(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 714 716**

(51) Int. CI.:

A61K 51/10 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 47/68 (2007.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C12N 15/115 (2010.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.01.2012 E 15197139 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 3020730**

(54) Título: **Anticuerpos anti-IL1RAP y su uso para el tratamiento de tumores sólidos**

(30) Prioridad:

19.01.2011 US 201161434040 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.05.2019

(73) Titular/es:

CANTARGIA AB (100.0%)
Medicon Village Scheelevägen 2
223 81 Lund, SE

(72) Inventor/es:

FIORETOS, THOAS y
JÄRÅS, MARCUS

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

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

Anticuerpos anti-IL1RAP y su uso para el tratamiento de tumores sólidos

Campo de la invención

La presente invención se refiere a agentes para su uso en el tratamiento y el diagnóstico de tumores sólidos, tales como cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, melanomas, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro/SNC, cáncer de cuello uterino, cáncer esofágico, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, cáncer de hígado, linfomas, cáncer de ovario, cáncer de páncreas y sarcomas.

Antecedentes de la invención

La resistencia a fármacos es un factor clave que limita la eficacia de la quimioterapia en tumores sólidos. Tales tumores pueden ser intrínsecamente resistentes antes de la quimioterapia o la resistencia pueden adquirirla durante el tratamiento los tumores que son inicialmente sensibles a la quimioterapia.

Además, en el proceso de adquirir resistencia, el tumor puede llegar a tener resistencia cruzada a una serie de quimioterapias y tener como resultado la resistencia, que finalmente lleva al fracaso del tratamiento en más del 90 % de los pacientes con enfermedad metastásica.

Balagurunathan 2008, Mol Cancer Ther.; 7(9): describe una identificación basada en el perfil de expresión génica de dianas en la superficie celular para desarrollar ligandos multiméricos en el cáncer de páncreas. Usando este enfoque, los autores informan sobre la identificación de combinaciones de genes que se expresan a un nivel de unión eficiente en tumores pero no en tejidos normales, que se pueden usar para desarrollar ligandos multiméricos para la obtención de imágenes y el tratamiento del cáncer de páncreas.

De acuerdo con lo anterior, la presente invención pretende proporcionar nuevos agentes y métodos para su uso en el tratamiento y diagnóstico de tumores sólidos.

Sumario de la invención

Un primer aspecto de la invención proporciona un agente que comprende o consiste en un anticuerpo, o fragmento de unión del mismo, con especificidad para la proteína accesoria del receptor de interleucina-1 (IL1RAP). Por lo tanto, la invención proporciona agentes para uso en el tratamiento o prevención de un tumor sólido en un paciente.

Por “proteína accesoria del receptor de interleucina-1", "IL1RAP" e "IL1-RAP" se incluye específicamente la proteína IL1RAP humana, por ejemplo, como se describe en el número de Acceso de GenBank n.º AAB84059, Secuencia de Referencia de NCBI: NP_002173.1 y UniProtKB/N.º de Acceso de Swiss-Prot Q9NPH3-1 (véase también Huang et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94 (24), 12829-12832). La IL1RAP también se conoce en la bibliografía científica como IL1R3, C3orf13, FLJ37788, IL 1RAcP y EG3556.

Ventajosamente, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, es capaz de unirse selectivamente (es decir, preferentemente) a IL1RAP en condiciones fisiológicas. El anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, tiene, preferentemente, especificidad por la IL1 RAP humana, que puede localizarse en la superficie de una célula (por ejemplo, la célula tumoral sólida).

Por "células asociadas a un tumor sólido" se incluyen células de tumores sólidos *per se*. Además, tales células incluyen células madre patológicas (es decir, células madre cancerosas, CMC) y células progenitoras que son responsables, directa o indirectamente, del desarrollo de un tumor sólido en un individuo. Ejemplos de CMC se divulgan en Visvader y Lindeman, 2008, Nat Rev Cancer 8:755-768.

En una realización del primer aspecto de la invención, el tumor sólido se selecciona del grupo que consiste en cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, melanomas, cáncer de vejiga, cáncer de cerebral/SNC, cáncer de cuello uterino, cáncer esofágico, cáncer gástrico, cáncer de cabeza / cuello, cáncer de riñón, cáncer de hígado, linfomas , cáncer de ovario, cáncer de páncreas y sarcomas. Por ejemplo, el tumor sólido puede seleccionarse del grupo que consiste en cánceres de próstata, mama, piel, colon, pulmón, órganos urinarios y útero. En otra realización, el tumor sólido puede seleccionarse entre los grupos que consisten en cáncer de próstata, melanomas, cáncer de cuello uterino, cáncer esofágico y cáncer de cabeza y/o cuello.

En una realización adicional del primer aspecto de la invención, el tumor sólido es un melanoma.

