

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 630 761**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
A61K 51/10 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.03.2001** **E 10183896 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2016** **EP 2329847**

54 Título: **Uso de un anticuerpo o una inmunotoxina que se une selectivamente a CD123 para dañar las células progenitoras de cáncer hematológico**

30 Prioridad:

06.03.2000 US 187123 P
24.08.2000 US 227295 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.08.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF KENTUCKY RESEARCH
FOUNDATION (100.0%)
Intellectual Property Development, A144 ASTeCC
Building
Lexington, KY 40506-0286, US**

72 Inventor/es:

JORDAN, CRAIG T.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 630 761 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

Uso de un anticuerpo o una inmunotoxina que se une selectivamente a CD123 para dañar las células progenitoras de cáncer hematológico

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere generalmente a dañar las células progenitoras de cáncer hematológico o a tratar cáncer hematológico tomando como diana un marcador de la superficie celular específico para células progenitoras de cáncer hematológico. La presente especificación también está relacionada con un método para diagnosticar cáncer hematológico.

Antecedentes de la invención

- 10 Las células madre se encuentran comúnmente en una variedad de sistemas tisulares de mamíferos. Aunque los criterios por los que se definen dichas células varían dependiendo del contexto específico, dos propiedades se consideran generalmente como características centrales de las poblaciones de células madre: (1) las células madre deben presentar alguna capacidad de auto-replicación o auto-renovación, y (2) las células madre deben ser capaces de diferenciarse en linajes apropiados (Potten CS: Stem Cells. Londres, Academic Press, 1997). Las células de esta
- 15 naturaleza se han descrito para un número de tejidos incluyendo sistemas hematopoyético, embrionario, neural, muscular y hepático (Lemischka IR. Clonal, *in vivo* behavior of the totipotent hematopoietic stem cell. Semin Immunol 1991, 3: 349-55; Morrison SJ, et al., The biology of hematopoietic stem cells. Annu.Rev.Cell Dev.Biol. 1995, 11: 35-71; Robertson EJ., Using embryonic stem cells to introduce mutations into the mouse germ line. Biol Reprod 1991, 44: 238-45; Gage FH., Mammalian neural stem cells. Science 2000, 287: 1433-8; y, Alison M, et al., Hepatic stem cells. J Hepatol 1998, 29: 676-82). Así, quizá no es sorprendente que células similares se hayan documentado
- 20 recientemente en el contexto de poblaciones malignas (Bonnet D, et al., Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nat.Med. 1997, 3: 730-737; Blair A, et al., Most acute myeloid leukemia progenitor cells with long-term proliferative ability *in vitro* and *in vivo* have the phenotype CD34(+)/CD71(-)/HLA-DR-. Blood 1998, 92: 4325-35; Cobaleda C, et al., A primitive hematopoietic cell is the target for the leukemic transformation in human Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. Blood 2000, 95: 1007-13). De hecho, una célula madre es en algunos aspectos la diana ideal para la transformación maligna ya que se requiere un cambio biológico relativamente pequeño. Como las células madre ya poseen la programación genética necesaria para ser altamente proliferativas y plásticas desde un punto de vista de desarrollo, se puede imaginar que perturbaciones relativamente pequeñas podrían ser suficientes para inducir enfermedad.
- 30 Un ejemplo de neoplasia que surge de células madre malignas se ha documentado recientemente en el sistema hematopoyético en el caso de leucemia mielógena aguda (AML). Esta enfermedad se caracteriza por la parada prematura del desarrollo mieloide y la acumulación posterior de grandes números de blastos leucémicos no funcionales. Aunque las células de blastos leucémicos tienen frecuentemente un origen clonal y presentan características relativamente homogéneas, se ha demostrado que dichas poblaciones están organizadas de una
- 35 manera jerárquica, análoga a los progenitores hematopoyéticos normales. Así, existe una población de células madre leucémica fenotípicamente definida que es suficiente para propagar los blastos leucémicos tanto *in vitro* como *in vivo* en modelos de ratón xenogénico de AML humana (Bonnet D, et al., Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nat.Med. 1997, 3: 730-737; Blair A, et al., Most acute myeloid leukemia progenitor cells with long-term proliferative ability *in vitro* and *in vivo* have the phenotype CD34(+)/CD71(-)/HLA-DR-. Blood 1998, 92: 4325-35; Cobaleda C, et al., A primitive hematopoietic cell is the target for the leukemic transformation in human Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. Blood 2000, 95: 1007-13; Blair A, et al. Lack of expression of Thy-1 (CD90) on acute myeloid leukemia cells with long-term proliferative ability *in vitro* and *in vivo*. Blood 1997, 89: 3104-12). El concepto de una célula madre leucémica (LSC) se vuelve críticamente importante cuando se considera la etiología de la enfermedad humana. Claramente, con el fin
- 45 de conseguir la remisión duradera, será necesario suprimir específicamente la población de LSC primitiva o progenitora. Sin embargo, estudios previos (Terpstra W, et al., Fluorouracil selectively spares acute myeloid leukemia cells with long-term growth abilities in immunodeficient mice and in culture. Blood 1996, 88: 1944-50), así como los datos de nuestro grupo, sugieren que las LSC son biológicamente distintas de los blastos leucémicos más maduros y pueden no responder a regímenes quimioterapéuticos convencionales. Esta observación es consistente con el perfil clínico observado frecuentemente para AML, en el que una mayoría de pacientes puede conseguir una remisión completa aparente, pero en la mayor parte de los casos recaerán (Schiller GJ., Treatment of resistant disease. Leukemia 1998, 12 Supl 1: S20-4; Paietta E., Classical multidrug resistance in acute myeloid leukemia. Med Oncol 1997, 14: 53-60). Si las LSC son más refractarias a quimioterapia que los blastos, es atractivo proponer que las células madre supervivientes son un factor contribuyente principal para la recaída leucémica. Así, las estrategias
- 55 que toman como diana específicamente células de leucemia progenitoras pueden proporcionar un tratamiento más efectivo para los pacientes con leucemia. En 1997, Bonnet y Dick describieron el fenotipo para las LSC como CD34+/CD38- (Bonnet D, et al., Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nat.Med. 1997, 3: 730-737). Reportamos que la cadena alfa del receptor de IL-3 (CD123) está altamente expresada en células leucémicas, pero no en células hematopoyéticas normales CD34+/CD38-. A la vista de este estado de la técnica, existe una necesidad en la técnica de proporcionar un método de diagnóstico para detectar leucemia en un estadio temprano, así como métodos más efectivos para tratar esta
- 60

enfermedad.

et al. (Blood 1996, 88: 1445-1456) describió la reactividad de una toxina de fusión con citoquina murina, toxina de difteria390-interleuquina-3 murina (DT390-mIL-3) con células progenitoras de médula ósea.

5 WO 97/24373 describe un anticuerpo monoclonal anti-cadena alfa del receptor de IL-3 producido por una línea celular de hibridoma designado 7G3, que actúa como un antagonista de IL-3 *in vitro* y se une de forma competitiva a IL-3. WO 97/24373 describe además que el tratamiento con este anticuerpo o un fragmento de éste, antagonizando IL-3, puede ser adecuado para tratar leucemias mieloides, linfomas tales como linfomas de células B foliculares, o el alivio de alergias.

10 Sun et al. (Blood 1996, 87: 83-82) también describió el anticuerpo monoclonal 7G3 y sugirió que este anticuerpo puede tener significancia clínica para antagonizar IL-3 en afecciones patológicas tales como algunas leucemias mieloides, linfoma de células B folicular y alergia.

Koubek et al. (Eur. J. Haematol. 1999; 63: 1-10) describen la expresión de receptores de citoquina en diferentes células leucémicas linfoides.

15 Rosenblum et al. (Clin. Cancer Res. 1999, 5: 865-874) describieron inmunotoxinas recombinantes dirigidas frente al producto del oncogén c-erb-2(HER2/neu y el estudio de su citotoxicidad *in vitro*, farmacocinética y eficacia *in vivo* en modelos de xenoinjerto.

20 Por ejemplo, Jordan et al. (Blood, Vlo. 94, No. 10, Supl. No. 1 (parte 1 de 2). página 67a, Resumen No. 288) describen que CD123 se expresa en una población de células de AML CD34+/CD38- y concluye que la presencia de CD123 proporciona un marcador único por el que las células leucémicas primitivas CD34+/CD38- pueden distinguirse de las células CD34+/CD38- normales. Jordan et al. describen además que CD123 puede tener utilidad diagnóstica o proporcionar una diana para la intervención inmunoterapéutica.

Compendio de la invención

25 La presente invención se refiere generalmente al uso de compuestos que se unen a la molécula CD123 humana (ectopéptido CD123), en el diagnóstico y tratamiento de cánceres hematológicos (por ejemplo, leucemias y trastornos linfoproliferativos malignos). Los compuestos y miméticos específicos de CD123 tienen una utilidad particular como fármacos y reactivos para la terapia de cáncer hematológico o estados patológicos malignos y para el diagnóstico de estados patológicos de cáncer hematológico.

30 En un aspecto, la presente invención se refiere a dañar una célula progenitora de cáncer hematológico que comprende poner en contacto la célula con un compuesto que se une selectivamente a CD123 en una cantidad efectiva para dañar la célula de cáncer hematológico progenitora. Esta etapa de contacto puede ocurrir en varios entornos, incluyendo *in vitro* e *in vivo* en el cuerpo de un animal, incluyendo un ser humano. Específicamente, la invención proporciona un anticuerpo que se une selectivamente a CD123 y mata las células madre leucémicas para uso en un método de tratamiento de un paciente humano que tiene una leucemia, en el que la leucemia es síndrome mielodisplásico (MDS). Así, en el contexto del aspecto terapéutico de la presente invención, la referencia a un compuesto específico de CD123 debe entenderse como una referencia a un anticuerpo que se une selectivamente a CD123. En una realización, las células madre leucémicas son células madre AML CD34+/CD38-. En una realización adicional, las células madre AML CD34+/CD38- son además CD131-. En una realización adicional, las células madre leucémicas son de la médula ósea del paciente.

40 A lo largo de esta solicitud, se hará referencia específicamente a leucemia para describir determinados aspectos de la presente invención. En el contexto de la presente invención, la referencia a leucemia debe entenderse como referencia a MDS. Sin embargo, la descripción de la presente solicitud no está limitada sólo al diagnóstico y tratamiento de leucemia o trastornos linfoproliferativos malignos, sino a cualquier enfermedad en la que las células cancerosas expresan selectivamente CD123, que incluyen el género de cáncer hematológico.

45 En otro aspecto, la presente invención está dirigida a un método para detectar la presencia de CD123 en una célula progenitora de leucemia. Así, la invención también está dirigida a un método para diagnosticar leucemia. Se entiende que mediante el uso de un ligando marcado para unirse a CD123, es posible detectar la presencia de células progenitoras de leucemia. Así, también es posible diagnosticar la probabilidad del inicio de leucemia en pacientes que poseen dichas células progenitoras de leucemia que expresan CD123. El ligando de unión a CD123 puede ser un anticuerpo frente a CD123, o puede ser cualquiera de una variedad de moléculas que se unen específicamente a CD123. Además, el marcador puede elegirse de cualquiera de una variedad de moléculas, incluyendo, pero no limitado a, compuestos enzimáticos, o compuestos no enzimáticos que sirven como un informador de la presencia del ligando que se ha unido a la molécula CD123. Los ejemplos de dichos marcadores incluyen aquellos que son, por ejemplo, radiactivos, fluorescentes, quimioluminiscentes o basados en absorbente, o una combinación de los anteriores. En una realización, se proporciona un ensayo para detectar la presencia de células progenitoras de leucemia en una muestra mediante la detección de la presencia de CD123 en la muestra, que puede conseguirse mediante la introducción de un compuesto que se une selectivamente a CD123 y determinación de si el compuesto se une a un componente de la muestra.

La presente solicitud también describe compuestos o moléculas que mimetizan (miméticos) la estructura tridimensional de parte o todo de los compuestos tales como péptidos, anticuerpos, carbohidratos, lípidos o ácidos nucleicos que se unen a CD123, y en el caso de anticuerpos, de los bolsillos de unión de los anticuerpos, o de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR).

- 5 La presente solicitud también describe preparaciones farmacéuticas que comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable; y uno cualquiera o más de los compuestos y miméticos específicos para CD123 descritos anteriormente.

- 10 La presente solicitud también describe un método para el tratamiento de leucemia, que comprende administrar a un sujeto humano u otro animal que necesita dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente efectiva de los compuestos o sus composiciones farmacéuticas miméticas descritas anteriormente.

- 15 La presente invención tiene como objetivo purgar selectivamente células madre leucémicas de la médula ósea. Estas células madre pueden dar lugar a células progenitoras de leucemia, o pueden ser las células progenitoras, que pueden dañarse por el método de la invención usando un anticuerpo anti-CD123 que puede ponerse en contacto bien con una muestra de médula ósea o inyectarse en una médula ósea de un individuo, destruyendo de esta manera al menos algunas de las células madre leucémicas en la médula ósea.

