descrita anteriormente (inmunización de refuerzo). Después de 19 días o de 30 días de refuerzo, a los ratones se les puede administrar a través de la vena de la cola 200 µl de una preparación obtenida mediante la dilución de PIGF humano con PBS (solución salina fisiológica tamponada con fosfato) para tener una concentración de 250 µg/ml (inmunización final). A continuación deben extirparse los bazo de los ratones después de aproximadamente 3 días de la inmunización final, y deben ser separados en células individuales. Posteriormente, las células esplénicas deben ser lavadas con un medio apropiado, por ejemplo, con medio DMEM. Por otro lado, deben recogerse células de mieloma de ratón adecuadas (por ejemplo, Sp2/0-Ag14) en la fase de crecimiento logarítmica, y lavarse con un medio apropiado, por ejemplo, con medio DMEM. Las células del bazo y las células de mieloma de ratón deben mezclarse lo suficiente en un tubo de plástico en una proporción numérica de células de 10:1, seguido de la adición de polietilenglicol al 50 % (p/v) (PEG, por ejemplo, de Boehringer Mannheim, peso molecular medio: 4.000) para llevar a cabo la fusión celular a 37 °C durante 7 minutos. Después de retirar la solución sobrenadante (mediante una centrifugación), al residuo se le añade medio HAT (medio DMEM que contiene un 10 % de suero bovino fetal con hipoxantina, aminopterina y timidina añadidas). El residuo debe ser suspendido de forma que se obtenga una concentración de células de bazo de aproximadamente 5×10^6 células/ml. Después esta suspensión celular puede ser dispensada y vertida en placas de plástico de 96 pocillos de forma que cada pocillo contenga aproximadamente 100 µl de la suspensión, seguido de un cultivo a 37 °C en dióxido de carbono al 5 %. El medio HAT debe ser complementado; por ejemplo, en una cantidad de 50 µl/pocillo los días 2º y 5º. Después de eso, la mitad del volumen del medio debe cambiarse cada 3 o 4 días en conformidad con la proliferación de los hibridomas.

Los hibridomas, que producen el anticuerpo monoclonal de la presente invención, deben ser cribados para el mismo. Esto debe realizarse mediante el uso de, como índice, la actividad inhibidora del anticuerpo monoclonal sobre la actividad fisiológica poseída por el PIGF.

Los hibridomas que produjeron los anticuerpos monoclonales que muestran reactividad con el PIGF deben ser seleccionados a continuación a partir de los clones seleccionados. Los hibridomas obtenidos deben ser transferidos a continuación a un medio adecuado, por ejemplo, medio HT, que es el mismo que el medio HAT pero sin aminopterina, y cultivarse adicionalmente. La clonación puede llevarse a cabo dos veces según el método de dilución limitante, mediante el cual pueden obtenerse hibridomas estables.

La producción y la purificación de los anticuerpos monoclonales puede realizarse a continuación como sigue: puede inyectarse intraperitonealmente 2,6, 10, 14-tetrametilpentadecano (por ejemplo, Pristane, de Sigma, 0,5 ml) en ratones hembra Balb/c (de entre 6 y 8 semanas de edad desde el nacimiento). Después de entre 10 y 20 días, las células de los clones (1×10^6 y 10^7 células) pueden ser suspendidas en PBS e inoculadas intraperitonealmente en los ratones. Después de entre 7 y 10 días, los ratones pueden ser sacrificados y sometidos a una operación abdominal, a partir de la cual puede recogerse el líquido ascítico producido. El líquido ascítico puede ser centrifugado para eliminar las sustancias insolubles, y se recuperó un sobrenadante y se almacenó a 20 °C hasta su purificación. Consecuentemente, puede purificarse la IgG a partir del sobrenadante del líquido ascítico descrito anteriormente mediante el uso de un kit de purificación de anticuerpos Hi-Trap Protein-A (disponible en Pharmacia, Roosendaal, Países Bajos). A saber, al líquido ascítico (2 ml) puede añadirse Solución A (glicina 1,5 M, NaCl 3 M, pH 8,9, 8 ml) y filtrarse con un filtro para una filtración que tiene un tamaño de poro de 45 µm (Millipore). Después de eso, el filtrado obtenido puede aplicarse a una columna (volumen de la columna: 1 ml) cargada con Protein Sepharose HP (producida por Pharmacia) suficientemente equilibrada con la Solución A, y la columna debe lavarse con la Solución A en una cantidad de 10 veces el volumen de la columna. Posteriormente, puede eluir una fracción de IgG con la Solución B (glicina 1,5 M, pH 2,8) en una cantidad de 10 veces el volumen de la columna. La fracción de IgG eluída puede dializarse frente a PBS. Los anticuerpos monoclonales pueden ser determinados según sus subclases de IgG mediante el uso de los anticuerpos purificados obtenidos anteriormente, mediante un kit de determinación de subclase disponible comercialmente (nombre comercial: Mono Ab-ID EIA Kit A, producido por Zymed). Este método se basa en el método de ELISA.

Las actividades inhibidoras de los anticuerpos monoclonales pueden ensayarse para evaluar la inhibición completa de la unión del rPIGF a su receptor VEGFR1. Esto puede medirse, por ejemplo, mediante un ELISA inmunofuncional en el que se recubren placas de 96 pocillos con 100 µl de 1 µg/ml de quimera rmFlt-1/Fc durante una noche a la temperatura ambiente en PBS. Después de bloquear durante 1 hora con BSA al 1 % en PBS, se aplican después a la placa 100 µl de una mezcla de 70 µl de medio de hibridoma incubado previamente con 70 µl de mPIGF-2 recombinante a 10 ng/ml durante 2 horas a la temperatura ambiente. Puede incluirse un patrón de mPIGF-2 que varía entre 20 ng/ml y 156 pg/ml (diluido en PBS-Tween. BSA-EDTA). Después, las placas pueden incubarse 1 hora a 37 °C y 1 hora a la temperatura ambiente, lavarse 5 veces con PBS-Tween y pueden aplicarse 100 µl de PIGF-2 biotinilado de cabra anti-murino a 200 ng/ml durante 2 horas a la temperatura ambiente. Después de lavar 5 veces

con PBS-Tween, pueden aplicarse 100 µl de conjugado de avidina-HRP (kit Vectastorin ABC) durante 1 hora a la temperatura ambiente. Después de lavar 5 veces con PBS-Tween, puede revelarse la placa con 90 µl de o-fenilenodiamina en tampón de fosfato citrato a pH 5,0 durante 30 minutos y medirse a 490 nm.

5 En el presente documento también se proporcionan ligandos de anticuerpos inhibidores, que son capaces de unirse al PIGF. Más preferentemente, dicho ligando debería ser capaz de reconocer un epítipo específico localizado en el PIGF. Por ejemplo, la presente invención se refiere a ligandos del tipo mencionado anteriormente que derivan de un anticuerpo monoclonal producido con tal fin mediante una inmunización en animales. La presente invención también proporciona un fragmento de unión al antígeno Fab, o un derivado homólogo de dicho fragmento, que puede ser
10 obtenido mediante una digestión proteolítica de dicho anticuerpo monoclonal con papaína, mediante el uso de métodos bien conocidos en la materia. Con objeto de reducir la inmunogenicidad del anticuerpo monoclonal murino anti-PIGF, la presente invención también incluye la construcción de un anticuerpo quimérico, preferentemente en forma de un dominio variable de cadena única, que combina la región variable del anticuerpo de ratón con una región constante de un anticuerpo humano - un anticuerpo monoclonal denominado humanizado.

15 Los anticuerpos monoclonales producidos en animales pueden ser humanizados, por ejemplo, mediante la asociación de la región de unión determinante de complementariedad ("CDR") del anticuerpo monoclonal no humano con regiones en marco humanas - en particular, la región constante C del gen humano - tal como se divulga en Jones et al. (Jones et al., 1986) o en Riechmann (Riechmann et al., 1988), o hibridarse de otro modo.

20 Los anticuerpos monoclonales según estas realizaciones pueden ser versiones humanizadas de los anticuerpos monoclonales de ratón elaborados mediante la tecnología del ADN recombinante, partiendo de secuencias de ADN genómico de ratón y/o humano que codifican para las cadenas H y L o a partir de clones de ADNc que codifican para las cadenas H y L.

25 Alternativamente, los anticuerpos monoclonales según estas realizaciones pueden ser anticuerpos monoclonales humanos. Dichos anticuerpos monoclonales humanos se preparan, por ejemplo, mediante una repoblación con linfocitos de sangre periférica humana (PBL) de ratones con una inmunodeficiencia combinada grave (SCID) según se describe en el documento PCT/EP99/03605 o mediante el uso de animales transgénicos no humanos capaces de producir anticuerpos humanos según se describe en la Patente de US 5.545.806. También, los fragmentos derivados de estos anticuerpos monoclonales, tales como Fab, F(ab')₂ y scFv ("fragmento variable de cadena individual"), siempre que hayan conservado las propiedades de unión originales, forman parte de lo que se divulga en el presente documento. Dichos fragmentos se generan habitualmente, por ejemplo, mediante una digestión enzimática de los anticuerpos con papaína, pepsina u otras proteasas. Según algunas realizaciones en particular, el
30 inhibidor selectivo del PIGF es un fragmento de un anticuerpo, fragmento que se une específicamente al factor de crecimiento placentario. Según algunas realizaciones en particular, el fragmento de anticuerpo es un fragmento, un fragmento F(ab')₂ o un fragmento variable de cadena única (scFv).

35 Según algunas realizaciones específicas, la preparación de los fragmentos F(ab')₂ o Fab monovalente es, por ejemplo, como sigue: con objeto de preparar fragmentos F(ab')₂, puede dializarse el anticuerpo monoclonal durante una noche frente a tampón de citrato 0,1 mol/l (a pH 3,5). El anticuerpo (200 partes) es digerido después mediante una incubación con pepsina (1 parte) disponible en Sigma (Saint-Louis, Missouri) durante 1 hora a 37 °C. La digestión se detiene posteriormente mediante la adición de 1 volumen de un tampón de Tris HCl 1 M (a pH 9) por 10 volúmenes del anticuerpo. Los fragmentos Fab monovalentes pueden prepararse mediante una digestión con papaína como sigue: se añade 1 volumen de un tampón de fosfato 1 M (a pH 7,3) a 10 volúmenes del anticuerpo monoclonal, después se añade 1 volumen de papaína (Sigma) a 25 volúmenes del tampón de fosfato que contiene el anticuerpo monoclonal, 10 mmol/l de L-cisteína HCl (Sigma) y 15 mmol/l de ácido etilendiaminetetraacético (denominado en lo sucesivo EDTA). Después de una incubación durante 3 horas a 37 °C, la digestión se detiene mediante la adición de una concentración final de 30 mmol/l de una solución de yodoacetamida recién preparada
40 (Sigma), manteniendo la mezcla en la oscuridad a la temperatura ambiente durante 30 minutos. Ambos fragmentos F(ab')₂ y Fab pueden ser purificados adicionalmente de la IgG intacta contaminante y de fragmentos Fc mediante el uso de proteína-A-Sepharose. Los fragmentos purificados pueden dializarse finalmente frente a solución salina tamponada con fosfato (denominada en lo sucesivo en el presente documento PBS). La pureza de los fragmentos pueden ser determinada mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sulfato de sodio y la concentración de proteínas puede medirse mediante el uso del reactivo de ensayo de proteínas A ácido biconcónico (Pierce, Rockford, Illinois).

45 El experto en la materia sabe bien que los anticuerpos (monoclonales), o los fragmentos de los mismos, pueden modificarse para diversos usos. Los anticuerpos implicados en la invención pueden marcarse mediante un marcaje adecuado de tipo enzimático, fluorescente o radioactivo.

50 Algunos ejemplos de anticuerpos anti-PIGF están bien documentados en la materia. Incluyen, pero no se limitan a, el descrito por Fischer (Fischer et al., 2007), o el anticuerpo monoclonal murino Mab-PL5D11 (WO01/85796; este anticuerpo monoclonal está disponible en el VIB Vesalius Research Center, UZ Gasthuisberg, Herestraat 49, B-3000 Leuven). Otros anticuerpos, tales como el anticuerpo 16D3, se describen, por ejemplo, en el documento EP1869085. También, el documento WO2004/002524 describe cómo generar anticuerpos anti-PIGF. Además, los anticuerpos

anti-PIGF también están disponibles comercialmente, por ejemplo, en Santa Cruz Biotechnology Inc, Abeam, Novus biologicals, R&D systems, en Sigma-Aldrich y en muchas otras compañías.

5 Debe apreciarse que los métodos anteriores también se aplican para la generación de otros anticuerpos, por ejemplo, para la generación de anticuerpos anti-VEGFR-1, que son inhibidores no selectivos del PIGF.

10 Otros inhibidores del PIGF, particularmente inhibidores selectivamente del PIGF, incluyen, pero no se limitan a, péptidos, péptidos tetraméricos, proteínas, moléculas orgánicas o fragmentos u homólogos de los mismos que tienen el efecto neutralizante según se estableció anteriormente. Algunos inhibidores adicionales de esta lista no exhaustiva son moléculas de ARN y de ADN antisentido y ribozimas que funcionan inhibiendo la traducción del PIGF, aptámeros peptídicos (por ejemplo, ARNip (por ejemplo, Santa Cruz Biotechnology Inc), ARN en horquilla o ARNch (por ejemplo, Santa Cruz Biotechnology Inc), morfolinós, nanocuerpos y moléculas pequeñas. Muchos de dichos inhibidores (tanto selectivos como no selectivos) están disponibles en el mercado. Algunos de los posibles inhibidores se analizarán aquí adicionalmente. Las moléculas pequeñas, por ejemplo, pequeñas moléculas orgánicas y otros candidatos a fármacos, pueden obtenerse, por ejemplo, a partir de colecciones de productos combinatorias y naturales. Para el cribado de dichas moléculas candidatas/de ensayo, por ejemplo, pueden usarse líneas celulares que expresan el VEGFR-1 y controlarse la transducción de señales según se describe con detalle en el documento WO 01/85796.

20 Dicho control puede medirse mediante el uso de las técnicas bioquímicas habituales. También pueden controlarse otras respuestas, tales como la activación o la supresión de la actividad catalítica, la fosforilación (por ejemplo, la fosforilación de la tirosina del dominio intracelular del receptor) o la desfosforilación de otras proteínas, la activación o la modulación de la producción de segundos mensajeros, cambios en los niveles iónicos celulares, la asociación, la disociación o la translocación de moléculas de señalización o la transcripción o la traducción de genes
25 específicos. Estos ensayos pueden llevarse a cabo mediante el uso de técnicas convencionales desarrolladas para estos fines en el transcurso del cribado. La inhibición de la unión de un ligando a su receptor celular puede afectar, a través de las rutas de transducción de señales, a una diversidad de procesos celulares. Algunos procesos celulares bajo el control de la ruta de señalización del VEGFR-1/PIGF pueden incluir, pero no se limitan a, funciones celulares normales, proliferación, diferenciación, mantenimiento de la forma de la célula y adhesión, además de procesos
30 anormales o potencialmente perjudiciales tales como una proliferación celular no regulada, una pérdida de la inhibición por contacto, un bloqueo de la diferenciación o la muerte celular. La observación y la medición cualitativa o cuantitativa de cualquiera de los procesos celulares descritos mediante las técnicas conocidas en la materia puede usarse ventajosamente como un medio para la puntuación de la transducción de señales en el transcurso del
35 cribado.

Una forma alternativa de cribar moléculas pequeñas es a través de un diseño *in silico*. La estructura cristalina del factor de crecimiento placentario humano está disponible (código PDB: 1FZV), por lo que ésta también puede servir como una plataforma para cribados adicionales de antagonistas de molécula pequeña. Una molécula o una serie de moléculas inhibitoras pueden ser diseñadas basándose en la estructura del PIGF, tras lo cual pueden ser validadas mediante el uso de cribados como se ha descrito anteriormente.

45 Las colecciones de péptidos aleatorios, tales como las colecciones de péptidos tetraméricos descritas adicionalmente en el presente documento, que consisten en todas las posibles combinaciones de los aminoácidos unidos sobre un soporte en fase sólida, pueden usarse para la identificación de los péptidos que son capaces de unirse al sitio de unión del ligando de un receptor dado o de otros dominios funcionales de un receptor, tales como los dominios de cinasa (Lam et al., 1991). El cribado de las colecciones de péptidos puede tener un valor terapéutico en el descubrimiento de agentes farmacológicos que actúen inhibiendo la actividad biológica de los receptores a través de sus interacciones con el receptor dado. La identificación de moléculas que son capaces de unirse al PIGF (u opcionalmente al VEGFR-1) puede llevarse a cabo mediante el cribado de una colección de péptidos con una proteína PIGF recombinante (o una proteína VEGFR-1 soluble). Por ejemplo, los dominios de cinasa y del ligando extracelular del VEGFR-1 pueden ser expresados por separado y usarse para cribar colecciones de péptidos. Además de mediante el uso de moléculas solubles de VEGFR-1, en otra realización, es posible la detección de los péptidos que se unen a los receptores de la superficie celular mediante el uso de células intactas. Las células usadas en esta técnica pueden ser células vivas o células fijadas. Las células se incuban con la colección aleatoria de péptidos y se unirán a ciertos péptidos de la colección para formar una "roseta" entre las células objetivo y el pertinente soporte en fase sólida/péptido. La roseta puede aislarse a continuación mediante una centrifugación diferencial o eliminarse físicamente bajo un microscopio de disección.