En relación con los aspectos terapéuticos y profilácticos de la invención, los expertos en la técnica apreciarán que la unión del agente a la IL1RAP presente en la superficie de las células asociadas al tumor sólido puede llevar a una modulación (es decir un aumento o disminución) de una actividad biológica de la IL1RAP. Sin embargo, tal efecto

modulador no es esencial; por ejemplo, los agentes de la invención pueden producir un efecto terapéutico y profiláctico simplemente en virtud de la unión a IL1RAP en la superficie de las células asociadas al tumor sólido, que a su vez puede activar al sistema inmunológico para inducir la muerte celular (por ejemplo, mediante CCDA y / o por la presencia dentro del agente de un resto citotóxico / radioactivo).

Por "actividad biológica de la IL1RAP" se incluye cualquier interacción o acontecimiento de señalización que involucra a la IL1RAP en las células asociadas al tumor sólido. Por ejemplo, en una realización, el agente es capaz de bloquear la unión de uno o de más correceptores a IL1RAP (tal como IL1R1, ST2, C-KIT y/o IL1RL2).

Tal inhibición de la actividad biológica de IL1RAP por un agente de la invención puede ser completa o parcial. Por ejemplo, el agente puede inhibir la actividad biológica de IL1RAP en al menos un 10 %, preferentemente por lo menos 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 %, y más preferentemente en un 100 % en comparación con la actividad biológica de IL1RAP en las células asociadas al tumor sólido que no han sido expuestas al agente. En una realización preferida, el agente es capaz de inhibir la actividad biológica de IL1RAP en un 50 % o más en comparación a la actividad biológica de IL1RAP en células asociadas al tumor sólido que no han sido expuestas al agente.

Asimismo, se apreciará que la inhibición del crecimiento y / o la proliferación de las células asociadas al tumor sólido puede ser total o parcial. Por ejemplo, el agente puede inhibir el crecimiento y / o la proliferación de las células asociadas al tumor sólido en al menos 10%, preferentemente al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90%, y lo más preferentemente en 100% en comparación con el crecimiento y / o proliferación de células asociadas al tumor sólido que no se han expuesto al agente.

En una realización adicional preferida, el agente es capaz de destruir las células asociadas al tumor sólido. Por ejemplo, el agente puede inducir apoptosis mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA).

Como se ha indicado anteriormente, los agentes de la invención pueden comprender o consistir en cualquier entidad química que constituya un resto de unión con especificidad por IL1RAP.

En la técnica se conocen métodos para detectar interacciones entre una entidad química de ensayo e IL1RAP. Por ejemplo, pueden utilizarse la ultrafiltración con métodos de espectroscopía de masas con pulverización iónica / HPLC u otros métodos físicos y analíticos. Además, pueden utilizarse métodos de Transferencia de Resonancia de Energía de Fluorescencia (FRET), en los cuales la unión de dos las entidades marcadas con fluorescencia pueden medirse midiendo la interacción de los marcadores fluorescentes cuando están muy próximos entre sí.

Como métodos alternativos para detectar la unión de IL1RAP a macromoléculas, por ejemplo, ADN, ARN, proteínas y fosfolípidos, se incluyen un ensayo de resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, como se describe en Plant et al., 1995, Analyt Biochem 226 (2), 342-348. Dichos métodos pueden utilizar un polipéptido que está marcado, por ejemplo, con un marcador radioactivo o fluorescente.

Un método adicional para identificar una entidad química que sea capaz de unirse a IL1RAP es uno en donde la proteína se expone al compuesto y se detecta y/o se mide cualquier unión del compuesto con dicha proteína. Se puede determinar la constante de unión para la unión del compuesto con el polipéptido. Los expertos en la técnica conocen bien métodos adecuados para detectar y/o medir (cuantificar) la unión de un compuesto con un polipéptido y se puede realizar, por ejemplo, utilizando un método capaz de realizar una operación de alto rendimiento, por ejemplo, un método basado en microplacas. La nueva tecnología, denominada VLSIPS™, ha permitido la producción de microplacas extremadamente pequeñas que contienen cientos de miles o más de diferentes sondas moleculares. Estas microplacas biológicas tienen sondas dispuestas en matrices, y a cada sonda se le asigna una ubicación específica. Se han producido microplacas biológicas en las que cada ubicación tiene una escala, por ejemplo, de diez micrómetros.
Las microplacas pueden utilizarse para determinar si las moléculas diana interaccionan con alguna de las sondas de la microplaca. Después de exponer la matriz para dirigir moléculas en condiciones de ensayo seleccionadas, los dispositivos de escaneo pueden examinar cada ubicación en la matriz y determinar si una molécula diana ha interaccionado con la sonda en esa ubicación.

Otro método para identificar compuestos con afinidad de unión por IL1 RAP es el sistema de doble híbrido de levadura, donde los polipéptidos de la invención pueden utilizarse para "capturar" proteínas que se unen a IL1RAP. El sistema de doble híbrido de levadura se describe en Fields & Song, Nature 340: 245-246 (1989).