Descripción breve de los dibujos

La presente invención se entenderá más completamente a partir de la descripción detallada proporcionada en la presente memoria a continuación, y los dibujos adjuntos que se proporcionan sólo como ilustración, y así no son limitantes de la presente invención, y en los que:

- 20 Las Figuras 1 A y 1 B muestran la expresión de CD123 en células hematopoyéticas normales y leucémicas. Se proporcionan ejemplos representativos de marcaje de CD123 en células derivadas de médula ósea normal (panel A) o sangre periférica de AML primaria (panel B). El polígono insertado en el panel A (representación de puntos a la izquierda) indica el porcentaje de médula ósea total que es positiva para expresión de CD123 (7%). La ventana rectangular más pequeña indica la proporción de médula total fuertemente positiva para CD123 (1%). La representación de puntos del centro en el panel A muestra la médula ósea que se enriqueció para células CD34+ por selección en una columna de inmunoafinidad (véanse métodos). Las ventanas indican la población CD34+ total y la población CD34+/CD38-. Los histogramas indican el marcaje de CD123 para las dos poblaciones seleccionadas. El panel B muestra el mismo análisis para la muestra de AML primaria. Los marcadores M1 en los histogramas indican los niveles de expresión que son mayores de 99% de las muestras de control de isotipo. Para cada muestra, se analizaron 50.000-100.006 eventos.

- 35 La Figura 2 muestra la expresión de CD123 en cinco poblaciones AML primitivas. Las cinco muestras de AML primaria se marcaron con CD34, CD38, y CD123 y se analizaron por citometría de flujo. La figura muestra el marcaje de CD123 para las poblaciones seleccionadas CD34+/CD38- de cada muestra. Las secciones oscuras indican tinción de CD123 y las secciones claras indican marcaje paralelo con un anticuerpo de control de isotipo. Los marcadores M1 en los histogramas indican los niveles de expresión que son mayores de 99% de las muestras de control de isotipo. Para cada muestra, se analizaron 50.000-100.000 eventos.

- 40 Las Figuras 3A y 3B muestran el prendimiento de células AML CD123+ en ratones NOD/SCID. Las células de AML primaria CD34+/CD123+ seleccionadas se trasplantaron en un ratón NOD/SCID irradiado. Seis semanas después del trasplante, las células de la médula ósea se aislaron y analizaron para la presencia de células leucémicas (CD45+) humanas. El panel A muestra el perfil de CD34 frente a CD45 de una muestra injertada usando anticuerpos que son específicos para células humanas. El panel B muestra el perfil de CD34 frente a CD123 de la población de células humanas CD45+ seleccionada. Para cada muestra, se analizaron 50.000 eventos.

- 45 La Figura 4 muestra el análisis por inmunotransferencia de CD123 y CD131 de muestras de AML primaria. Se obtuvieron cinco muestras de AML primaria de sangre periférica y se separaron para aislar la población CD34+, asegurando así una muestra leucémica virtualmente pura. Además, se incluyeron la línea celular leucémica TF-1 (TF-1) y células de médula normales CD34+ (CD34+ normales) como controles. Se prepararon lisados de cada población, se sometieron a PAGE desnaturizante y se analizaron por inmunotransferencia con un anticuerpo anti-CD123 (panel superior) o un anticuerpo anti-CD131 (panel inferior). La cabeza de flecha a la izquierda de cada panel indica la posición de las cadenas IL-3R α (CD123) e IL-3R β (CD131), respectivamente.

- 50 Las Figuras 5A, 5B y 5C muestran la fosforilación de componentes de la transducción de la señal en respuesta a IL-3. Se obtuvieron tres muestras de AML primaria (Carriles 1-3) de sangre periférica y se separaron para aislar la población CD34+. Las muestras se trataron con (+) o sin (-) 20 ng/ml de IL-3 durante 15 minutos, se lisaron y se sometieron a PAGE. Cada gel se electrotransfirió y las membranas se ensayaron con anticuerpos específicos para la proteína total o fosforilada para Akt (A), Stat5 (B), y Mek-1 (C). El carril marcado C en cada transferencia es un anticuerpo control y se obtiene de células NIH 3T3 tratadas +/- 50 ng/ml de PDGF (A y C), o células TF-1 tratadas +/- 25 ng/ml de GM-CSF (B).

Las Figuras 6A, 6B y 6C muestran la expresión de CD123 en ALL primaria. Análisis por citometría de flujo de la

expresión de CD123 en tres muestras independientes de ALL (leucemia linfocítica aguda) primaria. El marcaje de CD123 se muestra por las representaciones llenas (oscuras) y los controles se muestran por representaciones abiertas.

- 5 Las Figuras 7A, 7B y 7C muestran la expresión de CD123 en CML primaria. Análisis por citometría de flujo de la expresión de CD123 en tres muestras independientes de CML (leucemia mielógena crónica) primaria. El marcaje de CD123 se muestra por las representaciones llenas (oscuras) y los controles se muestran por representaciones abiertas.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

- 10 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo" significa una molécula de inmunoglobulina, o un fragmento de una molécula de inmunoglobulina, que tiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno particular. Los anticuerpos son muy conocidos por los expertos en la ciencia de la inmunología. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo" significa no sólo moléculas de anticuerpo intactas sino también fragmentos de moléculas de anticuerpo que retienen la capacidad de unión a antígeno. Dichos fragmentos también son muy conocidos en la técnica y se emplean regularmente tanto *in vitro* como *in vivo*. En particular, tal y como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo" significa no sólo moléculas de inmunoglobulina intactas sino también los fragmentos activos muy conocidos F(ab')₂, Fab, Fv, Fd, V_H y V_L.

Tal y como se usan en la presente memoria, los términos "se unen" o "se une" significarán cualquier interacción, ya sea por medio directo o indirecto, que afecta el receptor o subunidad de receptor especificada.

- 20 Tal y como se usan en la presente memoria, los términos "se une selectivamente a" significarán que el compuesto, composición, formulación, etc. no se une significativamente a la cadena beta de IL3R, pero sí se une a la cadena alfa de IL3R.

- 25 Tal y como se usan en la presente memoria, los términos "CD123", "subunidad alfa de IL3R" e "IL3R α " se usarán indistintamente para significar un determinante antigénico que es detectable en células precursoras de leucemia como se describe en la presente memoria, pero que no es detectable en células normales como se describe en la presente memoria.

- 30 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "compuesto" significará cualquier pureza de ingrediente activo, incluyendo formulaciones, composiciones, plantas o animales naturales, etc. El compuesto puede incluir moléculas que son naturales, tales como proteínas, ácidos nucleicos, ácidos nucleicos monocatenarios, lípidos, carbohidratos, y anticuerpos. Sin embargo, pueden prepararse versiones sintéticas de estas moléculas naturales, siempre que se unan a CD123. Los compuestos pueden comprender más de un componente. Por ejemplo, un compuesto puede ser un anticuerpo monoclonal unido a una toxina. O, puede ser un lípido unido a una etiqueta. Los compuestos pueden comprender además miméticos, y aptámeros, pero que todos retienen su especificidad para CD123.

- 35 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "dañar" significará cualquier disminución en la funcionalidad o actividad (incluyendo actividad de crecimiento o proliferativa).

- 40 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "cáncer hematológico" se refiere a un cáncer de la sangre, e incluye leucemia y trastornos linfoproliferativos malignos, entre otros. "Leucemia" se refiere a un cáncer de la sangre, en el que se producen demasiadas células blancas de la sangre que son inefectivas para luchar contra la infección, desplazando de esta manera las demás partes que forman la sangre, tales como plaquetas y células rojas de la sangre. Se entiende que los casos de leucemia se clasifican como agudos o crónicos. Las células cancerosas en leucemias agudas se bloquean en un estadio inmaduro. Sin embargo, continúan multiplicándose. Consecuentemente, hay una gran acumulación de células inmaduras no funcionales y la pérdida concomitante de células funcionales. Las leucemias crónicas progresan más lentamente, con las células cancerosas desarrollándose hasta madurez completa. Además, las células blancas de la sangre pueden ser mielógenas o linfocíticas. Así, determinadas formas de leucemia pueden ser, como ejemplo, leucemia linfocítica (o linfoblástica) aguda (ALL); leucemia mielógena aguda (AML); leucemia linfocítica crónica (CLL); o leucemia mielogénica crónica (CML); y síndrome mielodisplásico. Los "trastornos linfoproliferativos malignos" puede referirse a un linfoma, tal como mieloma múltiple, linfoma no de Hodgkin, linfoma de Burkitt, y linfoma folicular (de células pequeñas y de células grandes), entre otros. Para los propósitos de esta invención, al menos algunas de las células de cáncer hematológico se caracterizan por células que expresan CD123. También, para los propósitos de esta solicitud, siempre que se mencionan leucemia o trastornos linfoproliferativos malignos, el método de diagnóstico y tratamiento se aplica generalmente a cáncer hematológico.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "introducir" significará cualquier medio de administración, ya sea *in vivo* o *in vitro*, incluyendo simple contacto.

- 55 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "mimético" significa un compuesto o molécula que mimetiza las estructuras tridimensionales de un sitio en CD123 al que puede unirse un compuesto, o el compuesto puede ser

una molécula que mimetiza una molécula que se une a CD123. En el caso de un sitio de unión de un anticuerpo anti-CD123, o paratopo, o sitio activo, "mimético" significa un compuesto que mimetiza la estructura tridimensional de cualquier combinación de los bucles hipervariables o regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del anticuerpo.

5 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "mimetiza" significa el posicionamiento tridimensional de átomos del mimético de manera que existen fuerzas iónicas, fuerzas covalentes, fuerzas de van der Waal u otras fuerzas similares, y complementariedad de carga, o complementariedad electrostática, similar, entre los átomos del mimético y los átomos del sitio de unión del compuesto tal como un péptido o un anticuerpo de manera que el mimético tiene una afinidad de unión similar para CD123 que el compuesto parental y/o de manera que el mimético
10 tiene un efecto similar en la función de CD123 *in vitro* o *in vivo*.

En el caso de los anticuerpos anti-CD123, en la parte de unión a antígeno de un anticuerpo, como es muy conocido en la técnica, existen regiones determinantes de la complementariedad (CDR), que interaccionan directamente con el epítipo del antígeno, y regiones marco (FR), que mantienen la estructura terciaria del paratopo. Tanto en el fragmento Fd de cadena pesada como en la cadena ligera de las inmunoglobulinas IgG, hay cuatro regiones marco
15 (FR1 a FR4) separadas respectivamente por tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR1 a CDR3). Las CDR, y en particular las regiones CDR3, y más particularmente la CDR3 de cadena pesada, son en gran medida responsables de la especificidad del anticuerpo.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "normal" significa cualesquiera células o condiciones no patogénicas o no relacionadas con patología.

20 Tal y como se usan en la presente memoria, los términos "primitivo" y "progenitor" serán intercambiables.

Tal y como se usa en la presente memoria, respecto a polipéptidos y anticuerpos, el término "sustancialmente puro" significa que los polipéptidos carecen sustancialmente de otras sustancias con las que pueden encontrarse en la naturaleza o en sistemas *in vivo* hasta un grado práctico y apropiado para su uso pretendido. En particular, los polipéptidos son lo suficientemente puros y carecen sustancialmente de otros constituyentes biológicos de sus células huésped como para ser útiles, por ejemplo, en la generación de anticuerpos, secuenciación, o producción de preparaciones farmacéuticas. Por técnicas muy conocidas en la técnica, pueden producirse polipéptidos sustancialmente puros a la luz de las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos descritas en la presente memoria. Debido a que un polipéptido sustancialmente purificado puede mezclarse con un vehículo farmacéuticamente aceptable en una preparación farmacéutica, el polipéptido puede comprender sólo un pequeño porcentaje en peso de la preparación. El polipéptido es sin embargo sustancialmente puro ya que se ha separado sustancialmente de sustancias con las que puede estar asociado en los sistemas vivos.
25
30

Tal y como se usa en la presente memoria, respecto a compuestos o miméticos, el término "sustancialmente puro" significa que los compuestos carecen sustancialmente de otras sustancias con las que pueden encontrarse en la naturaleza, en sistemas *in vivo*, o como resultado de síntesis química u otra, hasta un grado práctico y apropiado para su uso pretendido. En particular, los compuestos son lo suficientemente puros y carecen sustancialmente de otros constituyentes biológicos de sus células huésped, o constituyentes químicos o físicos de sus síntesis, como para ser útiles en la producción de preparaciones farmacéuticas. Por técnicas muy conocidas en la técnica (Patente de los Estados Unidos 5648379; Colman, P.G. Protein Science 3: 1687-1696, 1994; Malby, et al., Structure 2: 733-746, 1994; McCoy et al., J. Molecular Biol. 268: 570-584, 1997), pueden diseñarse compuestos o miméticos sustancialmente puros. Debido a que un compuesto sustancialmente purificado puede mezclarse con un vehículo farmacéuticamente aceptable en una preparación farmacéutica, el compuesto puede comprender sólo un pequeño porcentaje en peso de la preparación. El compuesto es sin embargo sustancialmente puro ya que se ha separado sustancialmente de sustancias con las que puede estar asociado en los sistemas vivos, químicos u otros.
35
40

Miméticos que se unen a CD123

45 Pueden encontrarse compuestos que tienen como diana CD123. Pueden usarse bibliotecas de exposición en fago para determinar el ADN que codifica el polipéptido que se une a CD123. Los principios de esta estrategia se describen en la Patente U.S. No. 5.837.500.