60 En una realización específica pueden usarse formas mutantes transdominantes negativas de los receptores del VEGF (por ejemplo, un receptor transdominante negativo del VEGF-R1) para inhibir la transducción de señales del PIGF. El uso de dichas formas mutantes transdominantes negativas de los receptores del VEGF se describe completamente en la patente US 5.851.999. Además, se sabe que la tirosina quinasa placentaria soluble de tipo fms 1 (sFlt1), una variante de empalme del receptor VEGF Fit1 que carece de los dominios transmembranario y citoplasmático, actúa como un potente antagonista del PIGF (Kendall et al., 1996; Shibuya, 2001), y las proteínas de fusión VEGFR1 solubles (Aiello et al., 1995) pueden usarse *in vivo* para inhibir la actividad del PIGF. Sin embargo, aunque con éxito por derecho propio, el uso de receptores transdominantes negativos puede tener el inconveniente
65

de no ser inhibidores selectivos únicamente del PIGF. Por lo tanto, según algunas realizaciones específicas, el inhibidor del PIGF no es un receptor transdominante negativo.

El ARN tiene diversas ventajas sobre las moléculas orgánicas pequeñas cuando se considera su uso en la inactivación de la función de proteínas *in vivo*. Un ARN que codifica para una secuencia puede unirse a un promotor, y este gen artificial puede ser introducido en células o en organismos. Dependiendo de la secuencia reguladora incluida, esto proporciona una forma única de construir un gen supresor específico del tiempo y/o del tejido. Dichos genes que expresan el ARN son habitualmente más pequeños que los genes que codifican proteínas, y pueden ser insertados fácilmente en vectores de terapia génica. Al contrario que una proteína foránea o alterada, es menos probable que el ARN provoque una respuesta inmunitaria. Se han desarrollado moléculas antisentido y ribozimas como "bloqueantes de código" para inactivar la función génica, con su promesa de diseño racional de fármacos y una exquisita especificidad (Altman, 1995; Matteucci y Wagner, 1996). Mecánicamente, se espera que tanto los oligodesoxinucleótidos antisentido ("ODN") como las ribozimas biomodificadas consigan una unión específica en la primera etapa de su acción mediante la formación de un dúplex estable (o tríplex en algunos casos de los ODN) con una secuencia de nucleótidos objetivo basada en el apareamiento de bases de Watson-Crick o de Hoogsteen.

En ciertas realizaciones, un inhibidor del PIGF puede ser un aptámero. Los métodos para la construcción y la determinación de las características de unión de los aptámeros son bien conocidos en la materia. Por ejemplo, dichas técnicas se describen en las patentes de EE.UU. nº 5.582.981, 5.595.877 y 5.637.459.

Los aptámeros pueden prepararse mediante cualquier método conocido, incluyendo métodos sintéticos, recombinantes y de purificación, y puede usarse solos o junto con otros ligandos específicos para el mismo objetivo. En general, es necesario un mínimo de aproximadamente 3 nucleótidos, preferentemente de al menos 5 nucleótidos, para efectuar una unión específica. Los aptámeros con unas secuencias menores de 10 bases pueden ser viables, aunque pueden ser preferidos los aptámeros de 10, de 20, de 30 o de 40 nucleótidos.

Es necesario que los aptámeros contengan la secuencia que confiere la especificidad de unión, pero pueden ser extendidos con regiones flanqueantes o derivatizados de otro modo. En algunas realizaciones en particular, las secuencias de unión al PIGF de los aptámeros pueden estar flanqueadas por secuencias de unión al cebador, facilitando la amplificación de los aptámeros mediante una PCR u otras técnicas de amplificación. En una realización adicional, la secuencia flanqueante puede comprender una secuencia específica que reconoce o se une preferentemente a una fracción para mejorar la inmovilización del aptámero a un sustrato.

Los aptámeros pueden ser aislados, secuenciados y/o amplificados o sintetizados en forma de moléculas convencionales de ADN o de ARN. Alternativamente, los aptámeros de interés pueden comprender oligómeros modificados. Cualquiera de los grupos hidroxilo presentes habitualmente en los aptámeros puede ser sustituido por grupos fosfonato, por grupos fosfato, protegidos con un grupo protector estándar, o activados para preparar enlaces adicionales a otros nucleótidos, o pueden estar conjugados con soportes sólidos. Uno más de los enlaces fosfodiéster pueden ser sustituidos por grupos de unión alternativos, tal como P(O)O sustituido por P(O)S, P(O)NR₂, P(O)R, P(O)OR', CO o CNR₂, en los que R es H o alquilo (1-20 C) y R' es alquilo (1-20 C); además, este grupo puede estar unido a los nucleótidos adyacentes a través de O o de S. No es necesario que todos los enlaces de un oligómero sean idénticos. Los aptámeros usados como materiales de partida para la determinación de las secuencias de unión específicas pueden ser un ADN o un ARN mono o bicatenario. En una realización en particular, las secuencias son un ADN monocatenario, que es menos susceptible a una degradación por parte de una nucleasa que el ARN. Según algunas realizaciones en particular, el aptámero de partida contendrá una porción de secuencia aleatorizada, que generalmente incluye entre aproximadamente 10 y 400 nucleótidos, particularmente desde 20 hasta 100 nucleótidos. La secuencia aleatorizada está flanqueada por las secuencias de cebador que permiten la amplificación de los aptámeros que se van a unir al objetivo. Para la síntesis de las regiones aleatorizadas, pueden añadirse durante la síntesis mezclas de nucleótidos en las posiciones en las que se desea la aleatorización.

Los métodos para la preparación y el cribado de aptámeros que se unen a objetivos de interés en particular son bien conocidos, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. nº 5.475.096 y en la Patente de EE.UU. nº 5.270.163.

La técnica implica generalmente la selección a partir de una mezcla de aptámeros candidatos y unas repeticiones por etapas de la unión, la separación de los aptámeros unidos de los no unidos, y una amplificación. Debido a que únicamente existen en la mezcla un pequeño número de las secuencias (posiblemente una única molécula de aptámero) correspondientes a los aptámeros de mayor afinidad, generalmente es deseable establecer el criterio de partición, de forma que una cantidad significativa de los aptámeros de la mezcla (aproximadamente un 5-50 %) quede retenida durante la separación. Cada ciclo da como resultado un enriquecimiento en los aptámeros con una elevada afinidad por el objetivo. Puede usarse una repetición de entre tres y seis ciclos de selección y amplificación para generar aptámeros que se unen con una elevada afinidad y especificidad al objetivo, tal como el PIGF.

Según algunas realizaciones en particular, los aptámeros son aptámeros de ARN que interactúan específicamente con el PLGF, u opcionalmente con el VEGF-R1 o con otras sustancias que no son ácidos nucleicos de la ruta de señalización del VEGFR-1/PIGF. Éstos pueden usarse como reactivos terapéuticos. Los aptámeros de ARN se usan por su capacidad para desestabilizar directamente la función proteica. La selección de los aptámeros *in vitro* permite

un rápido aislamiento de ARN extremadamente raros que tienen una elevada especificidad y afinidad por proteínas específicas. Algunos ejemplos de aptámeros de ARN se describen en la Patente de EE.UU. nº 5.270.163 a favor de Gold et al., y en las publicaciones de Ellington y Szostak, 1990, y de Tuerk y Gold, 1990. Al contrario que los compuestos antisentido, cuyos objetivos son redes monodimensionales, los aptámeros de ARN pueden unirse a las superficies tridimensionales de una proteína. Además, los aptámeros de ARN frecuentemente pueden discriminar finamente entre los sitios funcionales individuales de una proteína (Gold et al., 1995). Como reactivos terapéuticos, los aptámeros no sólo presentan las ventajas combinadas de los anticuerpos y los fármacos con una masa molecular pequeña, sino que también puede controlarse genéticamente la producción *in vivo* de los aptámeros de ARN. La expresión controlada de los aptámeros de ARN de alta afinidad ofrece un medio para inactivar rápidamente dominios específicos de proteínas, y evaluar así su función y su mecanismo de acción.

Toole et al., en la Patente de EE.UU. nº 5.840.867 y Grossman et al., en la Patente de EE.UU. nº 6.207.388, divulgan métodos para la elaboración de aptámeros y aptámeros que se unen a biomoléculas. Estos aptámeros pueden usarse para interferir en la función biológica normal de las biomoléculas, como una herramienta de separación, o diagnóstica o terapéutica. Los aptámeros descritos por Toole et al. pueden ser de ARN o de ADN de cadena individual o dúplex.

Korth et al. (Korth et al., 1997) han aplicado aptámeros de ARN monocatenarios dirigidos contra la proteína priónica de hámster dorado sirio, y los aptámeros eran capaces de reconocer su objetivo específico en una mezcla de cientos de proteínas diferentes. Davis (1994) describió un aptámero de ADN monocatenario que se une al sitio activo de la trombina y muestra unos efectos anticoagulantes *in vivo*.

Rajendran, Manjula et al. (documento US20020127581) proporcionan métodos para la selección *in vitro* de aptámeros de señalización que comprenden las etapas de sintetizar un conjunto de ADN, teniendo el ADN un inserto aleatorio de nucleótidos con una proporción molar sesgada específica; la amplificación del conjunto de ADN; la transcripción de un conjunto de ARN a partir del ADN amplificado mediante el uso de un nucleótidos marcados fluorescentemente; la aplicación del conjunto de ARN marcado fluorescentemente a una columna de afinidad para eliminar las moléculas de ARN fluorescentes de alta afinidad del grupo de ARN marcado fluorescentemente; la obtención de un conjunto de ADNc a partir de las moléculas de ARN fluorescente de alta afinidad; la repetición de las etapas de amplificación y de selección con las moléculas de ARN fluorescentes y la clonación de las moléculas de ARN fluorescentes para producir aptámeros de señalización. También se seleccionan los aptámeros de señalización que comprenden las moléculas de ADN.

En el presente documento también se proporciona un aptámero de señalización que transduce el cambio conformacional tras la unión de un ligando en un cambio en la intensidad de la fluorescencia del aptámero de señalización.

Por lo tanto pueden diseñarse aptámeros para que interactúen específicamente con sustancias que no son ácidos nucleicos, tales como el PIGF o el VEGFR1. Los aptámeros pueden funcionar como receptores de alta afinidad para el PIGF o pueden interactuar fuertemente con el PIGF (u opcionalmente con el VEGFR1). El plegado de una molécula inicialmente desestructurada alrededor del PLGF o del VEGFR1 y la formación de una red de puentes de hidrógeno con el PLGF o el VEGFR1, facilitan este enlace de neutralización.

Sin embargo, los aptámeros también pueden ser catalíticos. Los aptámeros que son catalíticos se consideran aproximadamente ribozimas o aptazimas. Los aptámeros también pueden ser diseñados para que interactúen específicamente con sustancias que son ácidos nucleicos, en lugar de simplemente unirse a ellos sobre la base de un apareamiento de bases de Watson-Crick entre las bases de las secuencias de ácidos nucleicos con una orientación opuesta.

Dichos aptámeros, si son catalíticos, pueden denominarse razonablemente aptazimas. Dicha acción específica puede ser buscada con fines terapéuticos.

La producción de aptámeros basados en ARN de 2'-fluoropirimidina en forma del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF165) de 165 aminoácidos, una proteína con una homología en la secuencia del 53 % con el PIGF, ha sido descrita con detalle por Ruckman et al., 1998 y Bridonneau et al., 1999. Mediante el uso del proceso SELEX (descrito anteriormente, patente US de Gold et al.) se aislaron ligandos oligonucleotídicos de ARN de 2'-F-pirimidina (aptámeros) del VEGF165 humano. Estos aptámeros también se unen a los heterodímeros del VEGF165 y del PIGF123, y probablemente también a isoformas mayores, tales como la isoforma PIGF152. Se truncaron aptámeros representativos de tres familias de secuencias distintas hasta la secuencia mínima capaz de unirse con alta afinidad al VEGF (23-29 nucleótidos) y fueron adicionalmente modificados mediante la sustitución del 2'-O-metilo por 2'-OH en todas las posiciones de ribopurina en las que se toleraba la sustitución. Este protocolo puede ser usado por un experto en la materia para elaborar aptámeros anti-PIGF neutralizantes. Un aptámero del VEGF (Macugen®, pegaptanib sódico) también es el primer aptámero terapéutico en ser administrado a seres humanos, y actualmente está siendo comercializado para pacientes con degeneración macular relacionada con la edad.

También en el ámbito de los inhibidores según se describe en el presente documento están las secuencias de oligorribonucleótidos, que incluyen moléculas de ARN catalizadoras, tales como ribozimas, que funcionan inhibiendo la traducción del ARNm del VEGFR-1 o del ARNm del PIGF.

- 5 Se conocen varias moléculas de ARN que son activas como catalizadores y que no sirven simplemente como un medio mediante el cual se mueve la información fuera del núcleo.

Las ribozimas son moléculas de ARN enzimáticas capaces de catalizar la escisión específica del ARN. El mecanismo de acción de la ribozima implica una hibridación específica de secuencia de la molécula de la ribozima con un ARN complementario objetivo, seguido de una escisión endonucleolítica. Se entiende que la actividad de autoescisión o de escisión de otros ARN de las ribozimas depende de la estructura secundaria del ARN, que puede depender de factores tales como la secuencia de bases y la inclusión de ubicaciones metálicas. Las ribozimas tienen una gran utilidad en el control artificial de la expresión génica. Pueden aprovecharse los patrones de carga muy específicos de los ácidos nucleicos, de sus bases y esqueletos, y la capacidad del ADN de formar una estructura secundaria predecible, basada en la secuencia de bases y el apareamiento de bases de Watson-Crick predecible. El tamaño pequeño y la naturaleza flexible del ácido nucleico lo hace apropiado para la construcción de complejos capaces de reconocer y unirse específicamente a características de otras sustancias, tales como proteínas. A través de un cribado guiado por SELEX (patente de EE.UU. nº 5.567.588 a favor de Gold et al.), que depende de la unión a ácidos nucleicos monocatenarios montados sobre biochips, los investigadores han descubierto ribozimas que son 100 o incluso 1.000 veces más activas catalíticamente. Fernández et al. (2001) notifican los datos recogidos a partir de un único cambio conformacional en la molécula de una ribozima. Fernández et al. también informan de que dichas estructuras de ácidos nucleicos esencialmente dúplex experimentan unas transiciones discretas de "todo o nada" en su conformación, no la unión por parejas progresiva que se esperaría.

- 25 Un ARN circular que tiene la actividad enzimática para escindir una molécula individual de ARN en un sitio de escisión, y moléculas de ARN capaces de conferir estabilidad al ARN *in vivo* a través de una proteína de unión a una ribozima endógena, se describen en la Patente de EE.UU. nº 5.712.128 de Been et al., y en la Patente de EE.UU. nº 5.985.620 de Sioud.

30 Los sitios de escisión específicos de las ribozimas de cualquier potencial ARN objetivo son inicialmente identificados variando la molécula objetivo en busca de los sitios de escisión de la ribozima, que incluyen las siguientes secuencias, GUA, GUU y GUC. Una vez identificadas, pueden evaluarse las características estructurales predichas de las secuencias de ARN corto de entre 15 y 20 ribonucleótidos correspondientes a la región del gen objetivo que contiene el sitio de escisión, tales como la estructura secundaria que podría hacer que la secuencia de oligonucleótidos fuera inadecuada. La idoneidad de los agentes candidatos también puede ser evaluada mediante el ensayo de su accesibilidad a la hibridación con oligonucleótidos complementarios, mediante el uso de ensayos de protección con ribonucleasa.

Otra forma de proporcionar inhibición es el uso de moléculas de ribozima modificadas con un motivo en cabeza de martillo que catalizan específicamente y de forma eficaz la escisión endonucleolítica del PIGF (u opcionalmente del VEGFR-1) de las secuencias de ARN para el tratamiento de la leucemia positiva para el cromosoma Filadelfia en un sujeto, preferentemente en un mamífero, y aún más preferentemente en un ser humano. Una ribozima anti-VEGFR-1, tal como la angiozima, que ha sido desarrollada contra el ARNm del VEGFR-1 por Ribozyme Pharmaceuticals Inc, Boulder, Colorado 80301, EE.UU., ya se ha usado en una terapia contra el cáncer (Weng y Usman, 2001; Pavco et al., 2000). Esta angiozima, entre otras moléculas de ARN catalíticas anti-VEGFR-1, pueden usarse para la inhibición de la actividad del receptor PIGF, que regula por disminución la función del receptor PIGF mediante la escisión específica de los ARNm de los receptores del PIGF primarios, el VEGFR-1. Actualmente se están llevando a cabo ensayos clínicos de una ribozima anti-VEGFR-1 para el cáncer de mama.