Por “anticuerpo” se incluyen moléculas sustancialmente intactas, así como anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos (en los que al menos un aminoácido está mutado con relación con los anticuerpos humanos de origen natural), anticuerpos de cadena simple, anticuerpos biespecíficos, cadenas pesadas de anticuerpos, cadenas ligeras de anticuerpos, homodímeros y heterodímeros de cadenas pesadas y/o ligeras de anticuerpos, y fragmentos de unión a antígeno y derivados de los mismos.

Por “fragmento de unión a antígeno” se entiende un fragmento funcional de un anticuerpo que es capaz de unirse a IL1RAP.

Preferentemente, el fragmento de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en fragmentos Fv (por ejemplo, Fv de cadena simple y Fv unido a disulfuro), fragmentos del tipo Fab (por ejemplo, fragmentos Fab, fragmentos Fab’ y fragmentos $F(ab)_2$), dominios variables sencillos (por ejemplo, dominios V_H y V_L) y anticuerpos de dominio (dAb, incluyendo los formatos simples y dobles [es decir dAb-enlazador-dAb]).

Las ventajas de utilizar fragmentos de anticuerpos, en lugar de anticuerpos enteros, son diversas. El tamaño más pequeño de los fragmentos puede dar lugar a propiedades farmacológicas mejoradas, tal como mejor penetración del tejido sólido. Además, los fragmentos de unión a antígeno tales como los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv, ScFv y dAb pueden expresarse en y secretados por *E. coli*, lo que permite la producción fácil de grandes cantidades de dichos fragmentos.

Dentro del alcance de la invención, también se incluyen versiones modificadas de anticuerpos y de fragmentos de unión a antígeno de los mismos, por ejemplo, modificados por la unión covalente de polietilenglicol u otro polímero adecuado (véase más adelante).

Los métodos para generar anticuerpos y fragmentos de anticuerpos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos pueden generarse mediante uno cualquiera de diversos métodos que emplean la inducción de la producción *in vivo* de moléculas de anticuerpo, detección selectiva en bibliotecas de inmunoglobulina (Orlandi. et al, 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:3833-3837; Winter et al., 1991, Nature 349:293-299) o generación de moléculas de anticuerpo monoclonal por líneas celulares en cultivo. Estos incluyen, pero no se limitan a, la técnica del hibridoma, la técnica de hibridoma de linfocito B humano, y la técnica de hibridoma-virus de Epstein-Barr (EBV) (Kohler et al., 1975. Nature 256:4950497; Kozbor et al., 1985. J. Immunol. Methods 81:31-42; Cote et al., 1983. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026-2030; Cole et al., 1984. Mol. Cell. Biol. 62:109-120).

Los anticuerpos monoclonales adecuados frente a antígenos seleccionados pueden prepararse mediante técnicas conocidas, por ejemplo, las divulgadas en “Monoclonal Antibodies: A manual of techniques”, H Zola (CRC Press, 1988) y en “Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications”, J G R Hurrell (CRC Press, 1982).

Asimismo, los fragmentos de anticuerpo pueden obtenerse utilizando métodos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, 1988, "Antibodies: A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Laboratory, New York). Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo según la presente invención, pueden prepararse mediante hidrólisis proteolítica del anticuerpo o mediante expresión en células de *E. coli* o de mamífero (por ejemplo, cultivo de células de ovario de hámster chino u otros sistemas de expresión de proteínas) de ADN que codifica el fragmento. Como alternativa, los fragmentos de anticuerpo pueden obtenerse mediante digestión con pepsina o papaína de anticuerpos enteros por métodos convencionales.

Los expertos en la técnica apreciarán que, para la terapia o el diagnóstico en seres humanos, preferentemente se utilizan anticuerpos humanos o humanizados. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos diseñados genéticamente o fragmentos de anticuerpo que tienen preferentemente partes mínimas derivadas de anticuerpos no humanos. Los anticuerpos humanizados incluyen anticuerpos en los que las regiones determinantes de la complementariedad de un anticuerpo humano (anticuerpo del receptor) se han reemplazado por residuos de una región determinante de la complementariedad de una especie no humana (anticuerpo de donante) tal como de ratón, de rata, de conejo, que tiene la funcionalidad deseada. En algunos casos, los residuos del marco de Fv del anticuerpo humano son reemplazados por los correspondientes residuos no humanos. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo del receptor ni en la región determinante de la complementariedad importada ni en las secuencias marco. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones determinantes de la complementariedad corresponden a las de un anticuerpo no humano y todas, o sustancialmente todas, las regiones marco corresponden a las de una secuencia consenso humana relevante. Óptimamente, los anticuerpos humanizados también incluyen al menos una parte de una región constante de anticuerpo, tal como una región de Fc, normalmente derivada de un anticuerpo humano (véase, por ejemplo, Jones et al,. 1986. Nature 321:522-525; Riechmann et al., 1988, Nature 332:323-329; Presta, 1992, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596).

Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica. Generalmente, el anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácido introducidos en él desde una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos, a menudo denominados residuos importados, se obtienen normalmente de un dominio variable importado. La humanización puede realizarse esencialmente como se ha descrito (véase, por ejemplo, Jones et al., 1986, Nature 321:522-525; Reichmann et al., 1988. Nature 332:323-327; Verhoeyen et al., 1988, Science 239:1534-1536l; documento US 4,816,567) sustituyendo regiones determinantes de la complementariedad humanas con regiones determinantes de la complementariedad de roedor correspondientes. Por consiguiente, tales anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos, en los que sustancialmente menos que un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la correspondiente secuencia de una especie no

humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados pueden ser anticuerpos normalmente humanos en los que algunos residuos de la región determinante de la complementariedad y posiblemente algunos residuos de la región marco son sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

Los anticuerpos humanos también pueden identificarse utilizando varias técnicas conocidas en la técnica, incluyendo bibliotecas de reexpresión en fagos (véase, por ejemplo, Hoogenboom & Winter, 1991, J. Mol. Biol. 227:381; Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222:581; Cole et al., 1985, In: Monoclonal antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, pp. 77; Boerner et al., 1991. J. Immunol. 147:86-95).

Una vez obtenidos los anticuerpos adecuados, pueden señalizarse para determinar la actividad, por ejemplo por ELISA.

Además del resto de unión, los agentes de la invención pueden comprender adicionalmente un resto para aumentar la semivida *in vivo* del agente, tal como, pero sin limitación, polietilenglicol (PEG), seroalbúmina humana, grupos de glicosilación, ácidos grasos y dextrano. Tales restos adicionales pueden conjugarse o, de otro modo, pueden combinarse con el resto de unión utilizando métodos bien conocidos en la técnica.

Igualmente, se apreciará que los agentes de la invención pueden comprender además un resto citotóxico.

Por ejemplo, el resto citotóxico puede comprender o puede consistir en un radioisótopo, tal como, astatino-211, bismuto-212, bismuto-213, yodo-131, itrio-90, lutecio-177, samario-153 y paladio-109.

Como alternativa, el resto citotóxico puede comprender o puede consistir en una toxina (tal como saporina o calicamicina).

En una alternativa adicional, el resto citotóxico puede comprender o puede consistir en un agente quimioterapéutico (tal como un antimetabolito).

Igualmente, se apreciará que los agentes de la invención pueden comprender además un resto detectable.

Por ejemplo, el resto detectable puede comprender o puede consistir en un radioisótopo, tal como tecnicio-99m, indio-111, galio-67, galio-68, arsénico-72, circonio-89, yodo-12 o talio-201.

Como alternativa, el resto detectable comprende o consiste en un isótopo paramagnético, tal como gadolinio-157, manganeso-55, disprosio-162, cromo-52 o hierro-56.

Los restos citotóxicos y detectables pueden conjugarse, o de otro modo, combinarse, con el resto de unión utilizando métodos bien conocidos en la técnica (por ejemplo, la terapia existente del inmunoconjugado gemtuzumab ozogamicina [nombre comercial: Mylotarg®], comprende un anticuerpo monoclonal ligado a la citotoxina calicamicina).

En el presente documento también se describe una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de un agente, como se define con relación al primer aspecto de la invención, junto con un tampón, diluyente, vehículo, adyuvante o excipiente farmacéutico aceptable.

En las composiciones también pueden incluirse compuestos adicionales, incluyendo, agentes quelantes tales como EDTA, citrato, EGTA o glutatión.

Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse de una manera conocida en la técnica de forma que sean lo suficientemente estables durante el almacenamiento y adecuadas para la administración a seres humanos y animales. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas pueden liofilizarse, por ejemplo, por secado por congelación, secado por aspersión, enfriado por aspersión, o mediante el uso de formación de partículas de la formación supercrítica de partículas.

Por "farmacéuticamente aceptable" los inventores quieren decir un material no tóxico que no disminuye la eficacia de la actividad de unión a IL1RAP del agente de la invención. Tales tampones, vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables son muy conocidos en la técnica (véase Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, A.R Gennaro, Ed., Mack Publishing Company (1990) y handbook of Pharmaceutical Excipients, 3ª edición, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press (2000)).

Con el término "tampón" se pretende decir una solución acuosa que contiene una mezcla de ácido-base con el propósito de estabilizar el pH. Ejemplos de tampones son Trizma, Bicina, Tricina, MOPS, MOPSO, MOBS, Tris, Hepes, HEPBS, MES, fosfato, carbonato, acetato, citrato, glicolato, lactato, borato, ACES, ADA, tartrato, AMP, ATMP, AMPSO, BES, CABS, cacodilato, CHES, DIPSO, EPPS, etanolamina, glicina, HEPPSO, imidazol, ácido imidazoleláctico, PIPES, SSC, SSPE, POPSO, TAPS, TABS, TAPSO y TES.