Otras moléculas no peptídicas que pueden unirse a CD123 incluyen ácidos nucleicos, y liposomas. También pueden usarse carbohidratos para tomar como diana CD123. Es posible que el compuesto pueda no ser una molécula biológica natural. Dichos químicos pueden prepararse por bibliotecas combinatorias que son muy conocidas en la técnica, siendo el objetivo del ensayo la unión del compuesto químico a CD123. Los liposomas pueden acomodar determinadas toxinas u otras sustancias dañinas para las células o pueden usarse compuestos de formación de imágenes celulares para tomar como diana CD123. Se contemplan por el método de la invención numerosas variaciones y combinaciones de compuestos como agentes de direccionamiento, siempre que CD123 sea la diana, con el conocimiento de que se mantiene en mente la detección de la leucemia y el tratamiento de la leucemia.
50
55

Miméticos de anticuerpos anti-CD123

También es posible usar la tecnología de anti-idiotipo para aislar o cribar compuestos o miméticos que mimetizan un

epítopo. Así, un anticuerpo monoclonal anti-idiotípico que es la imagen del epítopo unido por el primer anticuerpo monoclonal, ya que actúa efectivamente como un antígeno, puede usarse para aislar miméticos de una biblioteca química combinatoria, u otras bibliotecas, de compuestos químicos u otros compuestos, tal como bibliotecas de exposición en fago de péptidos (Scott y Smith, Science 249: 386-390, 1990; Scott y Craig, Curr. Opin. Biotechnol. 5: 40-48, 1992; Bonnycastle et al., J. Mol. Biol. 258: 747-762, 1996). Por lo tanto, pueden clonarse péptidos o péptidos constreñidos que mimetizan proteínas u otros compuestos, incluyendo aquellos con restos de ácido nucleico, lípido, carbohidrato u otros restos (Harris et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 94: 2454-2459, 1997).

Pueden diseñarse moléculas puramente sintéticas, que pueden no aparecer en la naturaleza y, por lo tanto, son más resistentes a catabolismo, excreción o degradación, por el posicionamiento tridimensional de átomos, de manera que existen fuerzas iónicas, fuerzas covalentes, fuerzas de van der Waal u otras fuerzas similares, y complementariedad de carga, o complementariedad electrostática, similar, entre los átomos del mimético y los átomos del sitio de unión antigénico o epítopo. Estos miméticos pueden cribarse para unión de alta afinidad a CD123 y detectar y/o dañar la célula que porta CD123 *in vitro* o *in vivo*, como se describe con más detalle más adelante.

Preparaciones de diagnóstico y farmacéuticas

La descripción también se refiere a un método para preparar composiciones de diagnóstico o farmacéuticas que comprenden el compuesto de unión a CD123 y sus miméticos. La preparación farmacéutica incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dichos vehículos, tal y como se usa en la presente memoria, significan materiales no tóxicos que no interfieren con la eficacia de la actividad biológica de los ingredientes activos. El término "fisiológicamente aceptable" se refiere a un material no tóxico que es compatible con un sistema biológico tal como una célula, cultivo celular, tejido, u organismo. Las características del vehículo dependerán de la ruta de administración. Los vehículos fisiológicamente y farmacéuticamente aceptables incluyen diluyentes, materiales de relleno, sales, tampones, estabilizantes, solubilizantes, y otros materiales que son muy conocidos en la técnica.

Los anticuerpos anti-CD123 y miméticos pueden marcarse por una variedad de medios para uso en aplicaciones de diagnóstico y/o farmacéuticas. Hay diferentes marcadores y métodos de marcaje conocidos para los expertos en la técnica. Los ejemplos de tipos de marcadores que pueden usarse en la presente invención incluyen enzimas, radioisótopos, compuestos fluorescentes, metales coloidales, compuestos quimioluminiscentes, y compuestos bioluminiscentes. Los expertos en la técnica conocerán otros marcadores adecuados para unirse al compuesto de unión a CD123, tales como anticuerpos monoclonales, o miméticos de éstos, o serán capaces de averiguarlo tal como, usando experimentación rutinaria. Además, la unión de estos marcadores a los compuestos específicos para CD123 o sus miméticos puede hacerse usando técnicas estándar comunes para los expertos en la técnica.

En el caso de anticuerpos, otra técnica de marcaje que puede resultar en una mayor sensibilidad consiste en acoplar los anticuerpos o miméticos a haptenos de bajo peso molecular. Estos haptenos pueden alterarse específicamente mediante una segunda reacción. Por ejemplo, es común usar haptenos tales como biotina, que reacciona con avidina, o dinitrofenol, piridoxal, o fluoresceína, que puede reaccionar con anticuerpos anti-hapteno específicos.

Kits de diagnóstico y tratamiento

Los materiales para uso en el ensayo de la invención son adecuados idealmente para la preparación de un kit. Dicho kit puede comprender un medio vehicular que está compartimentalizado para recibir en confinamiento cercano uno o más medios de contenedor tales como viales, tubos y semejantes, comprendiendo cada medio de contenedor uno de los elementos separados que se van a usar en el método. Por ejemplo, uno de los medios de contenedor puede comprender un compuesto que se une a CD123, tal como un anticuerpo monoclonal, o un mimético de éste, que está, o puede estar, marcado de forma detectable con un marcador que es adecuado para propósitos de diagnóstico o si desea tratamiento, un agente citotóxico o dañino. En el caso de un kit de diagnóstico, el kit también puede tener contenedores que contienen tampón o tampones y/o un contenedor que comprende un medio informador, tal como una proteína de unión a biotina, tal como avidina o estreptavidina, unido a una molécula informadora, tal como un marcador enzimático o fluorescente. Además del material químico, se incluye por supuesto un medio de instrucciones para usar el kit, preferiblemente bien para diagnosticar leucemia, o tratar leucemia. Los medios de instrucciones pueden estar escritos en el vial, tubo y semejantes, o escritos en un papel separado, o en la parte exterior o interior del contenedor. Las instrucciones también pueden estar en la forma de un formato multimedia, tal como CD, disco de ordenador, vídeo etc.

Preparación de inmunotoxinas

Aunque la preparación de inmunotoxinas es muy conocida, en general, en la técnica (véanse, por ejemplo, las Pat. U.S. Nos. 4.340.535 y EP 44167), los inventores son conscientes de que pueden conseguirse determinadas ventajas mediante la aplicación de una determinada tecnología preferida, tanto en la preparación de las inmunotoxinas como en su purificación para la administración clínica posterior. Por ejemplo, aunque las inmunotoxinas basadas en IgG presentarán típicamente una mejor capacidad de unión y un aclaramiento de la sangre más lento que sus equivalentes Fab', las inmunotoxinas basadas en el fragmento Fab' presentarán generalmente una mejor capacidad de penetrar en los tejidos comparadas con inmunotoxinas basadas en IgG.

Además, aunque se conocen numerosos tipos de conectores que contienen enlace disulfuro que pueden emplearse

con éxito para conjugar el resto de toxina con el agente de unión, se preferirán generalmente determinados conectores sobre otros conectores, sobre la base de diferentes características y capacidades farmacológicas. Por ejemplo, se prefieren los conectores que contienen un enlace disulfuro que está "impedido" estéricamente, debido a su mayor estabilidad in vivo, evitando de esta manera la liberación del resto de toxina antes de su unión al sitio de acción.

Los reactivos de entrecruzamiento se usan para formar puentes moleculares que unen conjuntamente grupos funcionales de dos proteínas diferentes (por ejemplo, una toxina y un agente de unión). Para unir dos proteínas diferentes de una manera por etapas, pueden usarse entrecruzadores hetero bifuncionales que eliminan la formación no deseada de homopolímeros. Un entrecruzador hetero bifuncional ejemplar contiene dos grupos reactivos: uno que reacciona con grupo amina primaria (por ejemplo, N-hidroxi-succinimida) y el otro que reacciona con un grupo tiol (por ejemplo, disulfuro de piridilo, maleimidias, halógenos, etc.). A través del grupo reactivo amina primaria, el entrecruzador puede reaccionar con el o los residuos de lisina de una proteína (por ejemplo, el anticuerpo o fragmentos seleccionados) y a través del grupo reactivo tiol, el entrecruzador, ya unido a la primera proteína, reacciona con el residuo de cisteína (grupo sulhidrilo libre) de la otra proteína (por ejemplo, dgA).

El brazo espaciador entre estos dos grupos reactivos de cualesquiera entrecruzadores puede tener varias longitudes y composiciones químicas. Un brazo espaciador más largo permite una mejor flexibilidad de los componentes del conjugado mientras algunos componentes particulares en el puente (por ejemplo, grupo benceno) pueden prestar una estabilidad extra al grupo reactivo o una resistencia incrementada de la unión química a la acción de varios aspectos (por ejemplo, enlace disulfuro resistente a agentes reductores).

El reactivo de entrecruzamiento más preferido es SMPT, que es un entrecruzador bifuncional que contiene un enlace disulfuro que está "impedido estéricamente" por un anillo benceno adyacente y grupos metilo. Se cree que el impedimento estérico del enlace disulfuro cumple una función de proteger el enlace del ataque por aniones tiolato tal como glutatión que pueden estar presentes en tejidos y sangre, y de esta manera ayuda a evitar el desacoplamiento del conjugado antes de su administración al sitio de acción por el agente de unión. El reactivo de entrecruzamiento SMPT, como con muchos otros reactivos de entrecruzamiento conocidos, presta la capacidad de entrecruzar grupos funcionales tales como el SH de cisteína o aminas primarias (por ejemplo, el grupo amino épsilon de lisina). Otro tipo posible de entrecruzador incluye fenilazidas fotoreactivas hetero-bifuncionales que contienen un enlace disulfuro escindible tal como sulfosuccinimidil-2-(p-azido salicilamido) etil-1,3'-ditiopropionato. El grupo N-hidroxi-succinimidilo reacciona con los grupos amino primarios y la fenilazida (después de fotólisis) reacciona de forma no selectiva con cualquier residuo de aminoácido.

Aunque los entrecruzadores "impedidos" se preferirán generalmente en la práctica de la invención, pueden emplearse conectores no impedidos y se averiguarán no obstante las ventajas según esto. Otros entrecruzadores útiles, que no se considera que contienen o generan un disulfuro protegido, incluyen SATA, SPDP y 2-iminotiolano. El uso de dichos entrecruzadores se entiende bien en la técnica.

Una vez conjugado, será importante purificar el conjugado de manera que se eliminen los contaminantes tales como cadena A o agente de unión no conjugado. Es importante eliminar la cadena A no conjugada debido a la posibilidad de toxicidad incrementada. Además, es importante eliminar el agente de unión no conjugado para evitar la posibilidad de competición para el antígeno entre las especies conjugadas y no conjugadas. En cualquier evento, se describen varias técnicas de purificación en los Ejemplos siguientes que se ha encontrado que proporcionan conjugados con un grado suficiente de pureza para convertirlos en clínicamente útiles. En general, la técnica más preferida incorporará el uso de Sefarosa Azul con una etapa de filtración en gel o permeación en gel. La Sefarosa Azul es una matriz de columna compuesta por Cibacron Azul 3GA y agarosa, que se ha encontrado que es útil en la purificación de inmunoconjugados. El uso de Sefarosa Azul combina las propiedades de intercambio iónico con unión de cadena A para proporcionar una buena separación de la unión conjugada de la no conjugada.

La Sefarosa Azul permite la eliminación del agente de unión libre (no conjugado) (por ejemplo, el anticuerpo o fragmento) de la preparación de conjugado. Para eliminar la toxina libre (no conjugada) (por ejemplo, dgA), se prefiere una etapa de cromatografía por exclusión molecular usando bien un procedimiento convencional de filtración en gel o cromatografía líquida de alto rendimiento.