50 Otros inhibidores contemplados en el presente documento son secuencias de oligorribonucleótidos, que incluyen moléculas de ARN y de ADN antisentido y constructos de ARNi que son homólogos con una parte de la secuencia del ARNm del gen del PIGF o del ARNm de su receptor, el VEGFR-1. ARN interferente o "ARNi" es un término acuñado inicialmente por Fire y colaboradores para describir la observación de que el ARN bicatenario (ARNbc) puede bloquear la expresión génica (Fire et al., 1998). El ARNbc dirige un silenciamiento post-transcripcional específico de gen en muchos organismos, incluyendo vertebrados, y ha proporcionado una nueva herramienta para el estudio de la función génica. El ARNi implica la degradación del ARNm. El PIGF puede ser silenciado mediante un método de silenciamiento post-transcripcional selectivo de la expresión del PIGF en una célula de interés que comprende la introducción en dicha célula de un constructo de ARNi que es homólogo con una parte de la secuencia del ARNm de dicho gen del PIGF. La presente invención proporciona un método para el tratamiento de la leucemia Ph+ en un sujeto mediante el silenciamiento génico post-transcripcional mediante la expresión de un ARN interferente (ARNi) del PIGF en células y/o mediante la expresión de un ARN interferente (ARNi) del VEGFR-1 en células. Este es un método con una significación particular *in vivo* en un paciente humano. Asimismo, se contempla el uso de un ARNi del PIGF para el tratamiento de la leucemia Ph+.

- 65 El ARNbc usado para iniciar el ARNi puede aislarse a partir de una fuente natural o producirse mediante un medio conocido, por ejemplo, transcrito a partir de un ADN. Por ejemplo, la unión de una polimerasa de ARN a un promotor

(lo que significa cualquier secuencia de ADN bicatenario que comprende un sitio de unión reconocido por una polimerasa de ARN dependiente de ADN) permite el inicio de la transcripción. Pueden usarse muchas secuencias promotoras conocidas para producir el ARNbc, por ejemplo, pero no se limitan a, las secuencias reconocidas por las polimerasas de ARN de los fagos T7, T3 o SP6. Sin embargo, esto no representa una limitación porque la persona experta apreciará claramente que puede usarse cualquier secuencia promotora identificada como tal, y para la cual hay disponible la correspondiente polimerasa de ARN. Alternativamente, las dos hebras del ADN usado para formar el ARNbc pueden pertenecer al mismo dúplex o a dos dúplex diferentes en los que cada uno se forma con una hebra de ADN con una secuencia al menos parcialmente complementaria. Cuando el ARNbc es así producido, la secuencia de ADN que se va a transcribir está flanqueada por dos promotores, uno que controla la transcripción de una de las hebras y otro la de la hebra complementaria. Estos dos promotores pueden ser idénticos o diferentes. De hecho, según la patente de EE.UU. nº 5.795.715, se proporciona un dúplex de ADN con una secuencia promotora en cada extremo que puede generar directamente un ARN con una longitud definida, y que puede unirse por parejas para formar un ARNbc.

El ARNbc, tanto de origen sintético como natural, es sometido a una rápida degradación por las nucleasas presentes en los sueros de diversas especies animales, particularmente de los primates. Consecuentemente, los procedimientos que implican un ARNbc generalmente utilizan en todo el proceso material de vidrio cocido, y todos los tampones se filtran, por ejemplo, a través de un filtro Nalgene de 45 micrómetros, para esterilizarlos. Debe usarse agua bidestilada exenta de pirógenos en todas las soluciones para minimizar cualquier posibilidad de contaminación por endotoxinas.

La concentración de la solución de ARNbc puede ser determinada a partir de su espectro UV. Por ejemplo, la concentración molar de un ARNbc natural o sintético se determina a partir de la densidad óptica (DO) a 260 nm mediante el uso de un coeficiente de extinción, obtenible a partir de la bibliografía o determinado mediante el uso de los procedimientos habituales: 44,7 veces la DO₂₆₀ = microgramos ARNbc/ml.

Si fuera apropiado, la solución del ARNbc puede diluirse con un tampón exento de pirógenos para facilitar su manipulación. El ARNbc resultante puede unirse opcionalmente a un soporte; o a un ligando, tal como biotina, que puede unirse a un soporte recubierto con avidina. Esto permite una cuantificación directa cuando se utiliza como una herramienta analítica.

Según una realización en particular, las composiciones de ARNbc de la presente invención se preparan en forma de una composición farmacéutica para el tratamiento de sujetos, particularmente para el tratamiento de pacientes humanos. Más particularmente, las composiciones farmacéuticas se administran para el tratamiento de la leucemia positiva para el cromosoma Filadelfia en pacientes humanos. En algunas realizaciones alternativas, las composiciones se usan para crear modelos de organismos funcionales "inactivados", aquellos en los que un gen objetivo es defectuoso, o en este caso, tiene su expresión inhibida. La composición farmacéutica del ARNbc puede ser administrada localmente a dicho paciente. Las composiciones farmacéuticas de ARNbc de la presente invención contienen preferentemente un portador o un excipiente farmacéuticamente aceptable adecuado para hacer que el compuesto o la mezcla sea administrable, por ejemplo, por vía parenteral, intravenosa, intradérmica, intramuscular o subcutánea, o transdérmica. Los principios activos pueden mezclarse o combinarse con cualquier portador o excipiente convencional farmacéuticamente aceptable.

Los ARNip seleccionados para el silenciamiento del gen del VEGFR1 con una elevada probabilidad de funcionalidad y una inactivación de más del 90 % del ARNm están disponibles en Dharmacon Inc. Lafayette, CO 80026, Estados Unidos. Un conjunto de varios dúplex de ARNip diferentes, dirigidos todos contra un gen objetivo, denominado SMARTpooling/SMARTselection, se usa como una tecnología eficaz para el silenciamiento del gen del VEGFR1 y/o del gen del PIGF. Los ARNip contra el PIGF también están disponibles comercialmente (por ejemplo, Santa Cruz Biotechnology Inc.).

Las moléculas antisentido de ARN y de ADN actúan directamente bloqueando la traducción del ARNm mediante su unión a un ARNm objetivo y evitando la traducción de la proteína. Con respecto al ADN antisentido, se contemplan particularmente los oligodesoxirribonucleótidos derivados del sitio de inicio de la traducción, por ejemplo, entre las regiones -10 y +10 de la secuencia de nucleótidos del VEGFR-1 o del PIGF. Por ejemplo, ya se ha conseguido la regulación por disminución de otro receptor de tirosina quinasa, el receptor VEGFR2, conseguida mediante una transfección con un oligonucleótido antisentido VEGFR2, mediante una tecnología antisentido estándar (Berard et al., 1997). Además, se ha demostrado que los oligonucleótidos antisentido (AS) dirigidos contra el receptor del PIGF, el VEGFR1, bloquean *in vivo* la angiogénesis (Marchand et al., 2002). Además, ya ha sido demostrada la inhibición antisentido de la producción de la proteína PIGF por Yonekura et al. (1999).

Ambas moléculas antisentido de ARN y de ADN, así como las ribozimas, pueden ser preparadas mediante cualquier método conocido en la materia para la síntesis de moléculas de ARN (o de ADN). Estos incluyen técnicas para la síntesis química de oligodesoxirribonucleótidos bien conocidas en la materia, tales como, por ejemplo, una síntesis química con fosoramidito en fase sólida. Alternativamente, pueden generarse moléculas de ARN mediante una transcripción *in vitro* e *in vivo* de secuencias de ADN que codifican para la molécula de ARN antisentido. Dichas secuencias de ADN pueden ser incorporadas en una gran diversidad de vectores, que incorporan los adecuados

promotores de la polimerasa de ARN, tales como los promotores de polimerasa T7 o SP6. Alternativamente, los constructos de ADNc antisentido que sintetizan un ARN antisentido constitutivamente o de una forma inducible, dependiendo del promotor usado, pueden ser introducidos de forma estable en líneas celulares.

5 En una realización específica estará claro que el método terapéutico de la presente invención para el tratamiento de la leucemia positiva para el cromosoma Filadelfia también puede usarse junto con cualquier otra terapia conocida en la materia para el tratamiento de la leucemia Ph+. Particularmente, se contemplan terapias que incluyen inhibidores de la proteína tirosina quinasa, particularmente inhibidores de la BCR/ABL, por ejemplo, imatinib y similares.

10 El término 'medicamento' según se usa en la solicitud se refiere a una composición que comprende moléculas (inhibidores) como se ha descrito anteriormente y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable (ambos términos pueden usarse de forma intercambiable) para el tratamiento de enfermedades según se ha indicado anteriormente. Algunos portadores o excipientes adecuados conocidos por el artesano experto son solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa, solución de Hank, aceites fijos, oleato de etilo, dextrosa al 5 % en solución salina, sustancias que mejoran la isotonicidad y la estabilidad química, tampones y conservantes. Otros portadores adecuados incluyen cualquier portador que por sí mismo no induzca la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición, tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos y copolímeros de aminoácidos. El 'medicamento' puede ser administrado mediante cualquier método adecuado conocido por el artesano experto. La vía de administración preferida es la parenteral.

20 En la administración parenteral, el medicamento de esta invención se formulará en forma de una dosis unitaria inyectable, tal como una solución, una suspensión o una emulsión, en asociación con los excipientes farmacéuticamente aceptables como se ha definido anteriormente. Sin embargo, la dosis y modo de administración dependerán del individuo. Generalmente, el medicamento se administra de forma que el inhibidor del PIGF (por ejemplo, una proteína, un polipéptido, un péptido, un ácido nucleico, un compuesto o una molécula) se administra a una dosis de entre 1 µg/kg y 10 mg/kg, más particularmente de entre 10 µg/kg y 5 mg/kg, lo más particularmente de entre 0,1 y 2 mg/kg. Preferiblemente, se administra en forma de una dosis en bolo. También puede usarse una infusión continua, e incluye una administración subcutánea continua a través de una minibomba osmótica. Si es así, el medicamento puede infundirse a una dosis de entre 5 y 20 µg/kg/minuto, más particularmente de entre 7 y 15 µg/kg/minuto.

25 Según se usa en el presente documento, el término "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, agentes retardantes de la absorción, y similares. El uso de dichos medios y agentes para las sustancias farmacéuticas activas es bien conocido en la materia. Excepto cuando cualquier medio o agente convencional sea incompatible con las composiciones de esta invención, se contempla su uso en la formulación terapéutica. También pueden incorporarse principios activos complementarios en las formulaciones farmacéuticas.

35 Los expertos en la materia comprenderán que puede emplearse cualquier modo de administración, vehículo o portador empleado convencionalmente y que sea inerte con respecto al agente activo, para la preparación y la administración de las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Algunos ejemplos ilustrativos de dichos métodos, vehículos y portadores son los descritos, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 4^a ed. (1970). Los expertos en la materia, conocedores de los principios de la invención, no tendrán dificultades para determinar los vehículos, excipientes y portadores adecuados o apropiados, ni en la combinación de los principios activos con los mismos para la formar las composiciones farmacéuticas de la invención.

40 La cantidad terapéuticamente eficaz del agente activo que se va a incluir en la composición farmacéutica de la invención depende en cada caso de varios factores, por ejemplo, el tipo, el tamaño y el estado del paciente que se va a tratar, el modo de administración previsto, la capacidad del paciente para incorporar la forma de dosificación prevista, etc. Generalmente, se incluye una cantidad de agente activo en cada forma de dosificación para proporcionar desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 250 mg/kg, y particularmente desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 100 mg/kg. Una 'cantidad terapéutica' o una cantidad terapéuticamente eficaz según se usa en el presente documento es una cantidad que mejora uno o más síntomas de una enfermedad. Dicha cantidad dependerá normalmente del inhibidor y de la gravedad de la enfermedad, pero puede ser decidida por la persona experta, posiblemente a través de una experimentación rutinaria.

45 Otro aspecto de la administración del tratamiento es el uso de la terapia génica para administrar el gen antisentido mencionado anteriormente o partes funcionales del gen del PIGF o una ribozima dirigida contra el ARNm del PIGF o una parte funcional del mismo. La terapia génica significa el tratamiento mediante la administración de ácidos nucleicos terapéuticos a las células de un paciente. Esto se revisa ampliamente en Lever y Goodfellow 1995; en Br. Med Bull., 51, 1-242; en Culver et al., 1995; en Led ley, 1995. Para conseguir una terapia génica debe existir un método de administración de genes a las células del paciente y métodos adicionales para asegurar la producción eficaz de cualquier gen terapéutico.

60 Los protocolos de la terapia génica, destinados a conseguir la expresión del producto de un gen terapéutico en las células objetivo, *in vitro*, pero también particularmente *in vivo*, han sido ampliamente descritos en la materia. Éstos

incluyen, pero no se limitan a, una inyección intramuscular de un ADN de plásmido (desnudo o en liposomas), una inyección intersticial, una instilación en las vías aéreas, una aplicación en el endotelio, en el parénquima intrahepático, y una administración intravenosa o intraarterial (por ejemplo, en la arteria intrahepática, en la vena intrahepática). Se han empleado diversos dispositivos para mejorar la disponibilidad del ADN en la célula objetivo.

Una metodología simple es poner en contacto físicamente la célula objetivo con catéteres o materiales implantables que contienen el ADN. Otra metodología es la utilización de dispositivos de inyección a chorro sin agujas que proyectan una columna de líquido directamente en el tejido objetivo a alta presión. Estos paradigmas de administración también pueden usarse para la administración de vectores víricos. Otra metodología de la terapia génica dirigida es el uso de conjugados moleculares que consisten en ligandos proteicos o sintéticos a los que se ha unido un agente de unión al ácido nucleico o al ADN, para que los ácidos nucleicos se dirijan específicamente a las células (Cristiano et al., 1993). Las células objetivo dependerán normalmente de los síntomas que es necesario tratar, y pueden ser seleccionadas por la persona experta (por ejemplo, células de médula ósea o células estromales para el tratamiento de la leucemia).

Los vectores de terapia génica deben expresar una cantidad terapéutica del inhibidor del PIGF. Según algunas realizaciones en particular, los vectores de terapia génica descritos en esta solicitud dirigen la expresión de una cantidad terapéutica del producto génico durante un periodo prolongado. De hecho, siempre que se consigan unos niveles terapéuticos, no es necesario un nuevo tratamiento. Normalmente, se contempla que la expresión terapéutica dure al menos 20 días, al menos 50 días, al menos 100 días, al menos 200 días, y en algunos casos, 300 días o más. La expresión del producto génico (por ejemplo, un polipéptido, un ARNi, etc.) codificado por la secuencia codificante puede medirse mediante cualquier medio reconocido en la técnica, tal como un ensayo basado en anticuerpos, por ejemplo, una inmunotransferencia Western o un ensayo de ELISA, por ejemplo, para evaluar si se ha conseguido la expresión terapéutica del producto génico. La expresión del producto génico también puede medirse en un bioensayo que detecta una actividad enzimática o biológica del producto génico.

Los vectores de terapia génica pueden ser vectores episomales (es decir, que no se integran en el genoma de una célula hospedadora), o pueden ser vectores que se integran en el genoma de la célula hospedadora. Algunos ejemplos de vectores episomales incluyen plásmidos (extracromosómicos) y los denominados minicírculos, que están formados únicamente por un casete de expresión y están desprovistos de las secuencias bacterianas, y algunos ejemplos de vectores que se integran en el genoma de la célula hospedadora incluyen los vectores víricos.

Algunos vectores de plásmidos representativos incluyen los vectores pUC, los vectores bluescript (pBS) y pBR322 o los derivados de los mismos que están desprovistos de las secuencias bacterianas (minicírculos). Algunos de los vectores de plásmidos pueden ser adaptados para que incorporen elementos que mejoren la persistencia del plásmido episomal en las células transfectadas. Dichas secuencias incluyen S/MAR que se corresponden con los módulos de la región unida al esqueleto/matriz unidos a una unidad de transcripción (Jenke et al., 2004; Manzini et al., 2006).

Algunos vectores víricos representativos incluyen vectores derivados de virus adenoasociados, de adenovirus, de retrovirus y de lentivirus. Alternativamente, los sistemas de administración génica pueden usarse para combinar componentes víricos y no víricos, tales como nanopartículas o virosomas (Yamada et al., 2003).

Los retrovirus y los lentivirus son virus de ARN que tienen la capacidad de insertar sus genes en los cromosomas de la célula hospedadora después de la infección. Se han desarrollado vectores retrovíricos y lentivíricos que carecen de los genes que codifican para las proteínas víricas, pero que conservan la capacidad de infectar células y de insertar sus genes en los cromosomas de la célula objetivo (Miller, 1990; Naldini et al., 1996). La diferencia entre un vector lentivírico y uno retrovírico clásico basado en el virus de la leucemia murina de Moloney (MLV) es que los vectores lentivíricos pueden transducir tanto células en división como las que no se están dividiendo, mientras que los vectores retrovíricos basados en el MLV sólo pueden transducir células en división.

Los vectores adenovíricos están diseñados para ser administrados directamente a un sujeto vivo. Al contrario que los vectores retrovíricos, la mayor parte de los genomas de los vectores adenovíricos no se integran en el cromosoma de la célula hospedadora. En su lugar, los genes introducidos en las células mediante el uso de vectores adenovíricos se mantienen en el núcleo en forma de un elemento extracromosómico (episoma) que persiste durante un periodo de tiempo prolongado. Los vectores adenovíricos transducirán células en división y que no se están dividiendo en muchos tejidos diferentes *in vivo*, incluyendo las células epiteliales de las vías respiratorias, las células endoteliales, los hepatocitos y diversos tumores (Trapnell, 1993).