Con el término "diluyente" se pretende decir una solución acuosa o no acuosa con el propósito de diluir al agente en la preparación farmacéutica. El diluyente puede ser uno o más de solución salina, agua, polietilenglicol, propilenglicol, etanol o aceites (tales como aceite colza, aceite de maíz, aceite de cacahuate, aceite de algodón o aceite de sésamo).

Con el término "adyuvante" se pretende decir cualquier compuesto añadido a la formulación para aumentar el efecto biológico del agente de la invención. El adyuvante puede ser uno o más de sales de cinc, cobre o plata con aniones diferentes, por ejemplo, pero sin limitaciones, fluoruro, cloruro, bromuro, yoduro, tiocianato, sulfito, hidróxido, fosfato, carbonato, lactato, glicolato, citrato, borato, tartrato, y acetatos de composición diferente de acilo. El adyuvante también pueden ser polímeros catiónicos tales como éteres catiónicos de celulosa, ésteres catiónicos de celulosa, ácido hialurónico desacetilado, quitosán, dendrímeros catiónicos, polímeros sintéticos catiónicos tales como poli (vinil imidazol), y polipéptidos catiónicos tales como polihistidina, polilisina, poliarginina, y péptidos que contienen estos aminoácidos.

El excipiente puede ser uno o más de carbohidratos, polímeros, lípidos y minerales. Ejemplos de carbohidratos incluyen lactosa, glucosa, sacarosa, manitol y ciclodextrinas, que se añaden a la composición, por ejemplo, para facilitar la liofilización. Ejemplos de polímeros son almidón, éteres de celulosa, celulosa carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetil celulosa, hidroxietil celulosa, etilhidroxietilcelulosa, alginatos, carragenina, ácido hialurónico y derivados de los mismos, ácido poliacrílico, polisulfonato, polietilenglicol/óxido de polietileno, copolímeros de óxido de polietileno/óxido de polipropileno, alcohol polivinílico/acetato de polivinilo de diferente grado de hidrólisis, y polivinilpirrolidona, todos de diferente peso molecular, que son agregados a la composición, por ejemplo, para control de la viscosidad, para lograr la bioadhesión, o para proteger el lípido de la degradación química o proteolítica. Ejemplos de lípidos son ácidos grasos, fosfolípidos, mono-, di-, y triglicéridos, ceramidas, esfingolípidos y glucolípidos, todos de longitud diferente de cadena de acilo y saturación, lecitina de huevo, lecitina de soya, lecitina de huevo y soya hidrogenada, que son añadidas a la composición por razones semejantes a ésas de los polímeros. Ejemplos de minerales son talco, óxido de magnesio, óxido de zinc y óxido de titanio, que son añadidos a la composición para obtener beneficios tales como la reducción de la acumulación de líquido o propiedades ventajosas de pigmento.

Los agentes de la invención pueden formularse en cualquier tipo de composición farmacéutica que en la técnica se sabe que es adecuada para la administración de la misma.

En una realización, las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de un liposoma, en donde el agente se combina, además de con otros vehículos farmacéuticamente aceptables, con agentes anfipáticos tales como lípidos, que existen en formas agregadas tales como micelas, monocapas insolubles y cristales líquidos. Los lípidos adecuados para la formulación en liposomas incluyen, sin limitación, monoglicéridos, diglicéridos, sulfátidos, lisolecitina, fosfolípidos, saponinas, ácidos de bilis, y similares. Los lípidos adecuados también incluyen los lípidos anteriores modificados por poli(etilenglicol) en el grupo de cabeza polar para prolongar el tiempo de circulación en la corriente sanguínea. La preparación de tales formulaciones liposomales se puede encontrar, por ejemplo, en el documento US 4.235.871.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden estar en forma de microesferas biodegradables. Los poliésteres alifáticos, tales como poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), copolímeros de PLA y PGA (PLGA) o poli(carprolactona) (PCL), y polianhídridos se han usado ampliamente como polímeros biodegradables en la producción de microesferas. Las preparaciones de tales microesferas pueden encontrarse en los documentos US 5.851.451 y EP 0 213 303.

Las composiciones farmacéuticas se pueden proporcionar en forma de geles de polímero, en los que los polímeros tales como almidón, éteres de celulosa, celulosa carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, etilhidroxietilcelulosa, alginatos, carragenina, ácido hialurónico y derivados de los mismos, ácido poliacrílico, polisulfonato, polietilenglicol/óxido de polietileno, copolímeros de óxido de polietileno/óxido de polipropileno, alcohol polivinílico/acetato de polivinilo de diferente grado de hidrólisis, y polivinilpirrolidona se usan para el espesamiento de la solución que contiene al agente. Los polímeros también pueden comprender gelatina o colágeno.

Como alternativa, los agentes pueden simplemente disolverse en solución salina, agua, polietilenglicol, propilenglicol, etanol o aceites (tal como aceite de colza, aceite de maíz, aceite de cacahuate, aceite de algodón o aceite de sésamo), goma de tragacanto, y/o varios tampones.