Después de que se haya preparado un conjugado suficientemente purificado, se deseará prepararlo en una composición farmacéutica que pueda administrarse parenteralmente. Esto se hace mediante el uso para la última etapa de purificación de un medio con una composición farmacéutica adecuada.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas según la invención comprenderán generalmente de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 mg del conjugado deseado mezclado con un diluyente o excipiente farmacéutico aceptable, tal como una disolución acuosa estéril, para proporcionar una concentración final de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 2,5 mg/ml respecto al conjugado. Dichas formulaciones incluirán típicamente tampones tales como disolución salina tamponada con fosfato (PBS), o aditivos adicionales tales como excipientes farmacéuticos, agentes estabilizantes tales como BSA o HSA, o sales tales como cloruro de sodio. Para la administración parenteral, es deseable generalmente convertir además dichas composiciones en farmacéuticamente aceptables asegurando su esterilidad, no inmunogenicidad y no pirogenicidad. Dichas técnicas son generalmente

muy conocidas en la técnica como se ejemplifica por Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª Ed. Mack Publishing Company, 1980.

5 Se apreciará que la contaminación por endotoxinas debe mantenerse mínimamente a un nivel seguro, por ejemplo, menos de 0,5 ng/mg de proteína. Además, para la administración a seres humanos, las preparaciones deben cumplir con los estándares de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza según requiere la Oficina de la FDA de Estándares Biológicos.

Una formulación parenteral preferida de las inmunotoxinas según la presente descripción es 0,25 a 2,5 mg de conjugado/ml en disolución acuosa 0,15M de NaCl a pH 7,5 a 9,0. Las preparaciones pueden almacenarse congeladas a -10°C a -70°C durante al menos 1 año.

10 Se contempla que la mayor parte de las aplicaciones terapéuticas de la presente invención implicarán el direccionamiento de un resto de toxina (agente citotóxico) al marcador de leucemia CD123. Esto se debe a la capacidad mucho mayor de la mayor parte de las toxinas de administrar un efecto que mata a las células comparado con otros agentes potenciales.

15 Sin embargo, hay muchas circunstancias tales como cuando el antígeno diana no se internaliza por una ruta consistente con la intoxicación eficiente por inmunotoxinas, en las que se deseará dirigir agentes quimioterapéuticos tales como citoquinas, antimetabolitos, agentes alquilantes, hormonas, y semejantes. Las ventajas de estos agentes sobre sus equivalentes no conjugados con anticuerpo es la selectividad añadida proporcionada por el anticuerpo. Se podrían mencionar, como ejemplo, agentes tales como esteroides, citosina arabinósido, metotrexato, aminopterina, antraciclinas, mitomicina C, alcaloides de vinca, demecolcina, etopósido, mitramicina, y semejantes. Esta lista es, por supuesto, meramente ejemplar ya que la tecnología para unir agentes farmacéuticos a anticuerpos para la administración específica a tejidos está bien establecida.

20 Un resto citotóxico preferido para uso en la presente invención es un radioisótopo, que puede acoplarse a o conjugarse con, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD123. Los radioisótopos preferidos incluyen emisores α tales como, por ejemplo, $^{211}\text{Astatina}$, $^{212}\text{Bismuto}$ y $^{213}\text{Bismuto}$, así como emisores β tales como, por ejemplo, $^{131}\text{Yodo}$, $^{90}\text{Itrio}$, $^{177}\text{Lutecio}$, $^{153}\text{Samario}$ y $^{109}\text{Paladio}$. Los radioisótopos particularmente preferidos son $^{211}\text{Astatina}$ y $^{131}\text{Yodo}$.

Se propone que los beneficios particulares también pueden conseguirse a través de la aplicación de la invención a la formación de imágenes celulares. Se cree que la formación de imágenes de células leucémicas proporciona una ventaja importante cuando se compara con las técnicas de formación de imágenes disponibles, ya que las células son fácilmente accesibles.

30 Además, la tecnología para unir iones paramagnéticos, radiactivos e incluso fluorogénicos a anticuerpos está bien establecida. Muchos de estos métodos implican el uso de un complejo de quelato metálico empleando, por ejemplo, un agente quelante orgánico tal como DTPA unido al anticuerpo (véase, por ejemplo, Pat. U.S. No. 4.472.509). En el contexto de la presente invención, el ion seleccionado se dirige así al área cancerosa por el anticuerpo, permitiendo que la formación de imágenes continúe por medio del ion unido.

35 En una realización preferida, en el método de la invención, los anticuerpos también pueden fusionarse a una molécula proteica efectora por medios recombinantes tal como a través del uso de técnicas de ADN recombinante para producir un ácido nucleico que codifica tanto el anticuerpo como la molécula efectora y expresar la secuencia de ADN en una célula huésped tal como *E. coli*. El ADN que codifica la proteína quimérica puede clonarse en ADNc o en forma genómica por cualquier procedimiento de clonación conocido para los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989).

40 La fusión o conjugación de anticuerpos a varios marcadores produce un marcador detectable altamente específico que puede usarse para detectar la presencia o ausencia de células o tejidos que portan la molécula particular con la que el anticuerpo se detecta. Alternativamente, los anticuerpos pueden conjugarse o fusionarse químicamente con una molécula efectora que otro resto de unión específico, por ejemplo, un ligando tal como los descritos anteriormente. En esta forma, la composición actuará como un conector bifuncional altamente específico. Este conector puede actuar para unir y aumentar la interacción entre células o componentes celulares a los que se une la proteína de fusión. Así, por ejemplo, cuando la proteína de fusión es un factor de crecimiento unido a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un fragmento Fv de un anticuerpo), el anticuerpo puede unirse específicamente a células cancerosas positivas para el antígeno mientras el factor de crecimiento se une a receptores en la superficie de células inmunes. La proteína de fusión puede actuar así para aumentar y dirigir una respuesta inmune frente a las células cancerosas diana.

Detección y diagnóstico in vitro

El método de usar los compuestos que se unen a CD123 y sus miméticos es adecuado para uso *in vitro*, por ejemplo, en inmunoensayos en los que pueden utilizarse en fase líquida o unidos a un vehículo en fase sólida. 55 Además, los anticuerpos monoclonales en estos inmunoensayos pueden marcarse de forma detectable de varias maneras. Los ejemplos de tipos de inmunoensayos que pueden utilizar los anticuerpos monoclonales y sus miméticos son inmunoensayos competitivos y no competitivos bien en formato directo o indirecto. Los ejemplos de

dichos inmunoensayos son el radioinmunoensayo (RIA) y el ensayo en sandwich (inmunométrico). La detección de antígenos usando los anticuerpos monoclonales y sus miméticos puede hacerse utilizando inmunoensayos que se operan bien en modos directo, inverso o simultáneo, incluyendo ensayos inmunohistoquímicos en muestras fisiológicas. Los expertos en la técnica conocerán, o pueden averiguar fácilmente, otros formatos de inmunoensayo sin experimentación excesiva.

Los compuestos que se unen a CD123 y miméticos pueden unirse a muchos vehículos diferentes y usarse para detectar la presencia de células de leucemia que portan CD123, incluyendo células progenitoras. Los ejemplos de vehículos muy conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nilón, amilasa, celulosa natural y modificada, poliacrilamida, agarosa y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser bien soluble o insoluble para los propósitos de la invención. Los expertos en la técnica conocerán otros vehículos adecuados para unir varios compuestos, o serán capaces de averiguarlo, usando experimentación rutinaria.

Para los propósitos de la invención, CD123 puede detectarse por los compuestos y sus miméticos cuando está presente en fluidos y tejidos biológicos. Puede usarse cualquier muestra que contiene una cantidad detectable de ectopéptido CD123. Una muestra puede ser un líquido tal como orina, saliva, fluido cerebroespinal, sangre, suero o semejantes; un sólido o semi-sólido tal como tejidos, heces, o semejantes; o, alternativamente, un tejido sólido tal como los usados comúnmente en diagnóstico histológico.

Detección *in vivo* de CD123

Mediante el uso de los compuestos de unión a CD123 y miméticos para la detección *in vivo* de CD123, el compuesto marcado de forma detectable o su mimético se proporciona en una dosis que es diagnósticamente efectiva. El término "diagnósticamente efectiva" significa que la cantidad de compuesto marcado de forma detectable, tal como anticuerpo monoclonal o mimético, se administra en una cantidad suficiente como para permitir la detección de las células de leucemia para las que son específicos los compuestos o miméticos.

La concentración de compuesto marcado de forma detectable o mimético que se administra deberá ser suficiente de manera que la unión a CD123 o células de leucemia que portan CD123, es detectable comparado con el fondo. Además, es deseable que el compuesto marcado de forma detectable o mimético se aclare rápidamente del sistema circulatorio con el fin de proporcionar la mejor relación de señal diana a fondo.

Como regla, la dosificación de compuesto marcado de forma detectable o mimético para el diagnóstico *in vivo* variará dependiendo de factores tales como edad, sexo, y grado de enfermedad del individuo. La dosificación del compuesto puede variar de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 500 mg/kg, preferiblemente

0,1 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, lo más preferiblemente aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Dichas dosificaciones pueden variar, por ejemplo, dependiendo de si se proporcionan múltiples inyecciones, del tejido que se está ensayando, y otros factores conocidos para los expertos en la técnica.

Para la formación de imágenes de diagnóstico *in vivo*, el tipo de instrumento de detección disponible es un factor importante en la selección de un radioisótopo apropiado. El radioisótopo elegido debe tener un tipo de desintegración que es detectable para el tipo de instrumento dado. Otro factor importante más en la selección de un radioisótopo para el diagnóstico *in vivo* es que la vida media del radioisótopo sea lo suficientemente larga de manera que sea aún detectable en el momento de la captación máxima por la diana, pero lo suficientemente corta de manera que sea aceptable la radiación perjudicial respecto al huésped. Idealmente, un radioisótopo usado para la formación de imágenes *in vivo* carecerá de una emisión de partículas, pero producirá un gran número de fotones en el rango 140-250 keV, que puede detectarse fácilmente por cámaras gamma convencionales.

Para el diagnóstico *in vivo*, los radioisótopos pueden unirse al compuesto bien directamente o indirectamente mediante el uso de un grupo funcional intermedio. Los grupos funcionales intermedios que se usan frecuentemente para unir radioisótopos que existen como iones metálicos son los agentes quelantes bifuncionales tales como ácido dietilentriaminopentacético (DTPA) y ácido etilendiaminotetra-acético (EDTA) y moléculas similares. Los ejemplos típicos de iones metálicos que pueden unirse a anticuerpos monoclonales son ^{111}In , ^{97}Ru , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{72}As , ^{89}Zr , ^{99}Tc , ^{123}I y ^{201}Tl .

En el método de diagnóstico de la descripción, los compuestos y miméticos también pueden marcarse con un isótopo paramagnético para propósitos de diagnóstico *in vivo*, como en formación de imágenes por resonancia magnética (MRI) o resonancia por spin electrónico (ESR). En general, puede utilizarse cualquier método convencional para visualizar la formación de imágenes de diagnóstico. Usualmente, se usan radioisótopos emisores gamma o de positrones para la formación de imágenes de cámara e isótopos paramagnéticos para MRI. Los elementos que son particularmente útiles en dichas técnicas incluyen ^{157}Gd , ^{55}Mn , ^{162}Dy , ^{52}Cr y ^{56}Fe .

En el método de monitorización de células de la invención, los compuestos y miméticos pueden usarse *in vitro* e *in vivo* para monitorizar el curso de la terapia frente a la enfermedad leucémica. Así, por ejemplo, mediante la medición del incremento o disminución de las moléculas biológicas asociadas con dichas enfermedades o cambios en la concentración de ectopéptido CD123 o células de leucemia que portan CD123 presentes en el cuerpo o en varios fluidos corporales, sería posible determinar si es efectivo un régimen terapéutico particular que tiene el objetivo de

mejorar la enfermedad leucémica anterior.

Profilaxis y terapia de leucemia

Los compuestos específicos para CD123 también pueden usarse terapéuticamente para el tratamiento de leucemia tanto en seres humanos como en otros animales. El término, "terapéuticamente" o "terapia" tal y como se usa en la presente memoria en conjunción con el método de la invención está dirigido al uso de compuestos de unión a CD123, tales como anticuerpos monoclonales anti-CD123 y sus miméticos, lo que indica la administración profiláctica así como terapéutica y la inmunización pasiva con productos polipeptídicos sustancialmente purificados, y miméticos, así como la terapia génica por transferencia de secuencias polinucleotídicas que codifican el producto o parte de éste. Así, los compuestos y miméticos pueden administrarse a sujetos de alto riesgo con el fin de disminuir la probabilidad y/o gravedad de recidiva de leucemia, o administrarse a sujetos que ya evidencian enfermedad de leucemia activa.