Un virus adenoasociado (AAV) es un pequeño virus de ADNmc que infecta seres humanos y algunas otras especies de primates, no son conocidos por provocar enfermedades y consecuentemente sólo provocan una respuesta inmunitaria muy leve. Un AAV puede infectar tanto células en división como las que no se están dividiendo y puede incorporar su genoma en el de la célula hospedadora. Estas características hacen que un AAV sea un candidato muy atractivo para la creación de vectores víricos para la terapia génica, aunque la capacidad de clonación del vector es relativamente limitada.

Otro vector vírico deriva del virus del herpes simple, un gran virus de ADN bicatenario. Las formas recombinantes del virus de la variolovacuna, otro virus de ADNbc, puede acomodar insertos grandes y ser generado mediante una recombinación homóloga.

5 Los inhibidores recogidos en el presente documento pueden usarse para el tratamiento de la leucemia positiva para el cromosoma Filadelfia (Ph+ o BCR-ABL+), o usarse para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la leucemia Ph+ (BCR-ABL+). Los métodos para el tratamiento de la leucemia Ph+/BCR-ABL+ implicarán normalmente la administración de dicho inhibidor del PIGF a un sujeto en necesidad del mismo, lo más particularmente a un sujeto humano. Un subconjunto particular de leucemias Ph+ son las leucemias mielógenas crónicas (LMC). Por lo tanto, según algunas realizaciones en particular, los usos y los métodos descritos en la solicitud son para el tratamiento de la LMC. Otra categoría importante de leucemias Ph+ es un grupo de leucemias linfocíticas agudas (LLA), caracterizadas también por la presencia del cromosoma Filadelfia. Esta categoría tiene normalmente un mal pronóstico, ya que muchos de los tratamientos habituales fracasan en los casos de LLA Ph+. Según una realización en particular, las otras leucemias en las que está presente el cromosoma Filadelfia (o la proteína de fusión BCR-ABL) también pueden ser adecuadas para los usos y los métodos descritos en el presente documento. Sin embargo, estos casos son menos habituales que la LMC o la LLA. No obstante, se han notificado algunos casos de AML Ph+ (leucemia mieloide aguda), y también se contempla que dichos casos de leucemia Ph+ se beneficien de los usos y los métodos proporcionados en la solicitud.

20 Es importante darse cuenta de que las leucemias son unas enfermedades devastadoras, a menudo con un mal pronóstico para el paciente. Por lo tanto, es importante que seamos capaces de ofrecer estrategias de tratamiento alternativas o estrategias de combinación si falla una metodología de tratamiento. Es un objetivo de la presente solicitud proporcionar un beneficio terapéutico, en particular también para los pacientes que no se benefician de otro régimen terapéutico.

25 El tratamiento habitual de las leucemias positivas para el cromosoma Filadelfia, en particular de la LMC, es el uso de un inhibidor de la BCR-ABL o de un inhibidor de la tirosina quinasa. El mejor ejemplo conocido de este tipo de fármacos es el imatinib, pero existen otros muchos ejemplos, tales como nilotinib (AMN107), dasatinib (BMS354825), AT9283 (Astex therapeutics), SGX393 (Eli Lilly), INNo-406 (Innovive Pharmaceuticals), bosutinib (SKI606) y MK0457 (Merck).

35 Sin embargo, varios informes indican que la resistencia a estas medicinas es un problema habitual. De hecho, las células leucémicas persisten incluso en los pacientes tratados con éxito, y algunos pacientes desarrollan resistencia y finalmente una recaída (Swords et al., 2007; Buchert, 2007; Li y Li, 2007; Kujawski y Talpaz, 2007). Según algunas realizaciones en particular, los inhibidores del PIGF se usan para el tratamiento de las leucemias Ph+ que no pueden ser tratadas con un inhibidor de la BCR-ABL, y/o en algunos casos más particulares, que no pueden ser tratadas sólo con un inhibidor de la BCR-ABL. Las leucemias positivas para el cromosoma Filadelfia pueden no ser tratables con un inhibidor de la BCR-ABL (o sólo con un inhibidor de la BCR-ABL) por diversas razones, siendo las dos más habituales la insensibilidad de las células malignas al inhibidor de la BCR-ABL y que la medicina no es tolerada por el paciente.

40 La insensibilidad de las células leucémicas al inhibidor de la BCR-ABL puede ser debida a varios mecanismos (Shah y Sawyers, 2003), y puede aparecer desde el comienzo (es decir, una insensibilidad al primer tratamiento) o la resistencia puede ser adquirida (por ejemplo, en pacientes que muestran una recaída o en pacientes que han desarrollado una leucemia adicional, por ejemplo, en una etapa de crisis blástica).

45 También se sabe que los inhibidores de la BCR-ABL han provocado efectos secundarios adversos en algunos pacientes, que pueden dar lugar a que el medicamento ya no sea adecuado para esos pacientes en particular. Una reacción alérgica en un paciente también puede dar lugar a una intolerancia a la medicina.

50 Según algunas realizaciones específicas, los inhibidores del PIGF se usan para el tratamiento de las leucemias Ph+ que son resistentes (al menos parcialmente) al tratamiento con un inhibidor de la BCR-ABL. Las leucemias que son (parcialmente) resistentes a un inhibidor de la BCR-ABL pueden definirse como las leucemias en las que las células leucémicas que están presentes tienen una respuesta reducida al inhibidor de la BCR-ABL. La cantidad de células que tienen una respuesta reducida es indicativa del grado de resistencia al Inhibidor de la BCR-ABL. Normalmente, aunque no necesariamente, una resistencia (parcial) a un inhibidor de la BCR-ABL es un fenómeno adquirido. Según algunas realizaciones específicas adicionales, los inhibidores del PIGF se usan para el tratamiento de las leucemias de Ph+ resistentes al imatinib. Algunos ejemplos no limitantes de dichas leucemias incluyen LMC Ph+ resistente al imatinib, LLA Ph+ resistente al imatinib, por ejemplo, T-LLA Ph+ resistente al imatinib, B-LLA Ph+ resistente al imatinib.

60 A veces, aunque probablemente no en todos los casos, la resistencia a los inhibidores de la BCR-ABL, en particular la resistencia al imatinib, está asociada con mutaciones en el gen de la BCR-ABL, en particular en el dominio de la tirosina quinasa. La mutación T315I es el ejemplo mejor conocido de la misma. Otros ejemplos incluyen las mutaciones E255K, E255V, Y253H, H396P, F317L, M351T, G250E, F311 I, M244V, F359V, L387M, H396R, Q252H, Y253F, Q252R y E355G (Shah y Sawyers, 2003). Corbin et al. notificaron que, especialmente las G250E, H396P,

H396R, E255V y T315I, parecían conferir resistencia al imatinib (Corbin et al., 2003). Según algunas realizaciones en particular, los inhibidores del PIGF se usan para el tratamiento de las leucemias Ph+ en las que el gen de la BCR-ABL tiene al menos una mutación. Según algunas realizaciones en particular adicionales, los inhibidores del PIGF se usan para el tratamiento de las leucemias Ph+ que no pueden ser tratadas con un inhibidor de la BCR-ABL y/o que no pueden ser tratadas sólo con un inhibidor de la BCR-ABL, y en las que el gen de la BCR-ABL tiene al menos una mutación. Según algunas realizaciones en particular adicionales más, las leucemias Ph+ no pueden ser tratadas con imatinib o no pueden ser tratadas sólo con imatinib. Según todavía algunas realizaciones específicas más, la al menos una mutación en el gen de la BCR-ABL se selecciona entre el grupo que consiste en las mutaciones T315I, E255K, E255V, Y253H, H396P, F317L, M351T, G250E, F311L, M244V, F359V, L387M, H396R, Q252H, Y253F, Q252R y E355G.

Se contempla que el uso de un inhibidor del factor de crecimiento placentario para el tratamiento de la leucemia positiva para el cromosoma Filadelfia pueda ser una terapia o un método de tratamiento individual estándar. Según algunas realizaciones en particular, sin embargo, el uso de inhibidores del PIGF en el tratamiento de las leucemias Ph+ se contempla como parte de una terapia de combinación. Por lo tanto, la inhibición del PIGF puede usarse junto con otras terapias usadas para el tratamiento de las leucemias Ph+, tales como radioterapia, quimioterapia, terapia biológica (por ejemplo, tratamiento con interferón), trasplante de células madre, trasplante de médula ósea, cirugía (por ejemplo, extirpación del bazo) o terapias dirigidas, tales como una inhibición de la BCR-ABL, una inhibición de Lyn, una inhibición de Hsp90, una inhibición de Src. Por supuesto, la inhibición del PIGF puede usarse junto con más de una de estas terapias (por ejemplo, junto con una inhibición de la BCR-ABL y de Lyn).

La inhibición del PIGF puede llevarse a cabo concomitante con otras terapias, o bien antes o después de otras terapias, o pueden, por ejemplo, intercambiarse intermitentemente. La persona experta es capaz de decidir el régimen de tratamiento óptimo, opcionalmente después de una experimentación rutinaria.

Debe apreciarse que aunque en el presente documento se han analizado algunas realizaciones, configuraciones específicas, así como materiales y/o moléculas en particular, para las células y los métodos según la presente invención, pueden realizarse diversos cambios o modificaciones en la forma y en el detalle sin desviarse del ámbito y el espíritu de esta invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar mejor algunas realizaciones en particular, y no deberían considerarse como limitantes de la solicitud. La solicitud está limitada únicamente por las reivindicaciones.

Ejemplos

Materiales y métodos

Animales

Los ratones hembra Balb/c (de 8 semanas de edad) se obtuvieron en Janvier. El alojamiento y todos los procedimientos de experimentación con animales fueron aprobados por el Institutional Animal Care and Research Advisory Committee del K.U. Leuven.

Células y condiciones de cultivo

Las células KCL-22 y CRL-1929 se obtuvieron del ATCC. Las células Bv-173, K562, BaF3, 32D y Nalm6 fueron amablemente proporcionadas por J. Cools (VIB, Leuven). Las células Bv-173 y las células K562 se cultivaron en medio RPMI (Gibco, Invitrogen Corporation) con un 20 % de FCS (Hyclone Laboratories); las células BaF3, 32D y KCL-22 se cultivaron en medio RPMI con un 10 % de FCS; las células Nalm 6 células se cultivaron en medio DMEM (Gibco, Invitrogen Corporation) con un 10 % de FCS y las células CRL-1929 se cultivaron en medio IMDM (Gibco, Invitrogen Corporation) con un 20 % de FCS y beta-mercaptopetanol 0,05 mM (Gibco, Invitrogen Corporation).

Aislamiento de las células estromales primarias murinas derivadas de médula ósea (BMDSC)

Para el aislamiento de las BMDSC, se lavó abundantemente la médula ósea de los fémures y de las tibias, los eritrocitos se eliminaron con tampón de lisis (NH₄Cl 150 mM, EDTA 0,1 mM, KHCO₃ 10 mM, pH 7,4) y posteriormente las células se cultivaron en medio DMEM complementado con un 15 % de FCS. Después de 24 horas se retiró la fracción celular no adherente, y las células adherentes se cultivaron y se expandieron adicionalmente durante 3 semanas.

Ensayos de proliferación y cocultivos

La proliferación de las células leucémicas y de las BMDSC se analizó mediante el uso de ensayos MTT o mediante un recuento manual con un hemocitómetro. El PIGF recombinante murino y el anti-VEGFR-1 se obtuvieron en R&D Systems. El anti-PIGF y la IgG1 de control fueron producidos por Thrombogenics and BioInvent y caracterizados según se ha descrito (Fischer et al., 2007). El PIGF se usó a una concentración de 50 ng/ml y los anticuerpos en exceso molar de 100 veces, salvo que se indique de otro modo. Para los experimentos de cocultivo, se cocultivaron

10⁵ BMDSC durante 48 horas con 4 x 10⁵ células leucémicas solas o en presencia de los respectivos anticuerpos en medio exento de suero. Posteriormente, se determinó la cantidad de BMDSC adherentes y de células leucémicas no adherentes y los sobrenadantes se recogieron para los análisis de las proteínas PIGF y VEGF.

5 *Análisis de la sangre periférica*

Se recogió sangre con pipetas capilares mediante una extracción retroorbital, y el recuento de leucocitos (WBC, *white blood cell*) se determinó con un contador celular automatizado (Beckman Coulter).

10 *ELISA*

Las concentraciones de PIGF o de VEGF se cuantificaron en los sobrenadantes del cultivo celular, en el plasma de la sangre periférica y en el plasma de la médula ósea mediante el uso de inmunoensayos "Quantikine" para el PIGF de ratón y el VEGF de ratón (R&D Systems). Las concentraciones se expresaron como pg/ml/10⁵ células o como pg/ml.

15 *PCR cuantitativa en tiempo real*

20 La RT-PCR se llevó a cabo esencialmente con los cebadores y sondas según se ha descrito previamente (Fischer et al., 2007).

Modelo singénico de leucemia de células Pre-B BCR-ABL+

25 Las células BaF3 BCR-ABL+ se cultivaron como se ha descrito anteriormente y se inyectaron 1 x 10⁶ células a través de la vena de la cola en ratones singénicos Balb/C de 8 semanas de edad.

Modelos de trasplante de LMC sensible al imatinib y resistente al imatinib

30 Para la inducción de la LMC, se recogieron células de médula ósea mediante la irrigación de los fémures y las tibias de ratones donantes Balb/C (de 8 semanas) 4 días después del tratamiento con 200 mg/kg de 5-fluorouracilo (5-FU; Sigma Aldrich) y se preestimularon *in vitro* en medio que contiene 10 ng/ml de IL-3, 10 ng/ml de IL-6 y 50 ng/ml de SCF. Posteriormente, las células se sometieron a 1 ronda de sedimentación conjunta con soluciones madre retrovíricas (constructos retrovíricos: MCSV-GFP, MSCV-BCR-ABL p210 IRES-EGFP, MSCV-BCR-ABL-T3151-IRES-EGFP; amablemente proporcionados por Jan Cools). Los ratones hembra receptores se prepararon mediante una irradiación letal y la médula ósea transducida fue trasplantada mediante la inyección intravenosa de 0,5 x 10⁶ células por animal.

35 Ejemplo 1. Análisis de la expresión del PIGF en células leucémicas y en células estromales primarias de médula ósea *in vitro*.

40 Con objeto de determinar el perfil de expresión del PIGF por parte de las células leucémicas y por parte de las diferentes poblaciones de células estromales asociadas a la leucemia *in vitro*, se analizó la expresión del PIGF en un conjunto de líneas celulares mieloides y linfoides BCR-ABL+ (murinas: BaF3, 32D; humanas: K562, Bv-173, KCL-22). Además, se investigó la línea celular linfóide BCR-ABL- humana Nalm-6. Adicionalmente, la expresión del PIGF se cuantificó en diferentes poblaciones de células estromales de médula ósea. No se encontró expresión de la proteína PIGF en ninguna de las líneas celulares leucémicas estudiadas, según se determinó mediante un ELISA, y unas cantidades muy bajas (41 ± 2,3 pg/ml) en células hematopoyéticas CD45⁺ sanas aisladas a partir de médula ósea murina (Figura 1A). Por el contrario, las células estromales primarias derivadas de médula ósea murina (BMDSC) y las líneas celulares estromales (S17, OP9) expresaban abundantes cantidades de la proteína PIGF (Figura 1A).

50 El análisis mediante FACS de las células estromales derivadas de médula ósea reveló que el 49,7 % ± 20 % de las BMDSC murinas eran de la estirpe hematopoyética después de un periodo medio de cultivo de 3 semanas (no mostrado). Para descifrar si la fracción hematopoyética (CD45⁺) o la fracción no hematopoyética (CD45⁻) de las BMDSC murinas expresaba el PIGF, separamos o más poblaciones a través de una metodología inmunomagnética (pureza > 93 %, no mostrado) y posteriormente determinamos el PIGF en los sobrenadantes de las CD45⁺ y CD45⁻ BMDSC. Estos experimentos revelaron la expresión prácticamente exclusiva del PIGF por parte de las BMDSC CD45⁻ (Figura 1B) (N = 3; p < 0,001). Adicionalmente determinamos la expresión del PIGF en células endoteliales humanas (HUVEC) y murinas (fEND5) y encontramos una abundante expresión de la proteína PIGF (HUVEC: 279,7 ± 29,9 pg/ml; fEND5: 125,7 ± 18,8 pg/ml; N = 3). Conjuntamente, estos resultados apuntan en la dirección de que el PIGF es expresado fundamentalmente por las células estromales de la médula ósea y no por las células leucémicas *in vitro*.

Ejemplo 2. El PIGF es expresado por el estroma leucémico y representa un biomarcador de la progresión de la leucemia *in vivo*.