Se apreciará que las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden incluir iones y un pH definido para la potenciación de la acción del agente activo. Adicionalmente, las composiciones pueden someterse a operaciones farmacéuticas convencionales, tales como esterilización, y/o pueden contener adyuvantes convencionales tales como conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, emulsionantes, tampones, cargas, etc.

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar a través de cualquier vía adecuada conocida por los expertos en la técnica. Por tanto, las posibles vías de administración incluyen parenteral (intravenosa, subcutánea, e

intramuscular), tópica, ocular, nasal, pulmonar, bucal, oral, parenteral, vaginal y rectal. También es posible la administración de implantes.

En una realización preferida, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar por vía parenteral, por ejemplo, por las vías intravenosa, intracerebroventricular, intraarticular, intraarterial, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intraesternal, intracraneal, intramuscular o subcutánea, o se pueden administrar mediante técnicas de infusión. Se usan de forma conveniente en forma de una solución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo, suficientes sales o glucosa para hacer la solución isotónica con la sangre. Las soluciones acuosas deben tamponarse convenientemente (preferentemente a un pH de 3 a 9), si es necesario. La preparación de formulaciones parenterales convenientes en condiciones estériles se logra fácilmente mediante técnicas farmacéuticas estándar bien conocidas por los expertos en la técnica.

Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen soluciones inyectables acuosas y no acuosas estériles que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostatos y solutos que vuelven la formulación isotónica con la sangre del receptor previsto; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes de espesamiento. Las formulaciones pueden ser presentadas en contenedores de unidad de dosis o de multi-dosis, por ejemplo ampolletas y frascos sellados, y pueden ser almacenados en una condición secada por congelación (liofilizado) que requiere sólo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente antes del uso. Las soluciones y suspensiones de inyección extemporánea pueden ser preparadas de polvos estériles, gránulos y comprimidos de la clase descrita anteriormente.

Por tanto, las composiciones farmacéuticas son particularmente adecuadas para administración parenteral, por ejemplo intravenosa.

Como alternativa, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por vía intranasal o por inhalación (por ejemplo, en forma de una presentación de rocío de aerosol de un contenedor presurizado, bomba, rociador o nebulizador con el uso de un propelente conveniente, tal como diclorodifluorometano, triclorofluoro-metano, diclorotetrafluoro-etano, un hidrofluoroalcano tal como 1,1,1,2-tetrafluoroetano (HFA 134A3 o 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano (HFA 227EA3), bióxido de carbono u otro gas conveniente). En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosis puede ser determinada proporcionando una válvula para entregar una cantidad medida. El contenedor presurizado, la bomba, el rociador o nebulizador pueden contener una solución o suspensión del polipéptido activo, por ejemplo utilizando una mezcla de etanol y el propelente como el solvente, que puede contener adicionalmente un lubricante, por ejemplo trioleato de sorbitán.

Las cápsulas y los cartuchos (formados, por ejemplo, de gelatina) para uso en un inhalador o insuflador pueden formularse para contener una mezcla de polvo de un compuesto de la invención y una base de polvo conveniente tal como la lactosa o almidón.

Las composiciones farmacéuticas se administrarán a un paciente a una dosis farmacéuticamente efectiva. Una 'cantidad terapéuticamente efectiva', o "cantidad efectiva", o 'terapéuticamente efectiva', como se utiliza en la presente invención, se refiere a esa cantidad que proporciona un efecto terapéutico para una condición dada y régimen de administración. Esto es una cantidad predeterminada de material activo que se calcula para producir un efecto terapéutico deseado junto con el aditivo o diluyente requerido, es decir, un vehículo o vehículo de administración. Además, pretende significar una cantidad suficiente para reducir, y más preferentemente, prevenir, un déficit clínicamente significativo en la actividad, la función y la respuesta del huésped. Como alternativa, una cantidad terapéuticamente efectiva es suficiente para causar una mejora en una condición clínicamente significativa en un huésped. Como aprecian los expertos en la técnica, la cantidad de un compuesto puede variar dependiendo de su actividad específica. Las cantidades convenientes de la dosis pueden contener una cantidad predeterminada de composición activa que se calcula para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el diluyente requerido. En los métodos y uso para la fabricación de las composiciones de la invención, se proporciona una cantidad terapéuticamente efectiva del componente activo. El trabajador experto, médico o veterinario puede determinar una cantidad terapéuticamente efectiva según las características de los pacientes, tales como la edad, el peso, el sexo, la afección, las complicaciones, otras enfermedades, etc., como es sabido en la técnica. La administración de la dosis farmacéuticamente efectiva puede ser llevada a cabo mediante una sola administración en forma de una unidad de dosis individual o, en cambio, de varias unidades de dosis más pequeñas y también mediante múltiples administraciones de dosis subdivididas en intervalos específicos. Como alternativa, las dosis pueden administrarse en forma de una infusión continua durante un período prolongado.