Para determinadas aplicaciones, se considera que los agentes farmacológicos servirán como agentes útiles para la unión a los compuestos, particularmente agentes citotóxicos o anticelulares de otra manera que tienen la capacidad de matar o suprimir el crecimiento o división celular de las células de leucemia. En general, la invención contempla el uso de cualquier agente farmacológico que pueda conjugarse con un compuesto de unión a CD123 y administrarse en forma activa a la célula diana. Los agentes anticelulares ejemplares incluyen agentes quimioterapéuticos, radioisótopos así como citotoxinas. En el caso de agentes quimioterapéuticos, los inventores proponen los agentes tales como una hormona tal como un esteroide; un antimetabolito tal como citosina arabinósido, fluorouracilo, metotrexato o aminopterina; una antraciclina; mitomicina C; un alcaloide de vinca; demecolcina; etopósido; mitramicina; caliqueamicina, CC-1065 y derivados de éste, o un agente alquilante tal como clorambucilo o melfalán, serán particularmente preferidos. Otras realizaciones pueden incluir agentes tales como un coagulante, una citoquina, factor de crecimiento, endotoxina bacteriana o el resto de lípido A de endotoxina bacteriana. En cualquier evento, se propone que los agentes tales como éstos pueden conjugarse con éxito a anticuerpos de una manera que permitirá su direccionamiento, internalización, liberación o presentación a los componentes de la sangre en el sitio de las células de leucemia diana según se requiere usando tecnología de conjugación.

En determinadas realizaciones preferidas, los agentes citotóxicos para aplicación terapéutica incluirán generalmente una toxina derivada de planta, hongo, o bacteria, tal como toxinas de cadena A, una proteína inactivadora de ribosomas, α -sarcina, aspergilina, restirictocina, una ribonucleasa, toxina de difteria o exotoxina de pseudomonas, por mencionar sólo unos pocos ejemplos. El uso de construcciones toxina-anticuerpo es muy conocido en la técnica de inmunotoxinas, como lo es su unión a anticuerpos. De éstas, una toxina particularmente preferida para la unión a anticuerpos será la cadena A de ricina desglucosilada. La cadena A de ricina desglucosilada se prefiere debido a su extrema potencia, vida media más larga, y debido a que es económicamente factible de fabricar un grado y escala clínico.

En otras realizaciones preferidas, el agente citotóxico puede ser un radioisótopo. Los radioisótopos preferidos incluyen emisores α tales como, por ejemplo, $^{211}\text{Astatina}$, $^{212}\text{Bismuto}$ y $^{213}\text{Bismuto}$, así como emisores β tales como, por ejemplo, $^{131}\text{Yodo}$, $^{90}\text{Itrio}$, $^{177}\text{Lutecio}$, $^{153}\text{Samario}$ y $^{109}\text{Paladio}$.

Tal y como se usa en la presente memoria, una "cantidad terapéuticamente efectiva" de un compuesto es una dosificación lo suficientemente alta como para producir el efecto deseado en el que los síntomas de la leucemia o la probabilidad del inicio de la leucemia están disminuidos. Una cantidad terapéuticamente efectiva no es, sin embargo, una dosificación tan alta como para causar efectos secundarios adversos, tales como síndromes de hiperviscosidad, edema pulmonar, fallo cardíaco congestivo, y semejantes. Generalmente, una cantidad terapéuticamente efectiva puede variar con la edad, condición, y sexo del sujeto, así como el grado de la enfermedad en el sujeto y puede ser determinada por un experto en la técnica. La dosificación puede ajustarse por el médico o veterinario del individuo en el evento de cualquier complicación. Una cantidad terapéuticamente efectiva puede variar de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 500 mg/kg, preferiblemente de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, lo más preferiblemente de aproximadamente 0,2 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, en una o más administraciones de dosis diariamente, durante uno o varios días.

Los compuestos y sus miméticos pueden administrarse por inyección o por infusión gradual con el tiempo. La administración de los compuestos y sus miméticos puede ser, por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intracavidad, subcutánea, o transdérmica.

Las preparaciones para administración parenteral incluyen disoluciones, suspensiones, y emulsiones estériles acuosas o no acuosas. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilen glicol, polietilen glicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, disoluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo disolución salina o medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen disolución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer lactato o aceites fijados. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer), y semejantes. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, anti-oxidantes, agentes quelantes, y gases inertes y semejantes.

Dependiendo del estado clínico específico de la enfermedad, la administración puede hacerse a través de cualquier sistema de administración sistémica aceptado, por ejemplo, a través de la ruta oral o ruta parenteral tal como ruta intravenosa, intramuscular, subcutánea o percutánea, o ruta vaginal, ocular o nasal, en formas de dosificación sólidas, semi-sólidas o líquidas, tales como, por ejemplo, comprimidos, supositorios, píldoras, cápsulas, polvos, disoluciones, suspensiones, crema, gel, implante, parche, pesario, aerosoles, colirio, emulsiones o semejantes, preferiblemente en formas de dosificación unitarias adecuadas para la administración fácil de dosificaciones fijadas. Las composiciones farmacéuticas incluirán un transportador o vehículo convencional y un compuesto de unión a CD123 y, además, pueden incluir otros agentes medicinales, agentes farmacéuticos, vehículos, adyuvantes, etc.

Si se desea, la composición farmacéutica que se va a administrar también puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores del pH y semejantes, tales como, por ejemplo, acetato de sodio, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina, etc.

Los compuestos se administran generalmente como una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéutico en combinación con un compuesto de unión a CD123. La cantidad del fármaco en una formulación puede variar en el intervalo completo empleado por los expertos en la técnica, por ejemplo, de aproximadamente 0,01 por ciento en peso (% en peso) a aproximadamente 99,99% en peso del fármaco basado en la formulación total y aproximadamente 0,01% en peso a 99,99% en peso de excipiente.

El modo preferido de administración, para las condiciones mencionadas anteriormente, es la administración oral usando un régimen de dosificación diario conveniente que puede ajustarse según el grado de la afección. Para dicha administración oral, una composición farmacéuticamente aceptable, no tóxica, se forma por la incorporación del compuesto de unión a CD123 seleccionado en cualquiera de los excipientes usados actualmente, tales como, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, talco, celulosa, glucosa, gelatina, sacarosa, carbonato de magnesio, y semejantes. Dichas composiciones toman la forma de disoluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y semejantes. Dichas composiciones pueden contener entre aproximadamente 0,01% en peso y 99,99% en peso del compuesto activo según esta invención.

Preferiblemente, las composiciones tendrán la forma de una píldora o comprimido recubierto con azúcar y así contendrán, junto con el ingrediente activo, un diluyente tal como lactosa, sacarosa, fosfato de dicalcio, y semejantes; un disgregante tal como almidón o derivados de éste; un lubricante tal como estearato de magnesio y semejantes; y un aglutinante tal como almidón, polivinilpirrolidona, goma arábiga, gelatina, celulosa y derivados de ésta, y semejantes.

Se entiende que por "composición farmacéutica", se quiere decir que el compuesto de unión a CD123 se formula en una sustancia que es para administrarse con el propósito de diagnosticar o tratar la leucemia en el individuo. Y, por "composición farmacéutica", se excluye aquellas composiciones que se usan para administrar a individuos como compuestos de ensayo para un propósito distinto de como un agente de diagnóstico o tratamiento para la leucemia.

Varios estudios recientes han sugerido la presencia e importancia de células madre tanto en la génesis como en la perpetuación de AML. Fenotípicamente, las células descritas como CD34+/CD38- o CD34+/HLA-DR- parecen jugar un papel central en el desarrollo de las poblaciones leucémicas (Bonnet D, et al., Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nat.Med. 1997, 3: 730-737; Blair A, et al., Most acute myeloid leukemia progenitor cells with long-term proliferative ability in vitro and in vivo have the phenotype CD34(+)/CD71(-)/HLA-DR-. Blood 1998, 92: 4325-35). Además, hay evidencias que sugieren que dichas células pueden ser relativamente resistentes a fármacos quimioterapéuticos, y consecuentemente, contribuir al fenómeno de recidiva (Terpstra W, et al., Fluorouracil selectively spares acute myeloid leukemia cells with long-term growth abilities in immunodeficient mice and in culture. Blood 1996, 88: 1944-50). Así, una mejor comprensión de la biología de LSC y la caracterización de antígenos de LSC únicos es esencial para el desarrollo de mejores tratamientos para AML.

Aunque los varios subtipos de AML presentan una diversidad considerable respecto a características de desarrollo, fenotipo, respuesta a citoquinas, etc., parece que hay un grado marcado de conservación funcional a nivel de las células leucémicas más primitivas. Esta característica se ha demostrado por el trabajo de Bonnet et al., en el que se mostró que una subpoblación CD34+/CD38- era suficiente para establecer leucemia en ratones NOD/SCID (Bonnet D, et al., Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nat.Med. 1997, 3: 730-737). Estudios similares por otros han corroborado la existencia de células madre leucémicas tanto para AML como CML y confirmaron su fenotipo y capacidad funcional relativamente homogéneos (Blair A, Hogge et al., Most acute myeloid leukemia progenitor cells with long-term proliferative ability in vitro and in vivo have the phenotype CD34(+)/CD71 (-)/HLA-DR-. Blood 1998, 92: 4325-35; Holyoake T, et al., Isolation of a highly quiescent subpopulation of primitive leukemic cells in chronic myeloid leukemia. Blood 1999, 94: 2056-64). Sin embargo, hasta la fecha, ningún estudio ha identificado una característica antigénica de LSC mieloides que pueda permitir su identificación o direccionamiento diferencial para terapia ablativa. En este trabajo, hemos identificado un aspecto en común adicional entre las células madre de AML CD34+/CD38-, la expresión de CD123, lo que facilita su discriminación de las células madre hematopoyéticas normales. Aunque el antígeno CD123 se detectó fácilmente a altos niveles en células AML, la cadena β del receptor de IL-3, CD131, no se detectó.

Nuestros experimentos indican que el factor de transcripción IRF-1 (factor regulador de interferón 1) está sobreexpresado (en 6 de 6 muestras de AML primaria examinadas). Estudios previos por Korpelainen et al., han mostrado que el tratamiento de células endoteliales con IFN- γ resulta en la regulación al alza de CD123 (Korpelainen EI, et al., Interferon-gamma upregulates interleukin-3 (IL-3) receptor expression in human endothelial cells and synergizes with IL-3 in stimulating major histocompatibility complex class II expression and cytokine production. Blood 1995, 86: 176-82). De forma similar, nuestros propios estudios han mostrado que el tratamiento de células de AML primaria con IFN- γ incrementa la expresión de CD123 (datos no mostrados). Así, la expresión aberrante de moléculas reguladoras de interferón podría jugar un papel en el control de la expresión de CD123 en células de AML.

La expresión del antígeno CD123 demuestra formalmente que las LSC son biológicamente distintas de sus equivalentes de células madre normales. Como CD123 no se encuentra fácilmente en células madre hematopoyéticas normales, proporciona un marcador único que puede usarse para identificar tejido maligno. Esta característica puede ser útil para propósitos de investigación, así como en estudios de enfermedad residual mínima (MRD). Además, el epítipo de CD123 representa una diana a la que pueden dirigirse estrategias terapéuticas. Estudios clínicos previos han usado anticuerpos monoclonales tanto frente a los antígenos CD33 como CD45 como un medio para administrar radioisótopos a células de AML in vivo (Appelbaum FR., Antibody-targeted therapy for myeloid leukemia. Semin Hematol 1999, 36: 2-8.). Además, varios otros estudios recientes han mostrado resultados excitantes usando anticuerpos monoclonales específicos para antígenos en células malignas tales como CD20, CD52, y Her-2 (Maloney DG., Advances in immunotherapy of hematologic malignancies. Curr Opin Hematol 1998; 5: 237-43; Sikic BI., New approaches in cancer treatment. Ann Oncol 1999, 10 Supl 6: 149-53). Los anticuerpos frente a CD123 pueden ser útiles en un paradigma similar y serán capaces de administrar una diana citotóxica que tiene como diana específicamente la población de células madre leucémicas.

Hemos mostrado que CD123 representa un marcador antigénico único para la identificación de células leucémicas primitivas a partir de un amplio rango de muestras humanas a lo largo de un amplio rango de enfermedades leucémicas. Nuestros estudios muestran que CD123 se expresa generalmente a altos niveles y puede ser indicativo de aspectos no caracterizados previamente de la biología de la leucemia.

La presente invención se ilustrará adicionalmente en los Ejemplos siguientes no limitativos. Los Ejemplos son sólo ilustrativos y no limitan la invención reivindicada respecto a los materiales, condiciones, parámetros del proceso y semejantes recitados en la presente memoria.

30 Ejemplos

Ejemplo 1. - Materiales y métodos: procesamiento celular

Las células de AML primaria se obtuvieron de la sangre periférica o médula ósea de pacientes. La médula ósea normal se obtuvo como material de desecho después de análisis patológico, recogida quirúrgica de médula, o del National Disease Research Interchange (NDRI). Las células de médula se deplecionaron de eritrocitos por suspensión en 150mM NH₄Cl + 10mM NaHCO₃ durante 5 minutos, seguido de dos lavados con disolución salina tamponada con fosfato (PBS). Las células sanguíneas se sometieron a separación en gradiente de densidad Ficoll-Paque (Pharmacia) para aislar el compartimento de células sanguíneas blancas mononucleares. Los leucocitos resultantes de médula o sangre se usaron para selección por inmutafinidad, y/o análisis o separación por citometría de flujo. Para la selección de células CD34+, se usó el dispositivo de inmutafinidad Miltenyi (varioMACS) según las instrucciones del fabricante. En algunos casos, los leucocitos se crioconservaron a una concentración de 5 x 10⁷ células/ml en medio de congelación que consistió en medio de Dulbecco modificado por Iscoves (IMDM), 40% suero fetal bovino (FBS) y 10% dimetilsulfóxido (DMSO).