Para elucidar el potencial impacto del PIGF sobre la progresión de la enfermedad leucémica, y por lo tanto el potencial terapéutico del α PIGF *in vivo*, se usó un modelo de crisis blástica de LMC bien descrito mediante el trasplante de médula ósea transducida con BCR/ABL-GFP en ratones singénicos irradiados subletalmente. En primer lugar se analizaron los niveles de la proteína PIGF en el plasma de los ratones enfermos en diferentes puntos temporales (d14, d21 y d28) en comparación con los ratones de control, y detectamos muy pocas cantidades de la proteína PIGF en la sangre periférica de los ratones sanos o de los ratones trasplantados con una médula ósea transducida en falso, y una baja cantidad de la proteína PIGF en su médula ósea. Por el contrario, los ratones leucémicos mostraron un aumento en la proteína PIGF tras la progresión de la enfermedad en su circulación, alcanzando unos niveles comparables a los ratones portadores de tumores sólidos (Fischer et al., 2007) en la fase terminal (Figura 2A, B). Se observó una cinética de aumento similar del PIGF en el plasma de la médula ósea (Figura 2B). También cuantificamos el inhibidor natural del PIGF, el sVEGFR-1, y encontramos que aunque el sVEGFR-1 está presente en exceso en comparación con el PIGF, la proporción PIGF/sVEGFR-1 aumenta en la sangre y en la médula ósea durante la progresión de la enfermedad, lo que indica que la regulación por aumento del PIGF es más pronunciada que la del sVEGFR-1 en el transcurso de la leucemia (Figura 2C, D).

Para averiguar la fuente del PIGF *in vivo*, llevamos a cabo unos análisis mediante una PCR en tiempo real del hueso y de la médula ósea, que revelaron una regulación por aumento de 12,6 veces del ARNm de PIGF en la médula ósea (N = 8; P < 0,002) (Figura 2E). Los niveles del ARNm de PIGF en los huesos eran similares en los ratones enfermos y en los sanos (datos no mostrados), lo que indica que la fuente principal del elevado PIGF detectado en el plasma de la médula ósea de los ratones leucémicos es la médula ósea. Para especificar adicionalmente las células productoras de PIGF de la médula ósea, clasificamos mediante FACS las células leucémicas (GFP⁺), las células hematopoyéticas no leucémicas (GFP⁻CD45⁺) y las células estromales no leucémicas no hematopoyéticas (GFP⁻CD45⁻) y posteriormente determinamos la expresión del ARNm de PIGF mediante una RT-PCR en estas sustracciones. Estos experimentos elucidaron, de una forma similar a los hallazgos *in vitro* mencionados anteriormente, que el PIGF es expresado predominantemente por las células estromales CD45⁻ y sólo despreciablemente por las células leucémicas o por las células hematopoyéticas de los ratones leucémicos *in vivo*. De hecho, las células estromales GFP⁻CD45⁻ expresaban 95,6 veces más ARNm de PIGF que las células leucémicas y 32 veces más ARNm de PIGF que las células hematopoyéticas (N = 4; P < 0,05); (Figura 2F). Cuando se comparan los niveles del ARNm de PIGF en células de médula ósea CD45⁻ de ratones leucémicos con los niveles del ARNm de PIGF en células CD45⁻ de la médula ósea de ratones sanos, encontramos una fuerte regulación por aumento (25,4 veces) de la expresión del PIGF en el compartimento de células estromales no hematopoyéticas de los ratones portadores de leucemia (N = 4; P < 0,05) (Figura 2F). De forma interesante, el ARNm de VEGF sólo era ligeramente regulado por aumento en la médula ósea de los ratones portadores de leucemia cuando se comparaba con los ratones sanos (N = 8; P = 0,23) (Figura 2G), lo que indica que el PIGF representa un factor patogénico específico derivado del estroma en la leucemia BCR/ABL⁺ también *in vivo*. Esta hipótesis es corroborada adicionalmente por la observación de que la cantidad de proteína PIGF presente en el plasma sanguíneo o en el plasma de la médula ósea de ratones leucémicos se correlaciona con la cantidad de blastos leucémicos infiltrantes en la médula ósea, según se determina mediante un análisis de FACS de las células GFP⁺ en la médula ósea de los ratones enfermos en fase terminal (r = 0,81 y r = 0,85; p < 0,05; Figura 2H, I). Por lo tanto, el PIGF representa un biomarcador de la progresión de la enfermedad de la crisis blástica de la LMC en ratones.

Ejemplo 3. El anti-PIGF inhibe la proliferación inducida por el PIGF de las células leucémicas.

Para determinar el potencial efecto biológico del PIGF sobre las células leucémicas, se investigó la expresión del principal receptor del PIGF, el VEGFR-1 y de sus correceptores Npn1 y Npn2 en líneas celulares leucémicas. El VEGFR-1 era expresado por la mayor parte de las líneas celulares estudiadas según la bibliografía publicada (Fragoso et al., 2006) (datos no mostrados). El Npn1 y el Npn2 eran expresados en las líneas celulares K562, Nalm-6, BV-173 y KCL-22, aunque a unos niveles diferentes, pero no en las células 32D (Figura 3A, B). Tomando como base estos hallazgos, incubamos células leucémicas con PIGF *in vitro*, dosis que indujo una proliferación dependiente en 4 de las 5 líneas celulares BCR/ABL⁺, según la bibliografía publicada (Figura 3C, D). Además de su principal receptor, el VEGFR-1, el PIGF también se une a los correceptores Npn-1 y Npn-2. Para descifrar si la proliferación inducida por el PIGF de las células leucémicas requiere el VEGFR-1, se evaluó el efecto inhibitorio de un anticuerpo bloqueante del VEGFR-1 extracelular (α VEGFR-1). Se encontró una inhibición de la proliferación mediada por el PIGF en presencia del α VEGFR-1 (Figura 3E). Por el contrario, la proliferación inducida por el PIGF de las células leucémicas no fue inhibida tras la adición de los anticuerpos de bloqueo de la función extracelular contra el Npn-1 y el Npn-2, lo que indica que el efecto pro-proliferativo del PIGF está mediado principalmente a través del VEGFR-1. (Figura 1G). En una etapa posterior se investigó si el anti-PIGF (α PIGF) inhibe la proliferación inducida por el PIGF de las células leucémicas y se encontró una anulación prácticamente completa del efecto pro-proliferativo del PIGF tras la adición del α PIGF, lo que indica un potencial terapéutico en la leucemia (Figura 3F).

Con objeto de elucidar si el PIGF induce cambios en la fosforilación del ABL de las células leucémicas BCR/ABL⁺, llevamos a cabo inmunoanálisis Western de células Bv-173 y KCL-22 que se incubaron con y sin PIGF. Estos experimentos indicaron que el PIGF no modifica la fosforilación del ABL (datos no mostrados).

Ejemplo 4. Las interacciones paracrinas entre las células leucémicas y las BMDSC inducen la secreción del PIGF por parte de las BMDSC.

Se llevaron a cabo experimentos de cocultivo para estudiar las potenciales interacciones entre las células leucémicas humanas y las BMDSC murinas o una línea de células estromales de médula ósea murina (S17) que dan lugar a un aumento en la secreción del PIGF por parte de las BMDSC o de las células S17, y se encontró una significativa regulación por aumento del PIGF murino tras el cocultivo (Figura 4A, B). Este hallazgo nos indicó que analizáramos la proliferación de los cocultivos, lo que reveló una significativa inducción de la proliferación de las células leucémicas y de las BMDSC (Figura 4C, D). Este efecto pro-proliferativo fue anulado prácticamente en su totalidad tras la adición del α PIGF a los cultivos, lo que indica que el PIGF puede inducir la proliferación de las células leucémicas de una forma paracrina, pero al mismo tiempo media en la expansión de las células estromales de la médula ósea a través de un bucle autocrino, promoviendo así de forma simultánea el clon leucémico y su estroma de soporte (Figura 4C, D). De forma interesante, esta interacción da lugar específicamente a una regulación por aumento del PIGF, debido a que el VEGF no estaba regulado por aumento durante el cocultivo (datos no mostrados). Para ensayar el potencial papel del PIGF en la leucemia BCR-ABL+ *in vivo*, establecimos 3 modelos murinos diferentes de leucemia BCR/ABL+ mieloide y linfoide.

En un esfuerzo por descifrar las señales moleculares que podrían inducir una regulación por aumento del PIGF, analizamos en primer lugar si la incubación con un medio condicionado de células leucémicas (CM) sería suficiente para inducir una regulación por aumento similar del PIGF en las células estromales (S17) que el cocultivo directo con células leucémicas, y averiguamos que, de hecho, el CM es suficiente para la inducción de la secreción del PIGF por parte de las S17 (N = 3; P = 0,008; Figura 4E).

Ejemplo 5. Una deficiencia genética en el estroma del hospedador, pero no en las células leucémicas, prolonga la supervivencia de los ratones leucémicos.

Para determinar el papel del PIGF en la leucemia BCR/ABL+ *in vivo*, indujimos una leucemia en ratones genéticamente deficientes en el PIGF (PIGF^{-/-}) y en ratones wt (WT), y comparamos la supervivencia entre ambos grupos. Encontramos que los ratones que carecen del PIGF vivieron significativamente más tiempo que los ratones WT, lo que indica que el PIGF juega un importante papel en la patogenia de la leucemia *in vivo* (N = 14/15; P = 0,003; Figura 5A).

En un intento de probar nuestra hipótesis de que el PIGF representa un factor derivado del estroma en la leucemia BCR/ABL+, realizamos estudios cruzados mediante el trasplante de células transducidas de médula ósea de ratones WT y de ratones PIGF KO en hospedadores WT y comparamos la supervivencia entre los diferentes grupos (WT \rightarrow WT, KO \rightarrow WT y WT \rightarrow KO). Averiguamos que la ausencia del PIGF en las células leucémicas no prolonga la supervivencia de los ratones, pero que la deficiencia en el PIGF del estroma del hospedador inducía una ventaja de supervivencia significativa en los ratones leucémicos, lo que está en un intervalo comparable al del sistema totalmente deficiente en PIGF (véase anteriormente). Por lo tanto, el PIGF derivado del estroma promueve críticamente la progresión de la leucemia BCR/ABL+ *in vivo* (Figura 5B).

Ejemplo 6. El tratamiento de ratones leucémicos con anti-PIGF prolonga significativamente su supervivencia.

Con objeto de investigar el potencial terapéutico de la inhibición del PIGF en la leucemia Ph+ murina, se trataron ratones portadores de una leucemia inducida mediante la inyección intravenosa de células BaF3 BCR-ABL+ con α PIGF, y se encontró una prolongación significativa de la supervivencia mediana de 18 días (N = 9; P = 0,015), en comparación con los anticuerpos de control (Figura 5C). Estos resultados nos indicaron que estableciéramos modelos murinos de LMC sensible al imatinib y resistente al imatinib (mutante T315I), inducida mediante el trasplante de BM transducida con BCR-ABL, que simula clínicamente el estado patológico humano de una crisis blástica caracterizada por esplenomegalia y una excesiva proliferación de células leucémicas mieloides que da lugar a la muerte de los ratones enfermos una semana después de que se detectara por primera vez una elevación en los leucocitos en la sangre periférica. A continuación se investigó el efecto del α PIGF sobre la carga leucémica, la histología de la médula ósea y la supervivencia de los ratones. Se observó una carga leucémica reducida (datos no mostrados) y el análisis mediante FACS de las células GFP⁺ en una fase temprana (d15) y en la fase terminal (d28) de la leucemia reveló una reducción específica en las células BCR-ABL+ en la BM y en la PB (N = 7; P < 0,05) (Figura 5D, E y no mostrado). Adicionalmente, las histologías de la médula ósea en la fase terminal indican una inhibición sustancial de la progresión de la enfermedad inducida por el tratamiento con α PIGF (Figura 5F). A continuación investigamos el efecto del α PIGF sobre la supervivencia de los ratones. Estos experimentos implican una prolongación significativa de la supervivencia tras el tratamiento con α PIGF cuando se comparaba con los anticuerpos de control en ratones portadores de la leucemia tanto sensible al imatinib como resistente al imatinib (Figura 5G, H). Por lo tanto, el α PIGF inhibe la progresión de la leucemia de crisis blástica murina independientemente del estado de mutación de la BCR/ABL.

Ejemplo 7. El tratamiento de ratones leucémicos con anti-PIGF inhibe la hipervascularización y la fibrosis de la médula ósea.

La neoangiogénesis de la médula ósea representa un importante factor patogénico en la leucemia. El PIGF es una potente citocina pro-angiogénica y ya se ha demostrado que promueve la angiogénesis tumoral. Por lo tanto, se analizó el efecto de la inhibición del PIGF en la vascularización de la médula ósea mediante un análisis morfológico de tinciones de CD31 en ratones trasplantados en falso tratados con un anticuerpo de control y tratados con α PIGF con una leucemia en fase terminal. Estos experimentos indicaron una profunda hipervascularización de la médula ósea en los ratones leucémicos en comparación con los controles trasplantados en falso (Figura 6A, C). Esta hipervascularización está significativamente reducida después del tratamiento con el α PIGF (Figura 6A, C).

La fibrosis de la médula ósea es un factor adverso bien conocido en la LMC y está asociado con una resistencia al imatinib. Tomando como base nuestras observaciones de que el PIGF estimula la proliferación de las BMDSC (véase anteriormente), investigamos si el tratamiento de ratones leucémicos con α PIGF podría modificar la fibrosis de la médula ósea. Tras un análisis morfológico de la longitud media de las fibras de reticulina⁺ en la médula ósea, encontramos una reducción significativa en la fibrosis de la médula ósea inducida por la inhibición del PIGF (Figura 6B, D). Por lo tanto, el α PIGF reduce tanto la hipervascularización como la fibrosis de la médula ósea en ratones leucémicos.

De forma interesante, los experimentos iniciales han demostrado que el imatinib y el anti-PIGF tienen un efecto inhibitorio aditivo sobre la leucemia BCR/ABL⁺ *in vivo*.

Ejemplo 8. El PIGF está desregulado en la LMC humana.

Para investigar la relevancia del PIGF como nueva molécula objetivo en la LMC humana, determinamos los niveles plasmáticos del PIGF en controles sanos (n = 10), en pacientes sin tratar en la fase crónica (CP) tras un diagnóstico primario (n = 32) y en pacientes con una crisis blástica (BC, fase terminal de la enfermedad) en tratamiento con diferentes inhibidores de la tirosina quinasa (TKI) (n = 9). Estos análisis revelaron una regulación por aumento de 2,1 veces del PIGF en los pacientes recién diagnosticados en la CP (p < 0,0001) y un aumento de 3,7 veces en los niveles del PIGF en los pacientes con una BC (p < 0,0001) en comparación con los controles sanos (Figura 7A). Posteriormente, determinamos los niveles del PIGF en el plasma de la médula ósea (BMP) de los pacientes recién diagnosticados de LMC (n = 7) y en los pacientes de control diagnosticados con un linfoma sin invasión de la médula ósea (n = 5; Figura 7B). Estos análisis revelaron una regulación por aumento del PIGF también en el BMP de los pacientes con LMC en comparación con los controles.

A continuación investigamos la potencial relación entre la proteína PIGF en la PB y la cantidad de transcritos BCR-ABL₁ determinada mediante una QRT-PCR en un único centro (n = 43 en la CP, n = 2 en la fase acelerada; tratamiento con diferentes TKI, imatinib + interferón, u homoharringtonina). Encontramos una correlación significativa entre los niveles del PIGF y la cantidad de transcritos de BCR-ABL₁ (r = 0,45; p = 0,0016), lo que indica que el PIGF representa un objetivo específico de la enfermedad en la LMC humana (Figura 7C). Posteriormente, aislamos las células CD34⁺ a partir de donantes sanos y a partir de pacientes con LMC en la CP y en una BC y determinamos la expresión del PIGF mediante una QRT-PCR. Estos análisis revelaron que la expresión del PIGF es igualmente baja tanto en las células leucémicas como en las células CD34⁺ sanas (Figura 7D). Por lo tanto, lo más probable es que el elevado PIGF en circulación no sea secretado por las células leucémicas, sino por las células estromales. Para investigar esta hipótesis, aislamos células estromales adherentes de BM a partir de pacientes recién diagnosticados de LMC y comparamos los niveles de expresión del PIGF con los de las células leucémicas CD34⁺. Encontramos que las células estromales expresan > 7 veces más PIGF que las células leucémicas (Figura 7D; p = 0,003), lo que corrobora nuestros datos preclínicos y extiende el concepto de que el PIGF es producido principalmente por las células estromales en los pacientes con LMC.

Ejemplo 9. Los niveles del PIGF en pacientes con LMC tratados con imatinib permanecen elevados.

Todavía no está claro por qué las células leucémicas persisten en los pacientes tratados con imatinib, lo que provoca una rápida recaída de la mayoría de los pacientes después de suspender el fármaco. El estroma del hospedador juega potencialmente un papel importante, independientemente de las células leucémicas BCR/ABL⁺. Para elucidar si el imatinib puede inducir la secreción del PIGF por parte de las BMDSC, incubamos células estromales con concentraciones crecientes de imatinib. Estos experimentos revelaron una inducción dependiente de la dosis del PIGF en las BMDSC murinas, lo que indica un potencial papel del PIGF derivado del estroma en la mediación de la resistencia al imatinib. Con objeto de elucidar si ésta inducción del PIGF en las BMDSC también se produce *in vivo*, tratamos ratones portadores de LMC inducidos mediante un trasplante de médula ósea transducida con la BCR/ABL con imatinib, y comparamos los niveles del PIGF en su médula ósea con respecto a los ratones leucémicos sin tratar y a los ratones sanos. Estos experimentos revelaron una regulación por aumento del PIGF en la médula ósea de los ratones leucémicos tratados con imatinib en comparación con los ratones no tratados, a pesar de que la infiltración de la médula ósea de los ratones tratados con imatinib por las células leucémicas era significativamente menor (Figura 7E). Estos resultados indican una potenciación de la expresión del PIGF inducida por la leucemia en la médula ósea por parte del imatinib, lo que podría promover la supervivencia y la proliferación

de las células leucémicas en presencia de imatinib.