Los polipéptidos pueden formularse en varias concentraciones, dependiendo de la eficacia/toxicidad del compuesto a ser utilizado. Preferentemente, la formulación comprende al agente activo en una concentración de entre 0,1 µM y 1 mM, más preferentemente entre 1 µM y 500 µM, entre 500 µM y 1 mM, entre 300 µM y 700 µM, entre 1 µM y 100 µM, entre 100 µM y 200 µM, entre 200 µM y 300 µM, entre 300 µM y 400 µM, entre 400 µM y 500 µM y más preferentemente aproximadamente 500 µM.

Los expertos en la técnica apreciarán que las composiciones farmacéuticas pueden administrarse solas o en combinación con otros agentes terapéuticos utilizados en el tratamiento de tumores sólidos, tales como

antimetabolitos, agentes alquilantes, antraciclinas y otros antibióticos citotóxicos, tales como alcaloides vinca, etopósido, compuestos de platino, taxanos, inhibidores de topoisomerasa I, inmunosupresores antiproliferativos, corticosteroides, hormonas sexuales y antagonistas de hormonas, y otros anticuerpos terapéuticos (tal como trastuzumab).

En el presente documento también se describe un kit que comprende a un agente como se define en relación con el primer aspecto de la invención o una composición farmacéutica del mismo.

En el presente documento también se describe el uso de un agente como se define en relación con el primer aspecto de la invención, en la preparación de un medicamento para inducir muerte celular y/o inhibir el crecimiento y/o la proliferación de células asociadas a un tumor sólido, en donde las células expresan IL1RAP.

En el presente documento también se describe el uso de un agente como se define en relación con el primer aspecto de la invención, para detectar células asociadas a un tumor sólido, en donde las células expresan IL1RAP.

En los aspectos de uso anteriores, el tumor sólido se selecciona del grupo que consiste en cánceres de cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, melanomas, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro/SNC, cáncer de cuello uterino, cáncer esofágico, cáncer de cabeza/cuello, cáncer de riñón, cáncer de hígado, linfomas, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, y sarcomas. Por ejemplo, el tumor sólido puede seleccionarse del grupo que consiste en cánceres de la glándula prostática, mama, piel, colon, pulmón, órganos urinarios y útero. En otra realización, el tumor sólido puede seleccionarse entre los grupos que consisten en cáncer de próstata, melanomas, cáncer de cuello uterino, cáncer esofágico y cáncer de cabeza y/o cuello.

En una realización adicional, el tumor sólido es un melanoma.

En el presente documento también se describe un método para inducir la muerte celular y/o inhibir el crecimiento y/o la proliferación de células asociadas a un tumor sólido en un individuo, que comprende la etapa de administrar al individuo una cantidad efectiva de un agente, como se define con relación al primer aspecto de la invención, o una composición farmacéutica del mismo, en donde las células expresan IL1RAP.

Por tanto, el método es para el tratamiento de tumores sólidos. Por "tratamiento" los inventores incluyen tanto el tratamiento terapéutico como el profiláctico del paciente. El término "profiláctico" se usa para abarcar el uso de un polipéptido o la formulación descrita en el presente documento que prevenga o reduzca la probabilidad de un tumor sólido en un paciente o sujeto.

En una realización del método anterior, el tumor sólido se selecciona del grupo que consiste en cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, melanomas, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro/SNC, cáncer de cuello uterino, cáncer esofágico, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, cáncer de hígado, linfomas, cáncer de ovario, cáncer de páncreas y sarcomas. Por ejemplo, el tumor sólido puede seleccionarse del grupo que consiste en cánceres de la glándula prostática, mama, piel, colon, pulmón, órganos urinarios y útero. En otra realización, el tumor sólido puede seleccionarse de los grupos que consisten en cáncer de próstata, melanomas, cáncer de cuello uterino, cáncer esofágico y cáncer de cabeza y/o cuello.

En una realización adicional, el tumor sólido es un melanoma.

Ejemplos preferidos no limitantes que abarcan ciertos aspectos de la invención se describirán a continuación, con referencia a las figuras siguientes:

Figura 1. La expresión de P210 BCR/ABL1 induce IL1RAP in células CD34$^+$ sanguíneas de cordón.
El análisis de citometría de flujo confirma que la expresión de IL1RAP es inducida por la expresión de P210 BCR/ABL1 retroviral en células CD34$^+$ sanguíneas de cordón, tres días después de la transducción. Las células CD34$^+$GFP$^+$ fueron ingresadas según las entradas en los gráficos de puntos. El histograma muestra la expresión de IL1RAP para la tinción de control negativo (blanco), control MIG (gris claro) y MIG-P210 (gris oscuro). Los números en los gráficos de puntos muestran el porcentaje de células dentro de entradas/cuadrantes individuales. Se muestra un experimento representativo de tres.