Ejemplo 2. - Citometría de flujo

Los receptores de citoquina se detectaron marcando con los anticuerpos monoclonales siguientes: CD114-biotina, CD116-FITC, CD123-PE, CD131-biotina (todos de Pharmingen), CD117-PE (Coulter), y CD135-PE (Caltag). Los anticuerpos biotinilados se visualizaron por marcaje posterior con estreptavidina-PE (SA-PE, Becton Dickinson). Las subpoblaciones de AML primitivas se identificaron usando CD34-FITC o CD34-PE en combinación con CD38-APC (Becton Dickinson). Las células de AML primaria se identificaron en ratones NOD/SCID usando CD45-PE (Pharmingen) específico para células humanas. Para analizar las células trasplantadas en ratones NOD/SCID, se recogió médula ósea a las 6-8 semanas después del trasplante. Las células se bloquearon con el anticuerpo anti-receptor Fc 2.4G2 y 25% de suero humano, seguido de un doble marcaje con anticuerpos específicos de CD34-FITC y CD45-PE humanos. Las muestras control consistieron en células de médula de ratones no trasplantados. En algunos casos, las células también se marcaron con CD123-PE para asegurar una expresión sostenida del antígeno CD123. Para cada muestra, se analizaron 50.000-100.000 eventos. Usando esta estrategia, las células humanas pudieron detectarse de forma fiable hasta una frecuencia tan baja como 0,1%. Cualquiera de los análisis que se encontró por debajo de 0,1% de células positivas se consideró negativo.

Ejemplo 3. - Inmutotransferencias

Las muestras de células se lisaron a una concentración de 2 x 10⁷ células/ml en PBS que contenía: 1% NP-40, 0,5%

deoxicolato, 0,1% dodecil sulfato de sodio (SDS), 1mM vanadato de sodio (Na_3VO_4), 30 μl de aprotinina (Sigma), 1mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (Sigma), 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pepstatina, y 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptina (Oncogene Research); se incubó en hielo durante 30 minutos, y se centrifugó a 15.000 xg durante 10 minutos para eliminar los restos celulares. El lisado de proteína resultante se alicuotó y se almacenó a -80°C . Para el análisis de inmunotransferencia, los lisados de proteína se descongelaron y se mezclaron con tampón de muestra y agente reductor (Novex, San Diego, CA., según las instrucciones del fabricante), y se calentó a 70°C durante 10 minutos. Las muestras se analizaron inmediatamente por PAGE desnaturalizante (Novex, geles 4-12% Bis-Tris ó 7% Tris-Acetato) usando el equivalente a 4×10^5 células por carril. Después de la electroforesis, las muestras se electro-transfirieron a una membrana Immobilon-P (Millipore) y se ensayaron con los anticuerpos indicados. Para detectar CD123 (cadena alfa de IL-3R), se usaron los anticuerpos S-12 (Santa Cruz Biotech) ó 9F5 (Pharmingen). Para el análisis de Mek y Akt, se usaron anticuerpos policlonales de conejo específicos de proteína y específicos de fosfoproteína de New England Biolabs. Se usaron anti-Stat5 policlonal (Transduction Labs) y anti-fosfo-Stat5 (New England Biolabs) para analizar el estado de fosforilación de Stat5. Todos los anticuerpos primarios se detectaron usando anticuerpos secundarios conjugados con fosfatasa alcalina (Santa Cruz Biotechnology) y el reactivo ECF (Pharmacia Biotech) según las instrucciones del fabricante. Las transferencias se visualizaron usando un sistema STORM 860 de Molecular Dynamics y software ImagequantTM.

Ejemplo 4. - Ensayos en ratones NOD/SCID

Se expusieron ratones NOD/SCID (Jackson Laboratories. Bar Harbor, Maine) a 225 rads de irradiación y de una fuente de ^{137}Cs . Las células que se iban a ensayar se resuspendieron en 0,25 mls de HBSS (disolución salina equilibrada de Hanks, Gibco) con 2% FBS y se inyectaron IV en la vena de la cola. Para el análisis de algunas poblaciones seleccionadas, se co-inyectaron como vehículo 1×10^6 células de médula ósea de ratón irradiadas (2.500 Rads). Después de 6-8 semanas, los animales se sacrificaron y la médula ósea se analizó para la presencia de células humanas usando citometría de flujo (véase anteriormente).

Ejemplo 5. - Resultados

El análisis de los receptores de citoquina demuestra una fuerte expresión de CD123 en células leucémicas primitivas pero no en células normales. Se usó citometría de flujo con múltiples parámetros para analizar la expresión de receptores de citoquina implicados previamente en el crecimiento de células hematopoyéticas malignas. Aunque varios receptores presentaron patrones interesantes de marcaje de anticuerpo, la característica más llamativa observada fue un nivel notablemente alto y bien conservado de expresión de CD123 (cadena alfa de IL-3R) entre las muestras de AML primaria. La Figura 1 muestra ejemplos representativos del marcaje de CD123 en tejido normal y leucémico. En la Figura 1A se muestran médula normal total así como subconjuntos más primitivos respecto a la expresión de CD123. La médula total tiene generalmente aproximadamente 7% de células positivas para CD123, pero sólo aproximadamente el 1% de la población expresa el antígeno a altos niveles (véase la inserción en la Figura 1A). La población CD34+ de la médula normal también tiene una expresión fácilmente evidente de CD123 (12% en la Figura 1A, histograma derecho), como se esperaría para una población que se sabe que contiene progenitores hematopoyéticos. El perfil de marcaje mostrado está de acuerdo con estudios previos por Sato et. al. que también han examinado los niveles de IL-3R α en células humanas CD34+ (Sato N, et al., Expression and factor-dependent modulation of the interleukin-3 receptor subunits on human hematopoietic cells. Blood 1993, 82: 752-61.). Sin embargo, el compartimento CD34+/CD38- más primitivo no muestra una expresión significativa de CD123 (<1%). Por el contrario, las células de AML primaria (Figura 1B) presentaron altos niveles de CD123. Tanto en la población global CD34+, como en el compartimento CD34+/CD38- más primitivo, más del 99% de las células fueron positivas para CD123. La Figura 2 muestra cinco ejemplos adicionales de marcaje de CD123 en células de AML CD34+/CD38-, lo que demuestra adicionalmente la fuerte expresión de este antígeno en poblaciones leucémicas. La Tabla 1 resume los experimentos realizados hasta la fecha en el tipo celular de AML, y muestra los niveles de CD123 para células primitivas de los subtipos de AML M1, M2, y M4. De las 18 muestras de AML primaria examinadas, CD123 se expresó fuertemente en las células de leucemia primitivas en todos los casos excepto dos. Las dos muestras que tuvieron menores niveles de CD123 (muestras AML-11 y AML-14, Tabla 1) presentaron ambas un desplazamiento uniforme en la expresión de CD123, pero tuvieron una intensidad de marcaje global que fue más débil que la mayor parte de las muestras ensayadas. En muchos casos (9 de 18), las células negativas para CD123 fueron virtualmente indetectables (0% o menos de 1%). A la inversa, la expresión de CD123 no se detectó en 3 de 5 muestras normales de células CD34+/CD38- y fue apenas detectable en dos muestras adicionales (<1%). Estos análisis de citometría de flujo se confirmaron usando dos anticuerpos monoclonales anti-CD123 diferentes para asegurar que los resultados no eran un artefacto causado por el uso de un anticuerpo particular.

El alto nivel de expresión de CD123 encontrado en todos los subtipos de AML examinados implica que IL-3R α podría jugar un papel central en la creación o mantenimiento del estado leucémico. Para formar el receptor de alta afinidad para IL-3, tanto las cadenas α como β (CD123 y CD131, respectivamente) son necesarias. Así, la expresión de CD131 también se examinó por citometría de flujo en las muestras de AML. De forma interesante, aunque se observó alguna expresión en poblaciones a granel de AML, en 15 de 15 muestras CD131 no se detectó nunca en el compartimento CD34+ (datos no mostrados).

Los datos adicionales que demuestran la expresión de CD123 en células de ALL primaria y CML primaria, así como linfoma no de Hodgkin, se discuten en los Ejemplos 8 y 10.

Ejemplo 6. - Propiedades de prendimiento *in vivo* de células leucémicas humanas CD123+ en ratones NOD/SCID.

Dada la fuerte expresión de CD123 observada en la gran mayoría de células que engloban fenotípicamente la población LSC, parecía probable que CD123 fuera útil como un marcador de las LSC. Por lo tanto, para establecer la capacidad funcional de células CD123+, se realizaron estudios de trasplante usando el sistema de modelo de ratones NOD/SCID. Se ensayaron tres muestras de AML primaria (AML-2, 5 y 15 de la Tabla 1) separando por citometría de flujo las células CD34+/CD123+ y trasplantándolas en ratones NOD/SCID irradiados. Además, las células remanentes en la población (CD34-/CD123+/-) también se separaron y se trasplantaron en paralelo. Los datos en la Figura 3 son un ejemplo representativo de una muestra que mostró un prendimiento fuerte de células leucémicas a las seis semanas después del injerto. El panel A muestra las células de médula ósea totales marcadas con anticuerpos específicos para CD34 y CD45 humanos. El perfil de citometría de flujo indica claramente que una gran población de células humanas (CD45+) está presente en la médula. Además, la población se divide entre subconjuntos CD34+ y CD34-, de manera similar a las proporciones de marcaje de CD34 observadas en la muestra leucémica original. El panel B muestra la misma muestra de médula separada sólo en las células CD45+. Los datos indican que todas las células que han proliferado *in vivo* son positivas para CD123. La Tabla 2 resume los datos para las tres muestras ensayadas. En todos los casos, las células CD123+ fueron capaces de prendimiento en los animales NOD/SCID. Además, en todos los casos excepto uno, las poblaciones CD123- no contribuyeron a la repoblación *in vivo*. Así, como se define por el modelo NOD/SCID, concluimos que CD123 se expresa en las LSC

Finalmente, como un medio independiente para confirmar el origen leucémico de las células positivas para CD123, se usó citometría de flujo para separar células CD34+/CD123+ de dos muestras leucémicas. Estas muestras se cultivaron durante cuatro días, se sincronizaron y se recogieron para análisis citogenético. El examen de las propagaciones de cada muestra mostró que 20 de 20 metafases eran positivas para la translocación específica de leucemia.

Ejemplo 7. - Papel biológico de la expresión de CD123 en células de leucemia.

Para corroborar adicionalmente los datos obtenidos por citometría de flujo, se realizaron estudios de inmunotransferencia para analizar los componentes de la transducción de la señal de IL-3R. Para estos estudios, cada muestra de AML se derivó de una muestra de sangre periférica y se separó para aislar la población CD34+, asegurando así una muestra leucémica virtualmente pura. En primer lugar, se examinó la expresión tanto de las cadenas α como β de IL-3R. Respecto a CD123, los datos mostrados en la Figura 4 (panel superior) demuestran claramente la expresión en todas las muestras leucémicas ensayadas. Las células CD34+ derivadas de médula normal (carril 2, CD34+) también muestran una señal débil. Esto es consistente con los datos en la Figura 1A, que muestran que las células CD34+ normales contienen frecuentemente un pequeño subconjunto de células CD123+. Sin embargo, la expresión de CD123 no se detectó por citometría de flujo en el subconjunto más primitivo CD34+/CD38- de células normales (Figura 1A y Tabla 1). Debido a su baja frecuencia, no fue posible obtener suficientes células CD34+/CD38- ni de origen normal ni de AML para análisis directo por inmunotransferencia. No obstante, la detección de una señal clara en la población CD34+ global corrobora la señal fuerte observada por citometría de flujo para células de AML. Otro punto a indicar es que el peso molecular de la banda CD123 parece variar ligeramente entre las muestras de AML. Hemos realizado análisis de huellas de RT-PCR de las mismas muestras y no hemos observado aberraciones obvias (datos no mostrados). Así, parece que grados variados de modificación posterior a la traducción son la explicación más probable para esta observación. Consistente con estos resultados obtenidos por citometría de flujo, la expresión de CD131 no se detectó (Figura 4, panel inferior).