Estos hallazgos nos indicaron que determinásemos los niveles del PIGF en la PB de los pacientes tratados con imatinib que alcanzan diferentes niveles de respuesta (remisión molecular completa, CMR; proporción BCR/ABL/ABL < 1; proporción BCR/ABL/ABL < 10) y que los comparáramos con los de los individuos sanos y los no tratados, principalmente los pacientes diagnosticados con LMC. De forma interesante, los niveles del PIGF eran significativamente mayores en los pacientes con una CMR que en los sujetos sanos, y en los pacientes con una baja proporción BCR/ABL/ABL < 1, el PIGF estaba elevado a unos niveles similares a los de los pacientes no tratados recién diagnosticados de LMC (Figura 7F). Estos datos indican que el PIGF permanece elevado a pesar de la reducción de la carga leucémica de varios órdenes de magnitud, y podría contribuir a la persistencia de la enfermedad bajo un tratamiento con imatinib.

En conclusión, nuestros datos indican que el PIGF representa un factor derivado del estroma que promueve la progresión de la leucemia Ph+, independientemente del estado de mutación de *BCR/ABL*, y representa un nuevo objetivo producido por el estroma leucémico, un coadyuvante útil para los inhibidores de la cinasa *BCR/ABL* o en la leucemia resistente a los TKI.

Análisis

La introducción del imatinib y de los inhibidores de segunda generación de la BCR-ABL ha revolucionado el tratamiento de los pacientes con leucemias positivas para el cromosoma Filadelfia (Ph+), pero las células leucémicas persisten incluso en los pacientes tratados con éxito, y algunos pacientes desarrollan resistencia y finalmente una recaída. Las razones de estos inconvenientes no se han resuelto totalmente, pero nosotros hemos postulado que el estroma del hospedador juega potencialmente un importante papel independiente de la BCR-ABL. Ya se ha demostrado que el factor de crecimiento placentario (PIGF), un homólogo del VEGF, era abundantemente secretado por las células estromales en tumores sólidos. Por lo tanto, se decidió que merecía la pena estudiar el papel del PIGF en las leucemias linfoides y mieloides Ph+, y abordar el potencial terapéutico del α PIGF, un anticuerpo monoclonal contra el PIGF, del que recientemente hemos informado que tiene un amplio potencial antitumoral en varios modelos preclínicos de tumores sólidos (Fischer et al., Cell, 2007).

En primer lugar se estudió la expresión del PIGF por parte de 5 líneas celulares diferentes de leucemia Ph+ humanas y murinas (Bv-173, BaF3, 32D, K562, KCL22) *in vitro*, y se encontró que ninguna de estas líneas celulares secretaba la proteína PIGF, aunque expresaban su receptor objetivo, el VEGFR-1. Por el contrario, las células estromales primarias de médula ósea adherentes murinas (BMDSC) expresaban abundantes cantidades de la proteína PIGF (de hasta 10^5 pg/ml/ 10^5 células), lo que indica una potencial función relacionada con el estroma del PIGF.

En segundo lugar se analizó si el PIGF podría inducir la proliferación, y por lo tanto se reveló una inducción dependiente de la dosis del PIGF recombinante en todas las líneas celulares leucémicas analizadas. Este efecto del PIGF era prácticamente completamente anulado tanto por el α PIGF como por un anticuerpo anti-VEGFR-1 extracelular, indicando así que el efecto pro-proliferativo del PIGF está mediado principalmente por el VEGFR-1.

En tercer lugar se estudiaron las potenciales interacciones paracrinas entre las BMDSC y las células leucémicas mediante la realización de experimentos de cocultivo. Notablemente, el cocultivo de las BMDSC con las células leucémicas indujo significativamente la proliferación de las células leucémicas. Se elaboró la hipótesis de que ésta inducción de la proliferación podría estar mediada por el PIGF, y de hecho, se encontró una anulación prácticamente completa de este efecto pro-proliferativo tras la adición de α PIGF a los cocultivos. Adicionalmente, las BMDSC regulaban significativamente por aumento la secreción del PIGF (2,1 veces; N = 3; P = 0,005) cuando se cultivaban en presencia de células leucémicas, lo que indica unas sustanciales interacciones paracrinas entre ambos tipos de células. Estos resultados nos permitieron concluir que el PIGF derivado del estroma podría representar un nuevo objetivo en las leucemias Ph+.

Para ensayar esta hipótesis *in vivo*, establecimos 3 modelos murinos diferentes de leucemia mieloide y linfóide Ph+. Posteriormente, se analizó si estaba presente la proteína PIGF en la sangre y en la médula ósea de los ratones enfermos en comparación con los ratones sanos. No se encontró proteína PIGF en la sangre periférica de los ratones sanos, y una baja cantidad de la proteína PIGF en su médula ósea. Por el contrario, los ratones leucémicos mostraron unos niveles de proteína PIGF ($76,5 \pm 18,4$ pg/ml de plasma; N = 7) en su circulación comparables a los de los ratones portadores de tumores sólidos, e de forma interesante, unos niveles más de 8,9 veces (N = 7; P < 0,0001) elevados del PIGF en su médula ósea, en comparación con los ratones sanos, lo que indica de nuevo que el PIGF representa un nuevo factor patogénico derivado del estroma en la leucemia Ph+.

Con objeto de investigar el potencial terapéutico del α PIGF en las leucemias murinas Ph+, se trataron posteriormente ratones portadores de una leucemia inducida mediante una inyección de células BaF3 BCR/ABL+ con α PIGF en comparación con los anticuerpos de control, y se encontró una prolongación significativa de la supervivencia mediana en 18 días (N = 9; P = 0,015) inducida por el α PIGF. Alentados por estos resultados positivos, establecimos modelos de LMC sensibles al imatinib y resistentes al imatinib (mutante T315I) mediante una

transducción de células primarias de médula ósea y un posterior trasplante en ratones receptores irradiados letalmente, que se trataron con α PIGF y con anticuerpos de control. De forma interesante, también en estos modelos agresivos encontramos una prolongación significativa de la supervivencia de los ratones enfermos inducida por el bloqueo del PIGF (prolongación de la supervivencia mediana en los wt con una leucemia inducida por la BCR-ABL de 5 días; N = 11; P = 0,002; en los mutantes T315I de 4 días; N = 12; P = 0,039). La histología de la médula ósea y el análisis fenotípico mediante FACS reveló una disminución en la infiltración del bazo y de la médula ósea con células leucémicas (reducción en la médula ósea del 38 % y en el bazo del 24 %).

Aquí hemos descifrado que las células leucémicas aleccionan a las células estromales no hematopoyéticas derivadas de médula ósea (BMDSC) para que regulen por aumento el factor de crecimiento placentario (PIGF), lo que dirige críticamente la progresión de la leucemia BCR-ABL1+ en modelos preclínicos de ratón. De forma importante, estos hallazgos fueron confirmados en muestras humanas de LMC, ya que el PIGF también está regulado por aumento en la sangre y en la médula ósea de los pacientes con LMC. La inhibición de esta nueva molécula objetivo por parte de un anticuerpo monoclonal contra el PIGF, el α PIGF, mejora la supervivencia de los ratones portadores de una leucemia sensible y resistente al imatinib (mutados en T315I). El anti-PIGF muestra su eficacia terapéutica bloqueando la proliferación de las células leucémicas y normalizando el microentorno leucémico anormal de la médula ósea al reducir la hipervascularización y la fibrosis. De forma interesante, el imatinib puede regular por aumento el PIGF en las BMDSC, y los niveles del PIGF permanecen altos en los pacientes con LMC tratados con imatinib, lo que indica que el PIGF podría contribuir a la persistencia de las células leucémicas. Esto apoya adicionalmente el hecho de que puede usarse la inhibición del PIGF junto con dichas terapias, proporcionando un beneficio adicional. En resumen, la inhibición del PIGF puede servir como un nuevo candidato al que dirigirse en las terapias de combinación o en la LMC resistente a los TKI.

En conclusión, estos datos indican que el PIGF representa un factor derivado del estroma que promueve la progresión de la leucemia Ph+, independientemente del estado de mutación de la BCR-ABL, y podría representar un nuevo objetivo producido por el estroma leucémico, un coadyuvante potencialmente útil de los inhibidores de la cinasa de BCR-ABL.

Referencias

Aiello LR, Pierce BA, Foley ED, Takagi H, Chen H, Riddle L, Ferrara N, King GL, Smith LE. Suppression of retinal neovascularization *in vivo* by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. Proc Natl Acad Sci EE.UU.. 1995; 92 (23): 10457-61.

Altman S. RNase P in research and therapy. Biotechnology (N Y). 1995; 13 (4): 327-9.

Alvarado Y, Apostolidou E, Swords R, Giles FJ. Emerging therapeutic options for Philadelphia-positive acute lymphocytic leukemia. Expert Opin Emerg Drugs. 2007; 12 (1): 165-79.

Berard M, Sordello S, Ortega N, Carrier JL, Peyri N, Wassef M, Bertrand N, Enjolras O, Drouet L, Plouet J. Vascular endothelial growth factor confers a growth advantage *in vitro* and *in vivo* to stromal cells cultured from neonatal hemangiomas. Am J Pathol. 1997; 150 (4): 1315-26.

Bridonneau P, Bunch S, Tengler R, Hill K, Carter J, Pieken W, Tinnermeier D, Lehrman R, Drolet DW. Purification of a highly modified RNA-aptamer. Effect of complete dénaturación during chromatography on product recovery and specific activity. J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 16 de abril de 1999; 726 (1-2): 237-47.

Burchert A. Roots of imatinib resistance: a question of self-renewal? Drug Resist Updat. 2007; 10 (4-5): 152-61.

Corbin AS, La Rosée P, Stoffregen ER, Druker BJ, Deininger MW. Several Bcr-Abl kinase domain mutants associated with imatinib mesylate resistance remain sensitive to imatinib. Blood. 2003; 101 (11): 4611-4.

Cristiano RJ, Smith LC, Kay MA, Brinkley BR, Woo SL. Hepatic gene therapy: efficient gene delivery and expression in primary hepatocytes utilizing a conjugated adenovirus-DNA complex. Proc Natl Acad Sci EE.UU. 1993; 90 (24): 11548-52.

Culver KW, Vickers TM, Lamsam JL, Walling HW, Seregina T. Gene therapy for solid tumors. Br Med Bull. 1995; 51 (1): 192-204.

Davis. Kinetic Characterization of Thrombin-Aptamer Interactions. Pharmacia Biosensor Application Note 1994; 305.

Ellington AD, Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. Nature. 1990; 346 (6287): 818-22.

Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, Kantarjian HM. Chronic myelogenous leukemia: biology and therapy. Ann Intern Med. 1999; 131 (3): 207-19.

- Fernandez JM, Chu S, Oberhauser AF. RNA structure. Pulling on hair (pins). *Science*. 2001; 292 (5517): 653-4.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998; 391 (6669): 806-11.
- 5 Fischer C, Jonckx B, Mazzone M, Zacchigna S, Loges S, Pattarini L, Chorianopoulos E, Liesenborghs L, Koch M, De Mol M, Autiero M, Wyns S, Plaisance S, Moons L, van Rooijen N, Giacca M, Stassen JM, Dewerchin M, Collen D, Carmeliet P. Anti-PlGF inhibits growth of VEGF (R)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels. *Cell*. 2007; 131 (3): 463-75.
- 10 Fragoso R, Pereira T, Wu Y, Zhu Z, Cabeçadas J, Dias S. VEGFR-1 (FLT-1) activation modulates acute lymphoblastic leukemia localization and survival within the bone marrow, determining the onset of extramedullary disease. *Blood*. 2006; 107 (4): 1608-16.
- 15 Gold L, Polisky B, Uhlenbeck O, Yarus M. Diversity of oligonucleotide functions. *Annu Rev Biochem*. 1995; 64: 763-97.
- Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M; European Leukemia Net. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet*. 2007; 370 (9584): 342-50.
- 20 Ikai T, Miwa H, Shikami M, Hiramatsu A, Tajima E, Yamamoto H, Imai N, Hattori A, Nishii K, Miura K, Satoh A, Itoh M, Imamura A, Mihara H, Kato Y, Nitta M. Placenta growth factor stimulates the growth of Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia cells by both autocrine and paracrine pathways. *Eur J Haematol*. 2005; 75 (4): 273-9.
- 25 Jenke AC, Stehle IM, Herrmann F, Eisenberger T, Baiker A, Bode J, Fackelmayer FO, Lipps HJ. Nuclear scaffold/matrix attached region modules linked to a transcription unit are sufficient for replication and maintenance of a mammalian episome. *Proc Natl Acad Sci EE.UU*. 2004; 101 (31): 11322-7.
- 30 Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature*. 1986; 321 (6069): 522-5.
- Kendall RL, Wang G, Thomas KA. Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996; 226 (2): 324-8.
- 35 Korth C, Stierli B, Streit P, Moser M, Schaller O, Fischer R, Schulz-Schaeffer W, Kretzschmar H, Raeber A, Braun U, Ehrensperger F, Hornemann S, Glockshuber R, Riek R, Billeter M, Wüthrich K, Oesch B. Prion (PrP^{Sc})-specific epitope defined by a monoclonal antibody. *Nature*. 1997; 390 (6655): 74-7.
- 40 Kujawski L, Talpaz M. Strategies for overcoming imatinib resistance in chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2007; 48 (12): 2310-22.
- Lam KS, Salmon SE, Hersh EM, Hruby VJ, Kazmierski WM, Knapp RJ. A new type of synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity. *Nature*. 1991; 354 (6348): 82-4.
- 45 Ledley FD. Nonviral gene therapy: the promise of genes as pharmaceutical products. *Hum Gene Ther*. 1995; 6 (9): 1129-44.
- 50 Li S, Li D. Stem cell and kinase activity-independent pathway in resistance of leukaemia to BCR-ABL kinase inhibitors. *J Cell Mol Med*. 2007; 11 (6): 1251-62.
- Manzini S, Vargiolu A, Stehle IM, Bacci ML, Cerrito MG, Giovannoni R, Zannoni A, Bianco MR, Forni M, Donini P, Papa M, Lipps HJ, Lavitrano M. Genetically modified pigs produced with a nonviral episomal vector. *Proc Natl Acad Sci EE.UU*. 2006; 103 (47): 17672-7.
- 55 Marchand GS, Noiseux N, Tanguay JF, Sirois MG. Blockade of *in vivo* VEGF-mediated angiogenesis by antisense gene therapy: role of Flk-1 and Flt-1 receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002; 282 (1): H194-204.
- Matteucci MD, Wagner RW. In pursuit of antisense. *Nature*. 1996; 384 (6604 Supl.): 20-2.
- 60 Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukaemia. *Leukemia*. 1996; 10 (5): 751-6.
- Miller AD. Retrovirus packaging cells. *Hum Gene Ther*. 1990; 1 (1): 5-14.
- 65 Naldini L, Blomer U, Galloway P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*. 1996; 272 (5259): 263-7.