Para empezar a explorar un papel funcional potencial para CD123, examinamos la respuesta de células de AML primaria a IL-3. Típicamente, la estimulación de células hematopoyéticas con IL-3 da lugar a varios eventos de transducción de la señal intracelulares bien caracterizados (Hara T, et al., Function and signal transduction mediated by the interleukin 3 receptor system in hematopoiesis. Stem Cells 1996, 14: 605-18). Entre estos eventos es prevalente la fosforilación de Mek-1, Akt, y Stat-5 (Songyang Z, et al., Interleukin 3-dependent survival by the Akt protein kinase. Proc Natl Acad Sci U S A 1997, 94: 11345-50; Yagisawa M, et al., Signal transduction pathways in normal human monocytes stimulated by cytokines and mediators: comparative study with normal human neutrophils or transformed cells and the putative roles in functionality and cell biology. Exp Hematol 1999, 27: 1063-76; Sutor SL, et al., A phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway that differentially regulates c-Raf and A-Raf. J Biol Chem 1999, 274: 7002-10; de Groot RP, et al., Regulation of proliferation, differentiation and survival by the IL-3/IL-5/GM-CSF receptor family. Cell Signal 1998, 10: 619-28). Consecuentemente, se realizaron estudios de inmunotransferencia en estas proteínas para evaluar el grado de fosforilación, tanto en presencia como ausencia de estimulación con IL-3. Los datos, mostrados en la Figura 5, muestran ausencia de una fosforilación detectable de Akt y Stat5 en ausencia de IL-3, y sólo un nivel moderado de fosforilación para Mek-1. Además, en respuesta a la estimulación con IL-3, no se observa un incremento apreciable en la fosforilación para ninguna de las proteínas ensayadas. Estos resultados sugieren que CD123 presente en la superficie de células de AML primaria no contribuye significativamente a la transducción de la señal a través de las rutas mediadas por IL-3 convencionales.

Ejemplo 8. - Expresión de CD123 en células de ALL primaria y CML primaria.

Se siguió un protocolo experimental similar como se describe en los Ejemplos 1 a 4, y se ensayó la expresión de CD123 en células de ALL primaria y CML primaria por citometría de flujo. Los resultados fueron consistentes con los

resultados obtenidos con la expresión de CD123 en AML primaria en el Ejemplo 5. Las Figuras 6A, 6B, y 6C muestran de manera reproducible que las células de ALL primaria expresan CD123. Además, las Figuras 7A, 7B, y 7C muestran de manera reproducible que las células de CML primaria también expresan CD123.

Ejemplo 9. - Ensayo de muerte por complemento dirigido a CD123.

- 5 Mediante el uso de un ensayo de muerte por complemento, "Current protocols in Immunology" Editado por John Coligan, Ada Kruisbeek, David Margulies, Ethan Shevach, y Warren Strober, John Wiley and Sons publishing, 1992, este experimento demuestra que las células CD123+ se toman como diana de forma preferente. En este experimento, comparamos una muestra de AML típica (es decir, CD123+) con una muestra de médula ósea normal. Para cada muestra, hay un control no tratado, una muestra tratada con complemento solo, y una muestra tratada con complemento anti-CD123+. Como se muestra en la Tabla 3, hay un efecto de muerte por complemento sustancial en la muestra de AML, pero no hay efecto en la médula normal. Esto es cierto tanto para la muestra global, como para las células CD34+ más primitivas. De acuerdo con esto, este experimento demuestra que hay una diferencia entre el efecto en células normales y leucémicas respecto a la especificidad para CD123.

Ejemplo 10. - Expresión de CD123 en células de linfoma.

- 15 Los análisis inmunohistoquímicos de secciones de tejido mostraron que el "linfoma de células B grandes difuso" es fuertemente positivo para expresión de CD123. Ésta es la forma más común de linfoma no de Hodgkin. Así, en un cáncer derivado de células B, la expresión de CD123 es consistente con la observación de que CD123 también se observó en células de ALL (es decir, otro tipo de cáncer de células B). Esta observación identifica directamente los linfomas de células B como una diana para terapias y diagnóstico usando CD123.

- 20 Tabla 1: Expresión de CD123 en células leucémicas primitivas y normales

<u>Muestra</u>	<u>FAB</u>	<u>% células CD123+ en la población CD34+/CD38-</u>
<u>AML</u>		
AML-1	MDS/AML	100%
AML-2	M1	100%
AML-3	M1	95,2%
AML-4	M4	98,1 %
AML-5	M2	99,7%
AML-6	M4	99,5%
AML-7	nd	100%
AML-8	M4	99,7%
AML-9	M4	99,8%
AML-10	M2	100%
AML-11	MDS/AML	70,2%
AML-12	nd	92,5%
AML-13	M1	97,5%
AML-14	M4	51,1 %
AML-15	M4	98,1%
AML-16	M1	95,3%
AML-17	M1	98,9%
AML-18	M4	100%
<u>Médula Normal</u>		
BM-1	na	0
BM-2	na	<1%
BM-3	na	0
BM-4	na	0
BM-5	na	<1%

FAB = sistema de clasificación francés, americano, británico
MDS/AML = síndrome mielodisplásico progresando a AML
na = no aplicable

Tabla 2: Prendimiento de poblaciones CD123+ en ratones NOD/SCID.

<u>Exp</u>	<u>Muestra</u>	<u>Población Ensayada (N)</u>	<u>Células Iny./ratón</u>	<u>%células CD45+/recep.</u>
1	AML-2	CD34+/CD123+ (3)	4,9 X 10e6	42%
				18%
				67%
		CD34-/CD123+/- (3)	7,5 X 10e5	nd
				0,2%
				0,1%
2	AML-5	CD34+/CD123+ (4)	2,5 x 10e6	15%
				6%
				1%
				12%
		CD34-/CD123+/- (3)	2,5 x 10e6	nd
				nd
3	AML-15	CD34+/CD123+ (5)	2,1 X 10e6	nd
				2,1%
				0,2%
				0,8%
				1,1%
				0,9%
		CD34-/CD123+/- (3)	2,4 X 10e6	nd
				nd
				nd

N = número de ratones ensayados

nd = no detectable

5 Tabla 3: Ensayo de muerte por complemento específico de Cd123

<u>Muestra de AML primaria</u>	<u>Viabilidad</u>	
	<u>Células Totales</u>	<u>CD34+</u>
control no teñido	68,53%	73,29%
complemento solo	67,76%	77,17%
complemento anti-CD123+	21,31%	33,25%
<u>BM normal primaria</u>		
	<u>Células Totales</u>	<u>CD34+</u>
control no teñido	80,20%	78,20%
complemento solo	79,42%	80,33%
complemento anti-CD123+	80,46%	81,51%

La solicitud describe *inter alia* los ítems siguientes:

1. Un método para tratar cáncer hematológico en un paciente que necesita dicho tratamiento, que comprende administrar a dicho paciente un compuesto que se une selectivamente a CD123 en una cantidad efectiva para causar daño en las células progenitoras del cáncer hematológico.
- 5 2. El método del ítem 1, en el que dicho compuesto comprende un anticuerpo.
3. El método del ítem 2, en el que dicho compuesto comprende además un agente citotóxico.
4. El método del ítem 3, en el que dicho agente citotóxico es un radioisótopo.
5. El método del ítem 4, en el que dicho radioisótopo se selecciona del grupo que consiste en ²¹¹Astatina y ¹³¹Yodo.
6. El método del ítem 1, en el que dicho daño es muerte celular.
- 10 7. El método del ítem 1, en el que dicho cáncer hematológico es leucemia o trastornos linfoproliferativos malignos.
8. El método según el ítem 7, en el que dicha leucemia se selecciona del grupo que consiste en leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, síndrome mielodisplásico, leucemia linfoide aguda, leucemia linfoide crónica, y síndrome mielodisplásico.
9. El método según el ítem 7, en el que dicho trastorno linfoproliferativo maligno es linfoma.
- 15 10. El método según el ítem 9, en el que dicho linfoma se selecciona del grupo que consiste en mieloma múltiple, linfoma no de Hodgkin, linfoma de Burkitt, y linfoma folicular (de células pequeñas y de células grandes).
11. Un método para dañar una célula progenitora de cáncer hematológico que comprende poner en contacto dicha célula con un compuesto que se une selectivamente a CD123 en una cantidad efectiva para causar daño en dicha célula.
- 20 12. El método del ítem 11, en el que dicho compuesto comprende un anticuerpo.
13. El método del ítem 12, en el que dicho compuesto comprende además un agente citotóxico.
14. El método del ítem 13, en el que dicho agente citotóxico es un radioisótopo.
15. El método del ítem 14, en el que dicho radioisótopo se selecciona del grupo que consiste en ²¹¹Astatina y ¹³¹Yodo.
- 25 16. El método del ítem 11, en el que dicho daño es muerte celular.
17. Un compuesto que se une selectivamente a CD123 y daña las células progenitoras de cáncer hematológico.
18. El compuesto del ítem 17, en el que dicho compuesto comprende un anticuerpo.
19. El compuesto del ítem 18, en el que dicho compuesto comprende además un agente citotóxico.
20. El compuesto del ítem 19, en el que dicho agente citotóxico es un radioisótopo.
- 30 21. El compuesto del ítem 20, en el que dicho radioisótopo se selecciona del grupo que consiste en ²¹¹Astatina y ¹³¹Yodo.
22. Un ensayo para detectar la presencia de células progenitoras de cáncer hematológico en una muestra, que comprende detectar la presencia de CD123 en dicha muestra.
- 35 23. El ensayo del ítem 22, en el que la presencia de CD123 se detecta introduciendo un compuesto que se une selectivamente a CD123 y determinando si el compuesto se une a un componente de dicha muestra.

El contenido de la invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que se une selectivamente a CD123 y mata células madre leucémicas para uso en un método de tratamiento de un paciente humano que tiene una leucemia, en el que dicha leucemia es síndrome mielodisplásico.
- 5 2. El anticuerpo para uso de la reivindicación 1, en el que las células madre leucémicas son células madre de leucemia mieloide aguda (AML) CD34+/CD38-.
3. El anticuerpo para uso de la reivindicación 2, en el que las células madre de AML CD34+/CD38- son además CD131-.
4. El anticuerpo para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las células madre leucémicas son de la médula ósea del paciente.
- 10 5. Método para detectar células progenitoras de leucemia en un paciente humano que tiene una leucemia, en el que dicha leucemia es síndrome mielodisplásico, en el que el método comprende usar un ligando marcado que se une a CD123.
6. El método de la reivindicación 5, en el que el ligando marcado es un ligando marcado con una enzima, un radioisótopo, un compuesto fluorescente, un compuesto quimioluminiscente, un compuesto bioluminiscente, un compuesto basado en adsorbente, o un metal coloidal.
- 15 7. El método de la reivindicación 5 ó 6, en el que el ligando es un anticuerpo o un fragmento de éste que se une selectivamente a CD123.
8. El método de la reivindicación 7, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
9. El método de la reivindicación 7, en el que el fragmento es F(ab)₂, Fab, Fv o Fd, V_H o V_L.