- Pavco PA, Bouhana KS, Gallegos AM, Agrawal A, Blanchard KS, Grimm SL, Jensen KL, Andrews LE, Wincott FE, Pitot PA, Tressler RJ, Cushman C, Reynolds MA, Parry TJ. Antitumor and antimetastatic activity of ribozymes targeting the messenger RNA of vascular endothelial growth factor receptors. *Clin Cancer Res.* 2000; 6 (5): 2094-103.
- 5 Piccaluga PR, Martinelli G, Rondoni M, Visani G, Baccarani M. Advances and potential treatment for Philadelphia chromosome-positive adult acute lymphoid leukaemia. *Expert Opin Biol Ther.* 2006; 6 (10): 1011-22.
- 10 Radich JP. Philadelphia chromosome-positive acute lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2001; 15 (1): 21-36.
- Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature.* 1988; 332 (6162): 323-7.
- 15 Ruckman J, Green LS, Beeson J, Waugh S, Gillette WL, Henninger DD, Claesson-Welsh L, Janjic N. 7-Fluoropyrimidine RNA-based aptamers to the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF165). Inhibition of receptor binding and VEGF-induced vascular permeability through interactions requiring the exon 7-encoded domain. *J Biol Chem.* 1998; 273 (32): 20556-67.
- 20 Shah NP, Sawyers CL. Mechanisms of resistance to STI571 in Philadelphia chromosome-associated leukemias. *Oncogene.* 2003; 22 (47): 7389-95.
- Shibuya M. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct Funct.* 2001; 26 (1): 25-35.
- 25 Silver RT. Chronic myeloid leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2003; 17: 1159-1173.
- Swords R, Alvarado Y, Giles F. Novel Abl kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia in blastic phase and Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma.* 2007; 7 Suppl. 3: S113-9.
- 30 Trapnell BC. Adenoviral vectors for gene transfer. *Adv. Drug Del. Rev.* 1993; 12: 185-199.
- Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science.* 1990; 249 (4968): 505-10.
- 35 Weng DE, Usman N. Angiozyme: a novel angiogenesis inhibitor. *Curr Oncol Rep.* 2001; 3 (2): 141-6.
- Yamada T, Iwasaki Y, Tada H, Iwabuki H, Chuah MK, VandenDriessche T, Fukuda H, Kondo A, Ueda M, Seno M, Tanizawa K, Kuroda S. Nanoparticles for the delivery of genes and drugs to human hepatocytes. *Nat Biotechnol.* 2003; 21 (8): 885-90.
- 40 Yanada M, Naoe T. Imatinib combined chemotherapy for Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: major challenges in current practice. *Leuk Lymphoma.* Septiembre de 2006; 47 (9): 1747- 53.
- 45 Yonekura H, Sakurai S, Liu X, Migita H, Wang H, Yamagishi S, Nomura M, Abedin MJ, Unoki H, Yamamoto Y, Yamamoto H. Placenta growth factor and vascular endothelial growth factor B and C expression in microvascular endothelial cells and pericytes. Implication in autocrine and paracrine regulation of angiogenesis. *J Biol Chem.* 1999; 274 (49): 35172-8.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une específicamente al factor de crecimiento placentario, y la inhibición de la unión del factor de crecimiento placentario al receptor VEGFR1, para su uso en el tratamiento de la leucemia positiva para el cromosoma Filadelfia, en el que la leucemia positiva para el cromosoma Filadelfia no puede ser tratada con un inhibidor de la BCR-ABL, y/o no puede ser tratada sólo con un inhibidor de la BCR-ABL.
- 10 2. El anticuerpo o un fragmento del mismo para su uso según la reivindicación 1, en el que dicha leucemia positiva para el cromosoma Filadelfia es una leucemia mielógena crónica positiva para el cromosoma Filadelfia, una leucemia mieloide aguda positiva para el cromosoma Filadelfia (AML Ph+) o una leucemia linfocítica/linfoblástica aguda positiva para el cromosoma Filadelfia (LLA Ph+), tal como la T-LLA Ph+ o la B-LLA Ph+.
- 15 3. Una combinación de un anticuerpo o de un fragmento del mismo que se une específicamente e inhibe el factor de crecimiento placentario, y un inhibidor de la BCR-ABL para su uso en el tratamiento de la leucemia positiva para el cromosoma Filadelfia, en la que la leucemia positiva para el cromosoma Filadelfia no puede ser tratada sólo con un inhibidor de la BCR-ABL.
- 20 4. La combinación para el uso según la reivindicación 3, en la que dicha leucemia positiva para el cromosoma Filadelfia es una leucemia mielógena crónica positiva para el cromosoma Filadelfia.
- 25 5. El anticuerpo o un fragmento del mismo para su uso según las reivindicaciones 1 o 2 o la combinación para su uso según las reivindicaciones 3 o 4, en los que el anticuerpo o un fragmento del mismo, que se unen específicamente e inhiben al factor de crecimiento placentario, es el anticuerpo 16 D3 producido por la línea celular depositada con el número LMBP 6399CB.
- 30 6. El anticuerpo o un fragmento del mismo para su uso según las reivindicaciones 1 o 2, en el que la leucemia positiva para el cromosoma Filadelfia no puede ser tratada con un inhibidor de la BCR-ABL que es un inhibidor de la tirosina quinasa.
- 35 7. El anticuerpo o un fragmento del mismo para su uso según la reivindicación 6, en el que la leucemia positiva para el cromosoma Filadelfia no puede ser tratada con imatinib, nilotinib, dasatinib, bosutinib, AT9283, SGX393, INNo-406 ni MK0457.
8. La combinación para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, en la que el inhibidor de la BCR-ABL es un inhibidor de la tirosina quinasa.
9. La combinación para el uso según la reivindicación 8, en la que el inhibidor de la BCR-ABL es imatinib, nilotinib, dasatinib, bosutinib, AT9283, SGX393, INNo-406 o MK0457.
- 40 10. El anticuerpo, o un fragmento del mismo, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el sujeto ha sido tratado previamente con un inhibidor de la BCR-ABL, y bien (a) ha desarrollado insensibilidad al inhibidor de la BCR-ABL, o bien (b) el inhibidor de la BCR-ABL no era tolerado por el paciente.

Figura 1

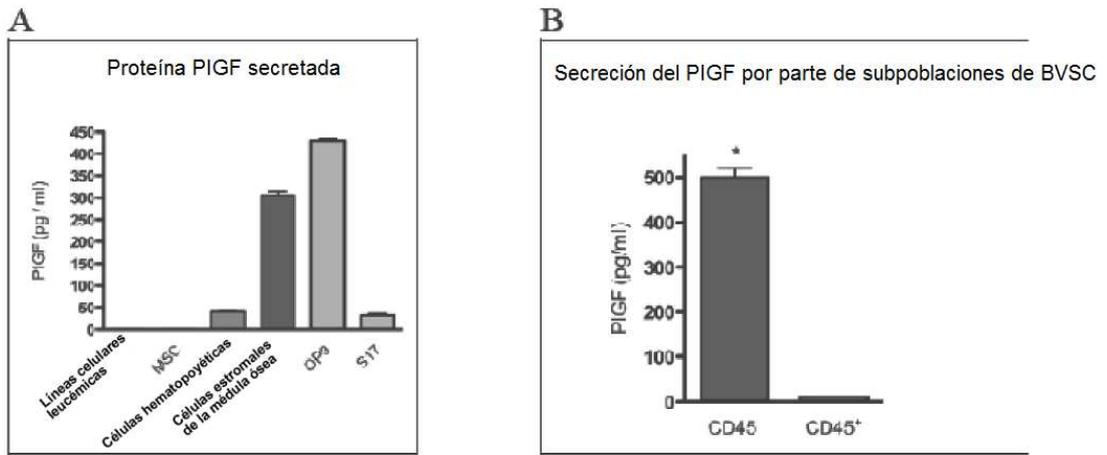
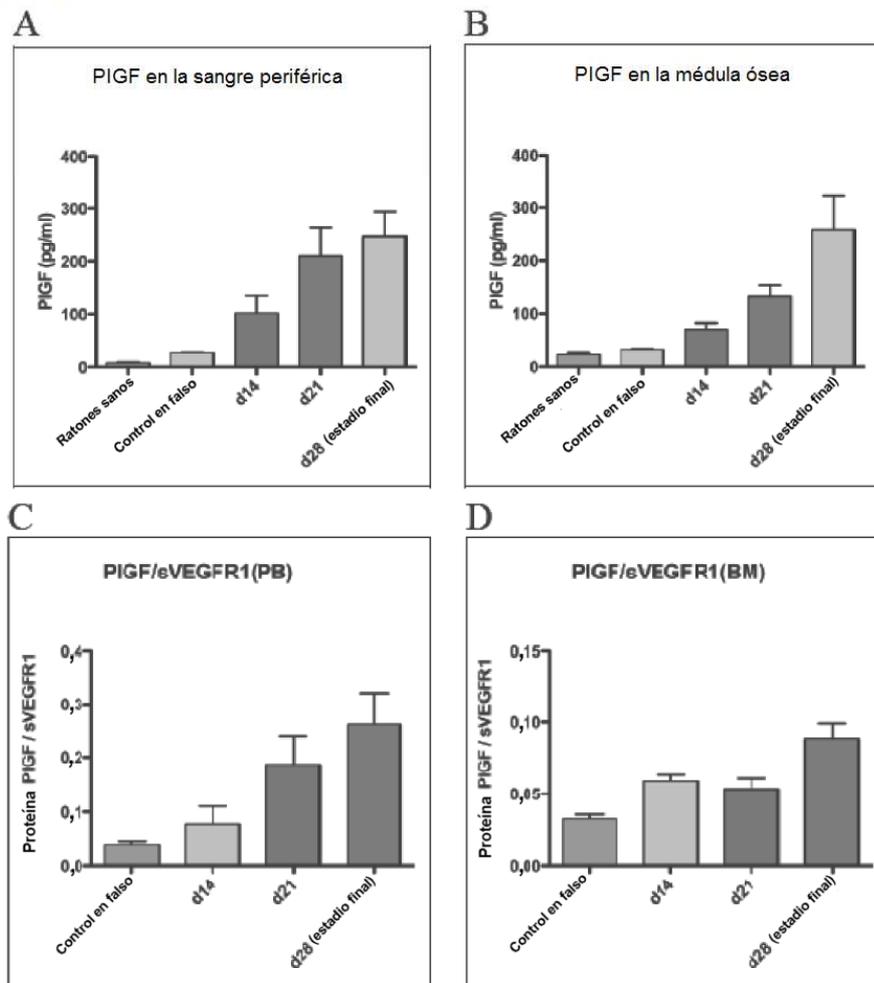
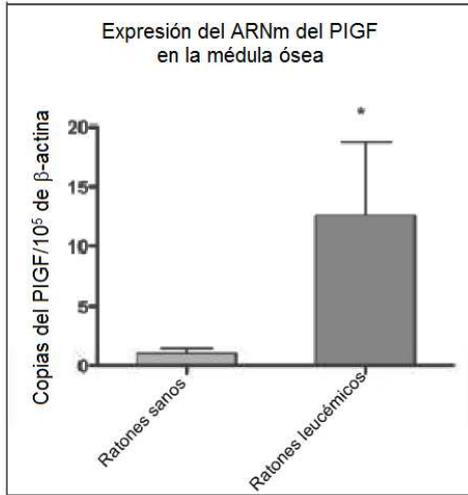


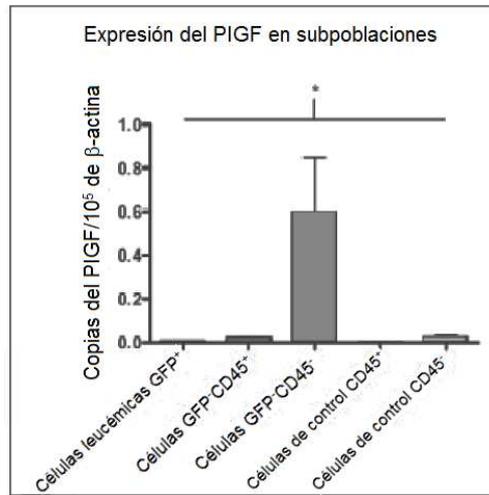
Figura 2



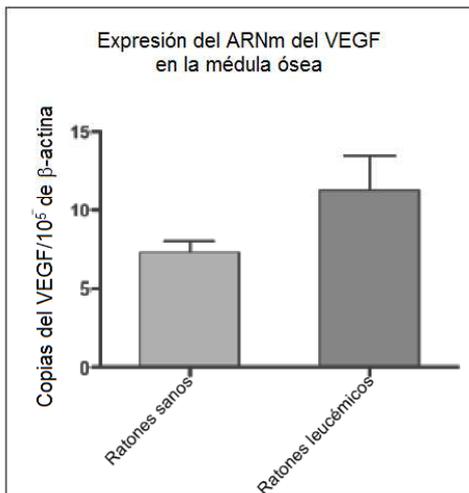
E



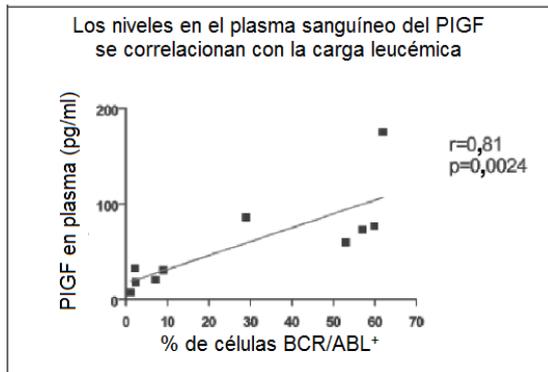
F



G



H



I

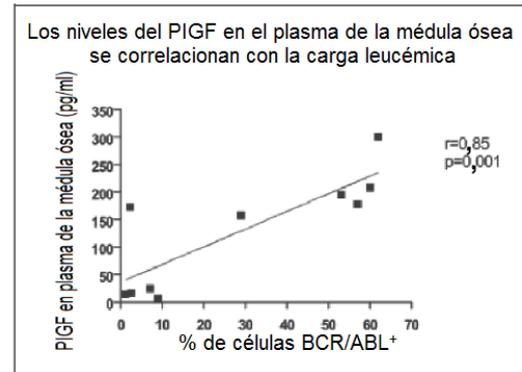
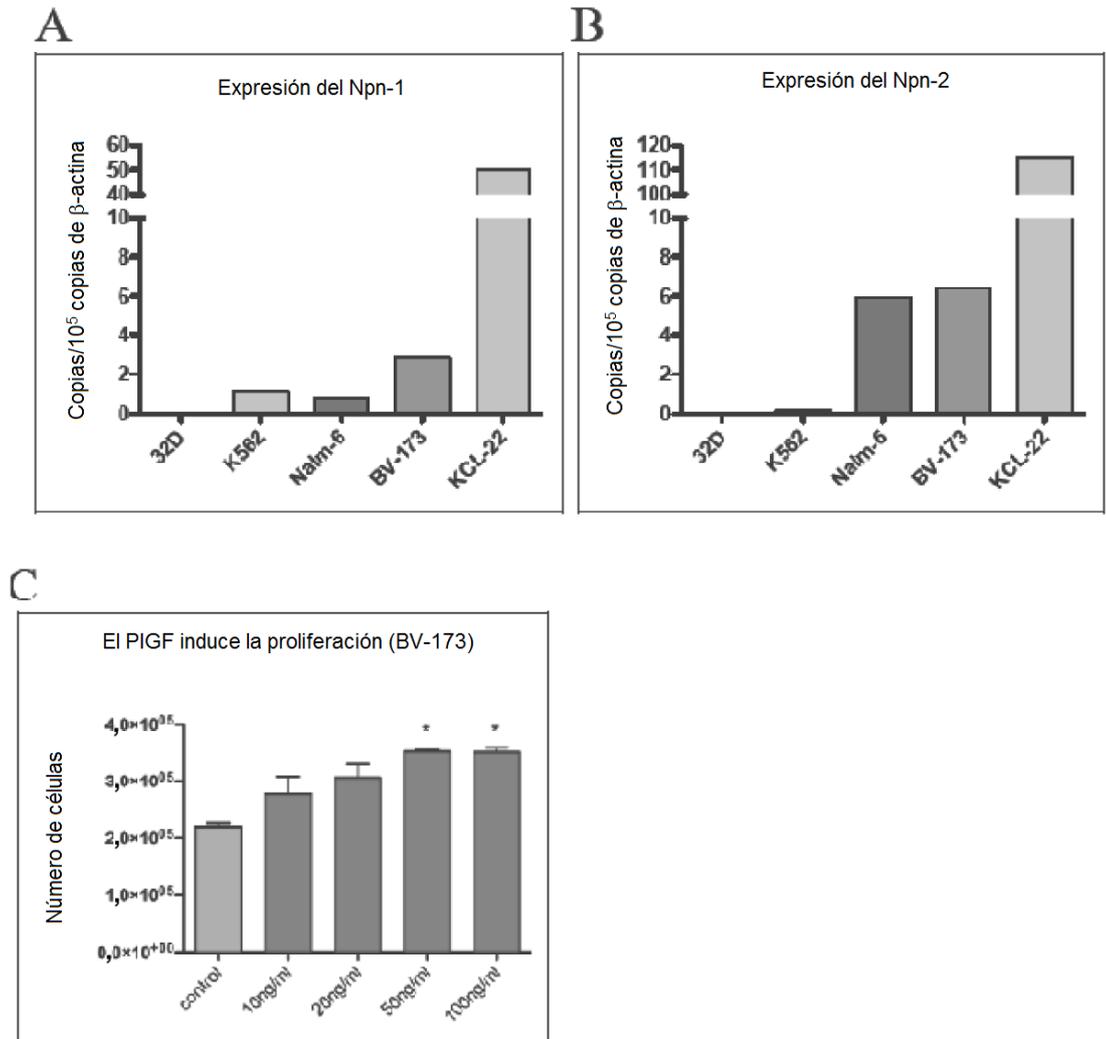
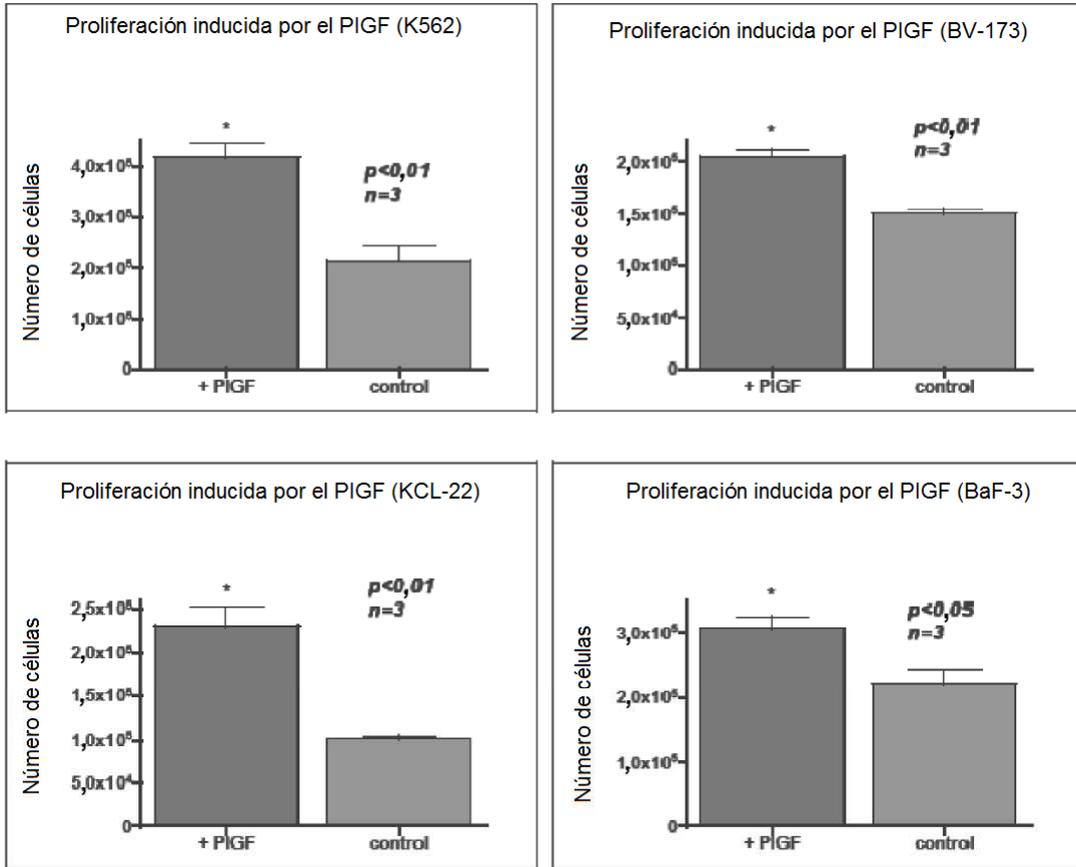