Figura 1

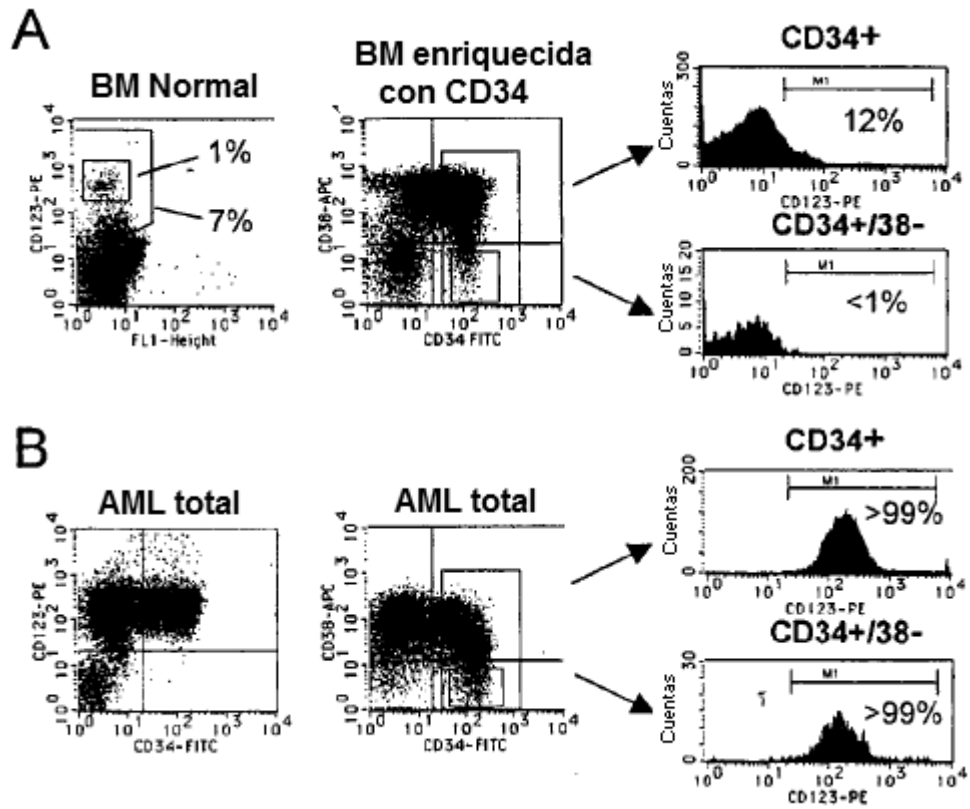


Figura 2

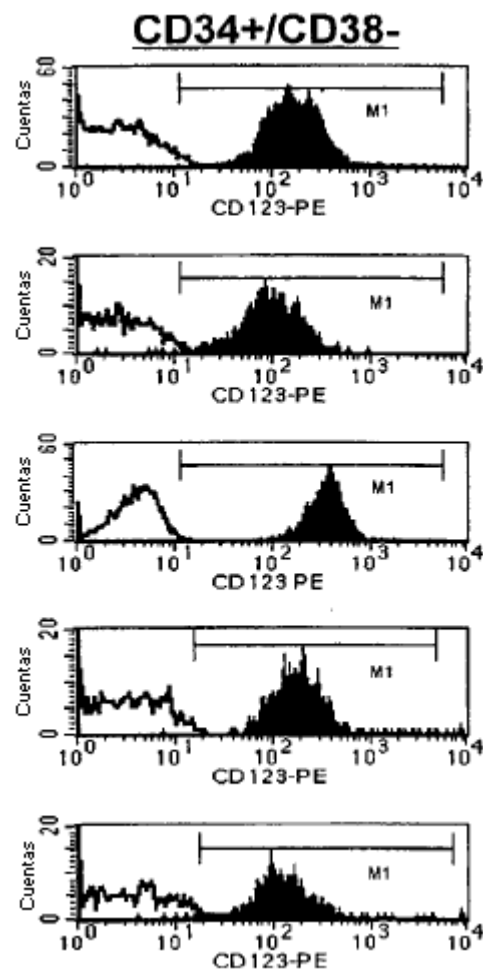


Figura 3

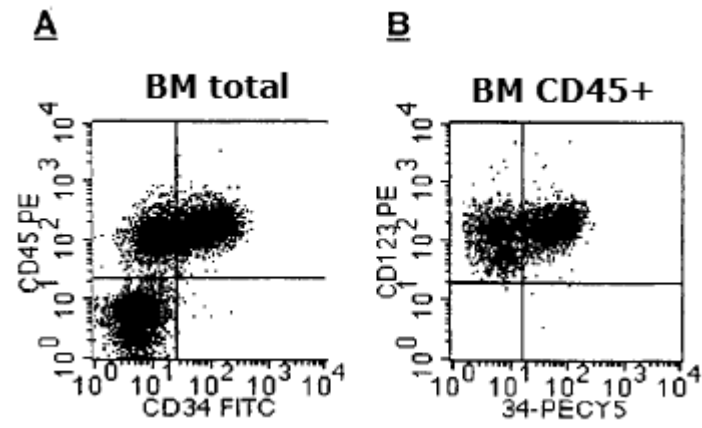


Figura 4

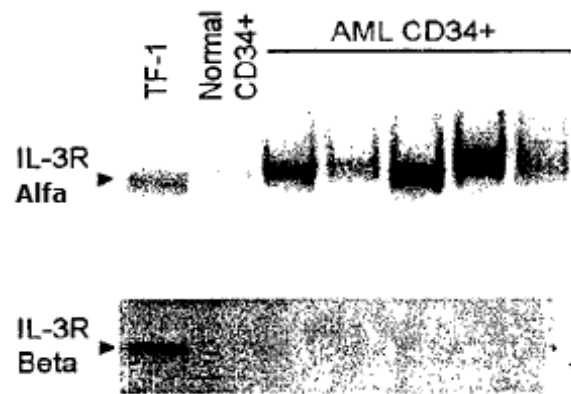


Figura 5

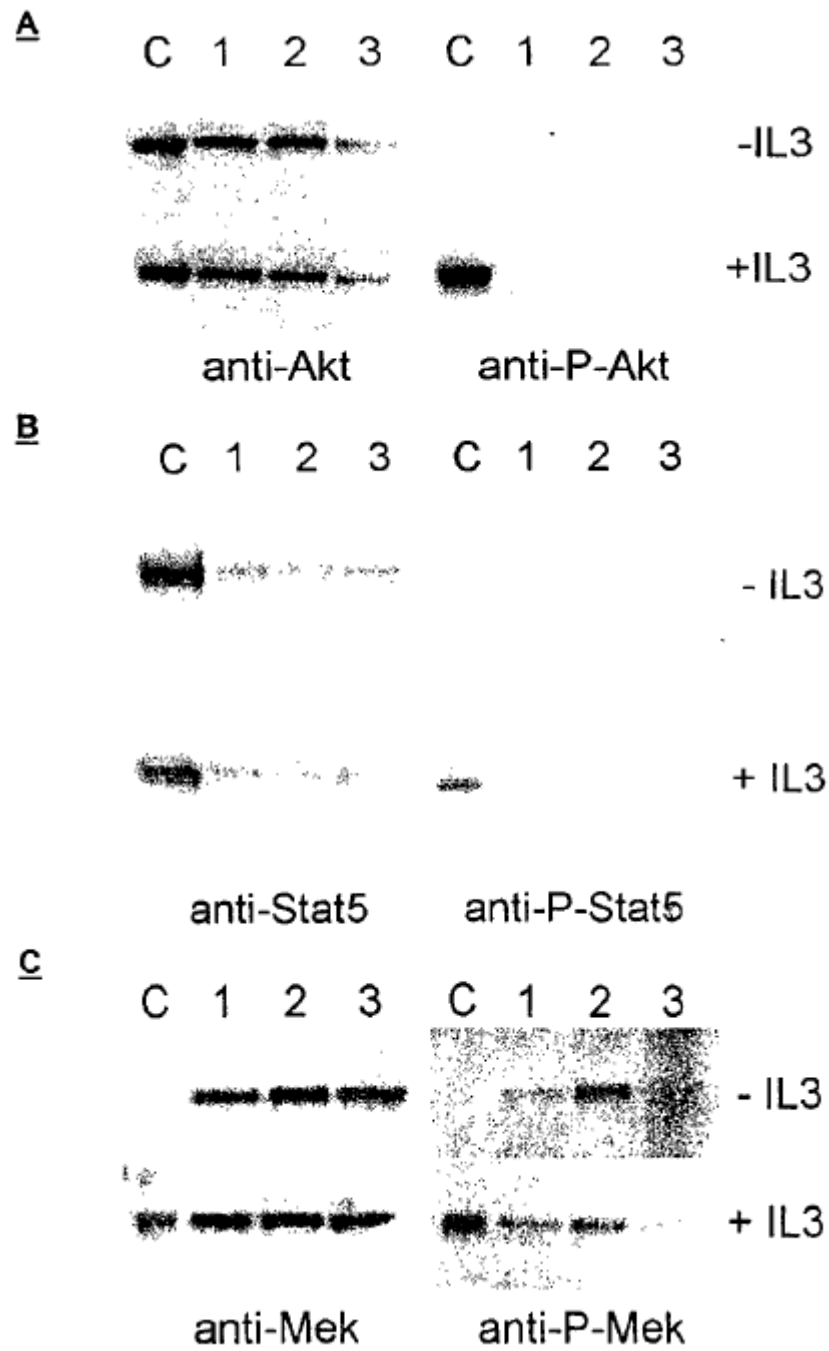
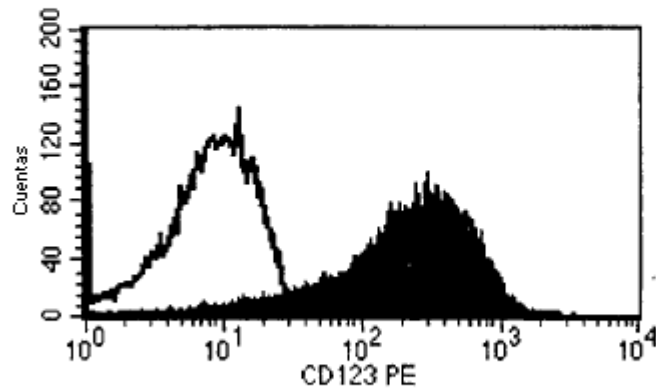
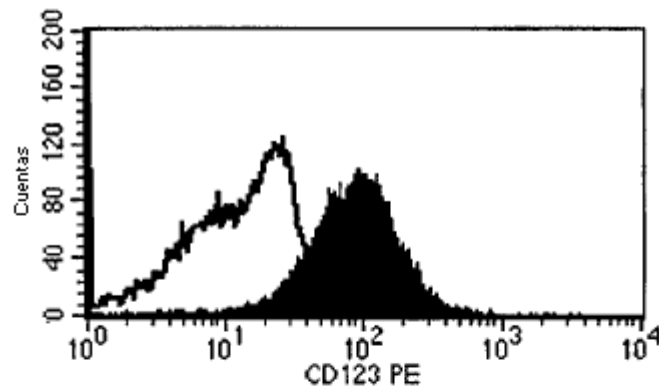


FIG. 6

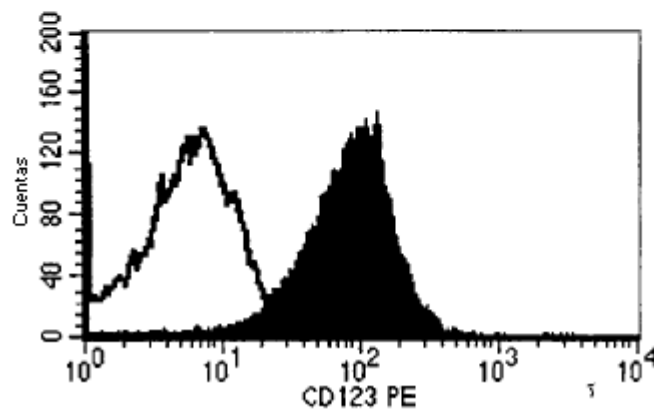
Expresión de CD123 en ALL Primaria



A



B

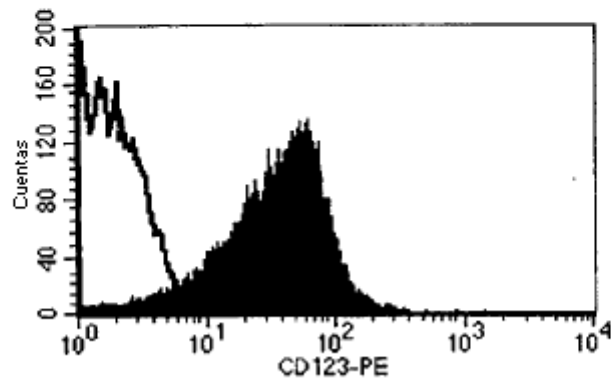


C

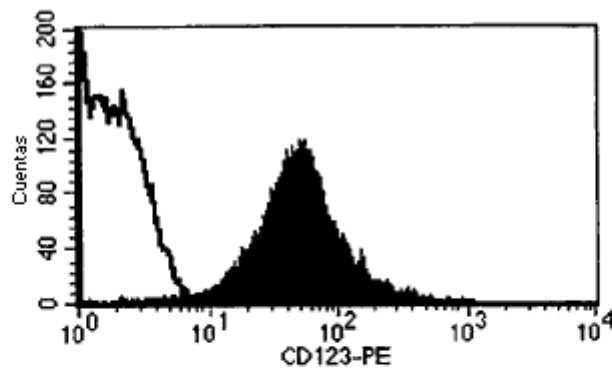
Análisis por citometría de flujo de la expresión de CD123 en tres muestras independientes de ALL (leucemia linfocítica aguda) primaria. El marcaje de CD123 se muestra por los gráficos llenos (oscuros) y los controles se muestran por los gráficos vacíos.

FIG. 7

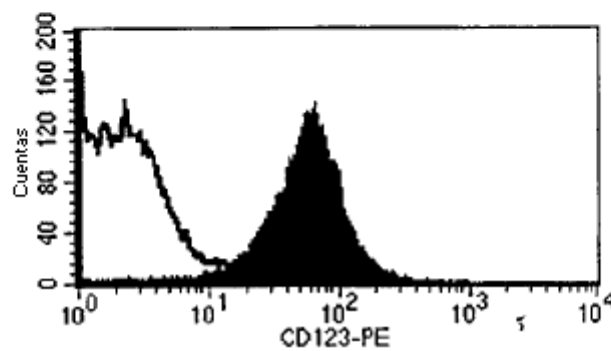
Expresión de CD123 en CML Primaria



A



B



C

Análisis por citometría de flujo de la expresión de CD123 en tres muestras independientes de CML (leucemia mielógena crónica) primaria. El marcaje de CD123 se muestra por los gráficos llenos (oscuros) y los controles se muestran por los gráficos vacíos.