Figura 3

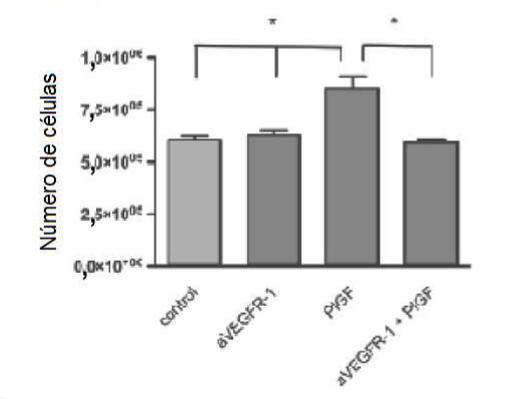


D



E

El α -VEGFR inhibe la proliferación inducida por el PIGF (BV-137)



F

El α PIGF inhibe la proliferación inducida por el PIGF (BV-173)

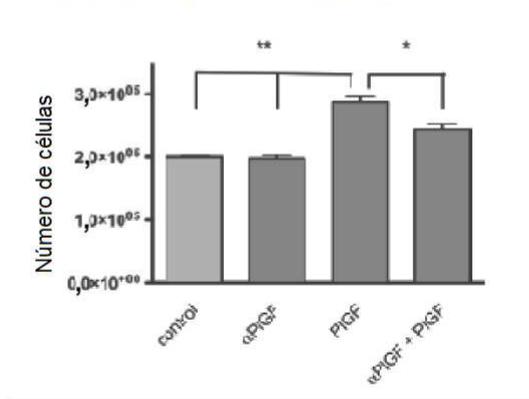


Figura 4

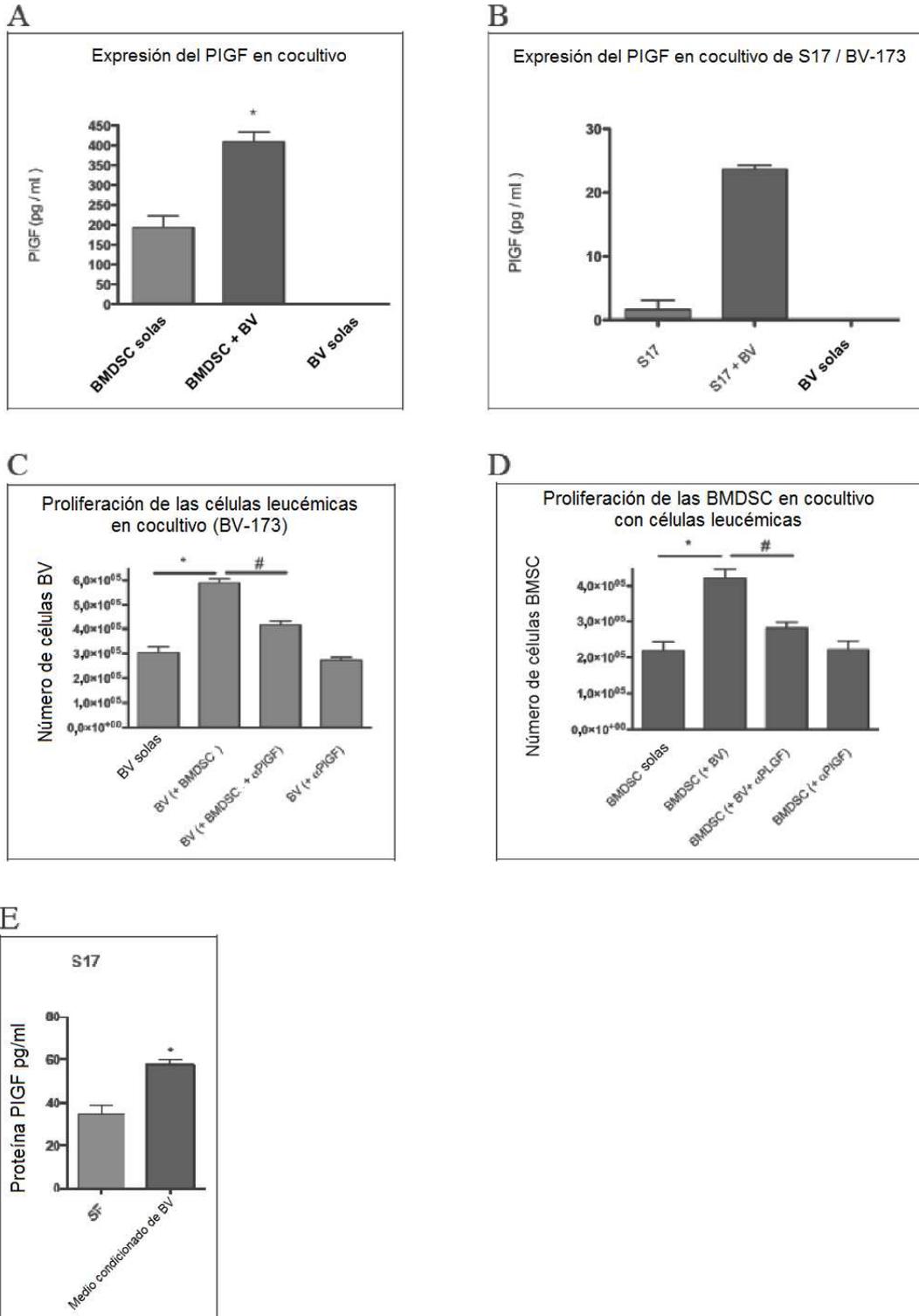
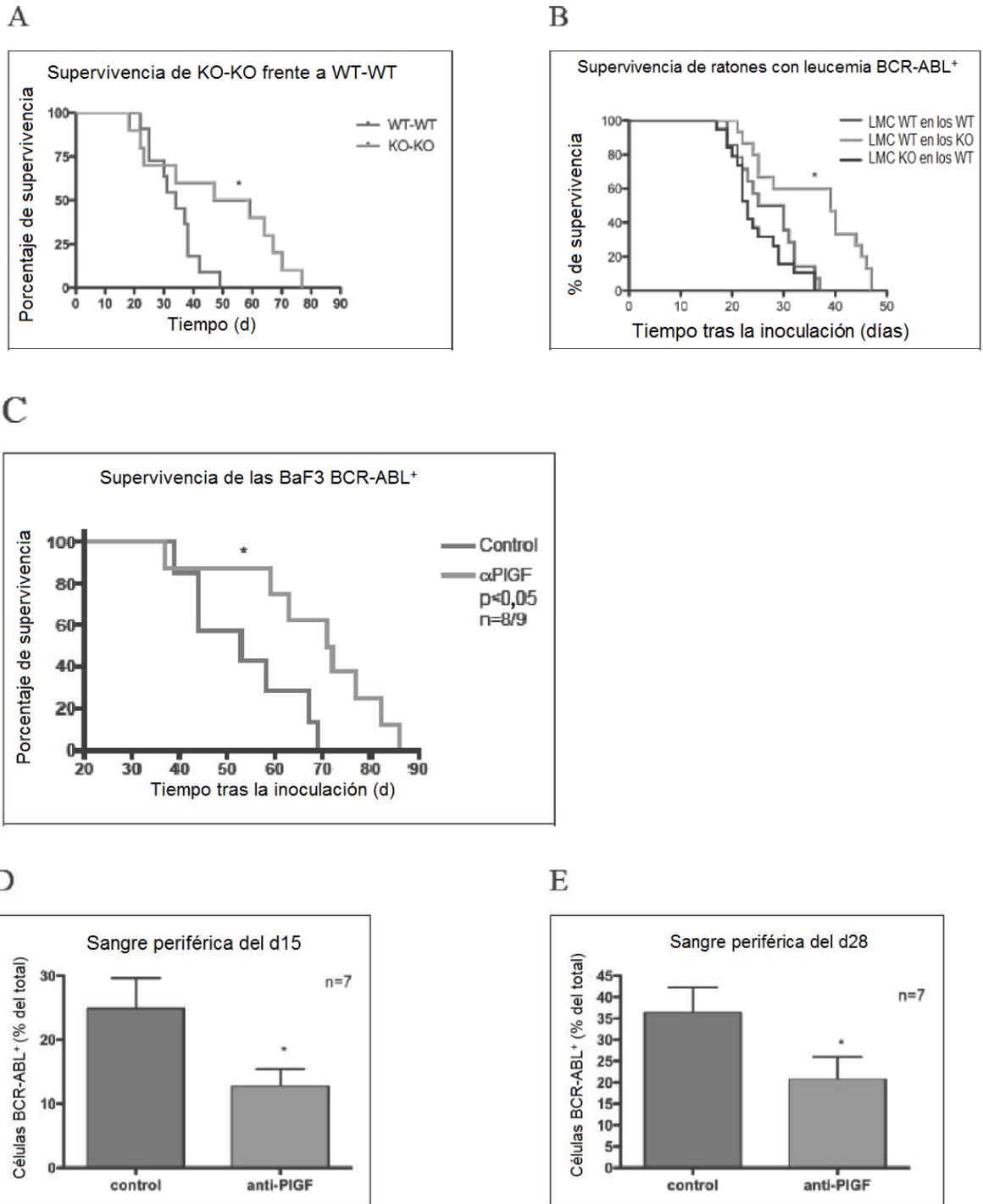
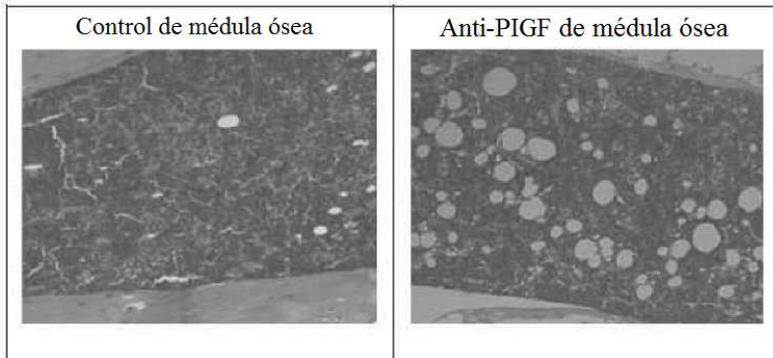


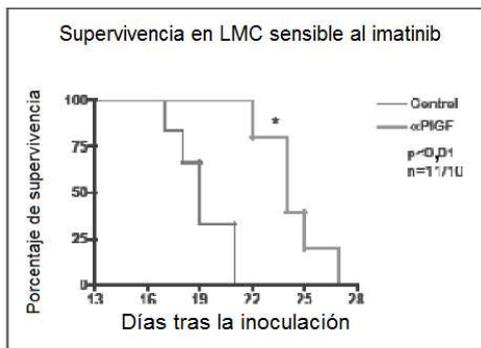
Figura 5



F



G



H

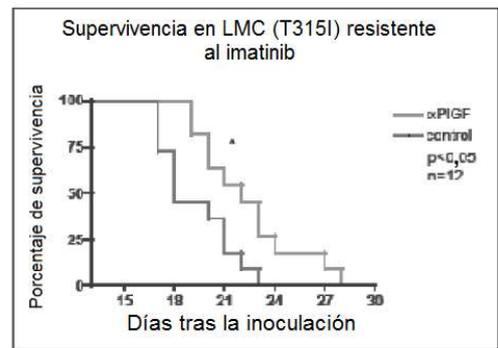
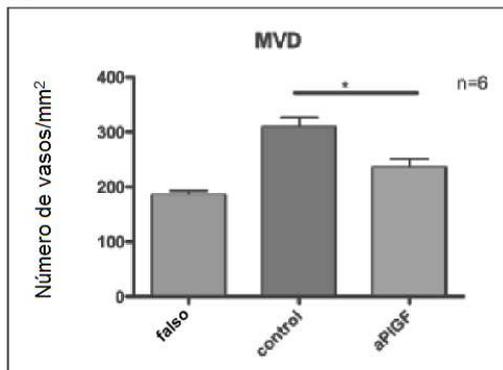
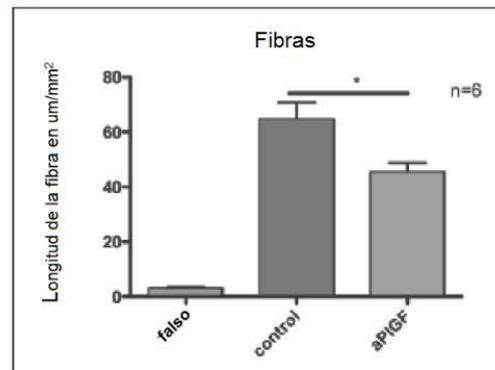


Figura 6

A



B



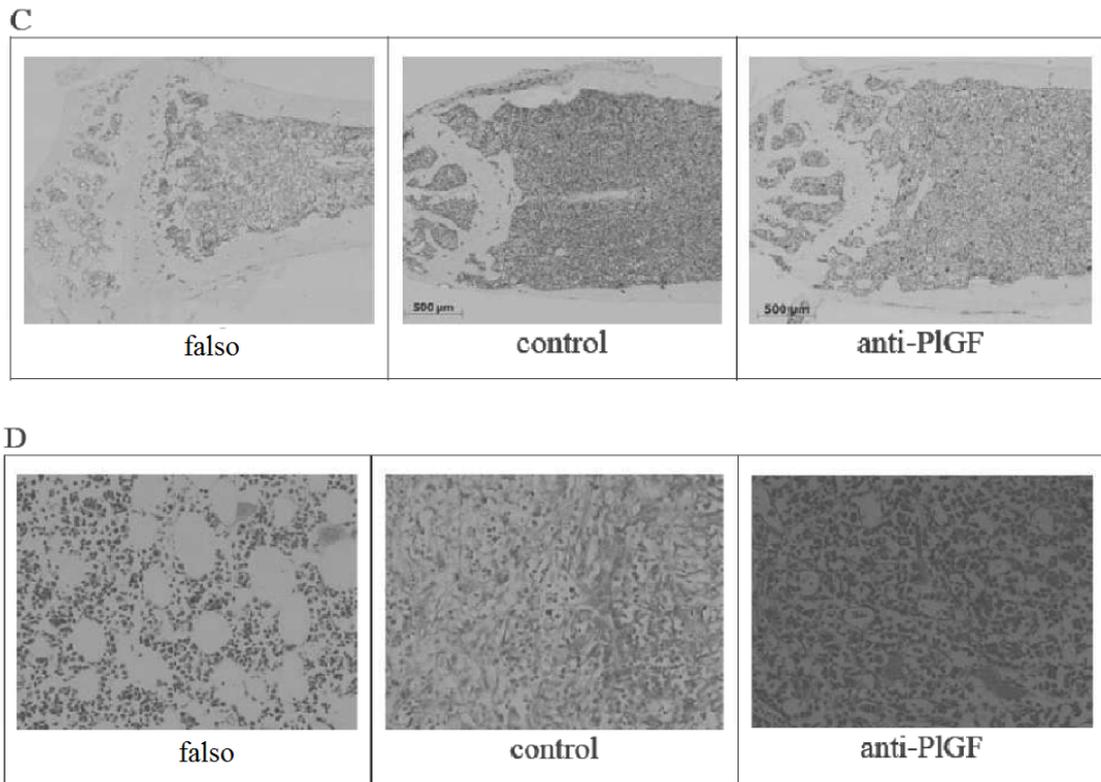


Figura 7