Figura 2. La IL1RAP está regulada por aumento en células LMC primitivas.
Análisis FACS en las células CD34$^+$ de cinco pacientes con LMC y de 2 muestras de médula ósea (mo) normales. El gráfico de puntos de FACS muestra la entrada para células CD34$^+$CD38+ o CD34$^+$CD38$^-$ en un paciente con LMC representativo (**A**). El histograma muestra la expresión de IL1RAP dentro de las células CD34$^+$CD38$^+$ (**B**). El histograma muestra la expresión de IL1RAP dentro de las células CD34$^+$CD38$^-$ (**C**). El blanco representa las muestras de control teñidas y el gris representa las muestras teñidas de IL1RAP. Las entradas de clasificación para las células CD34$^+$CD38$^-$IL1RAP$^-$ y CD34$^+$CD38$^-$IL1RAP$^+$ se resumen en los histogramas. Los números en el gráfico de puntos e histogramas muestran el porcentaje de células dentro de las entradas/cuadrantes individuales.

Figura 3. La expresión de IL1RAP distingue las células de LMC Ph$^+$ **de Ph$^-$ dentro del compartimiento de células CD34$^+$CD38$^-$.**

El Flujo-Gota-FISH en las células DE LMC $CD34^+CD38^-IL1RAP^-$ y $CD34^+CD38^-IL1RAP^+$ de muestras de 5 pacientes con LMC reveló una separación casi completa entre las células $BCR/ABL1^-$ y $BCR/ABL1^+$, respectivamente. Las barras negras representan las células negativas a BCR/ABL1 y las barras blancas representan las células positivas a BCR/ABL1. Delineado en la parte superior de cada barra se encuentra el número de células Ph^+ de la puntuación total de núcleos.

Figura 4. La expresión de IL1RAP distingue células madre de LMC Ph^+ de CMH normales.

El número de LTC-CFC derivado de las células $CD34^+CD38^-IL1RAP^-$ y $CD34^+CD38^-IL1RAP^+$ (**A**). Las barras negras representan las células de $IL1RAP^-$ y las barras blancas representan las células de $IL1RAP^+$. FISH de interfaz en LTC-CFC (**B**). Las barras negras representan las células negativas a BCR/ABL1 y las barras blancas representan las células positivas a BCR/ABL1. Delineado en la parte superior de cada barra se encuentra el número de células Ph^+ de la puntuación total de núcleos.

Figura 5. Muerte de una línea celular de LMC mediante direccionamiento del anticuerpo frente a la IL1RAP.

El histograma muestra la expresión de IL1RAP en células de KU812 derivadas de un paciente con LMC y que contiene un cromosoma Filadelfia, comparado con la expresión en las células KG-1 que carecen de un cromosoma Filadelfia (**A**). El blanco muestra muestras teñidas de control y el gris muestra muestras teñidas de KMT-1. La línea celular leucémica KG-1 carecía de expresión IL1RAP, mientras que KU812 expresó IL1RAP (B). Como resultado, se observó un nivel bajo de la muerte celular inducida por anticuerpos en KG-1, mientras que se observó un efecto dependiente de la dosis de CCDA utilizando KMT-1 en células KU812 (B). Como control para efectos no específicos de CCDA, en los experimentos se usó un anticuerpo de conejo IgG. El gráfico muestra el promedio y la desviación estándar de la muerte celular inducida por anticuerpos de tres experimentos independientes.

Figura 6. Destrucción de células madre de LMC mediante direccionamiento del anticuerpo frente a IL1RAP.

Utilizando KMT-1, las células $CD34^+CD38^-$ de médula ósea normal dieron tinción negativa para IL1RAP, mientras que las células de LMC $CD34^+CD38^+$ y $CD34^+CD38^-$ expresaron IL1RAP. Se muestran los histogramas en LMC-1 de un experimento representativo (A). El blanco muestra muestras teñidas de control y el gris muestra muestras teñidas de KMT-1. De acuerdo con el nivel de expresión de IL1RAP, no se observó ningún efecto obvio de CCDA utilizando células $CD34^+CD38^-$ de médula ósea normal, mientras que KMT-1 indujo un efecto fuerte dependiente de dosis de CCDA tanto en las células LMC $CD34^+$ como en las $CD34^+CD38^-$ (B). Como un control para efectos no específicos de la CCDA, también se usó un anticuerpo de conejo IgG en los experimentos. El gráfico muestra el promedio y la desviación estándar de la muerte celular inducida por anticuerpos de tres experimentos independientes utilizando LMC-1, LMC-3, LMC-4, y cuatro muestras de médula ósea normal.

Figura 7. La IL1RAP se expresa también en células madre primarias de LLA y LMA.

Las células de leucemia mieloide aguda (LMA) se recibieron de pacientes en el momento del diagnóstico. Se presenta la expresión en células $CD34^+CD38^-$ y $CD34^+CD38^+$ de un paciente de LMA representativo (A). La línea celular de LMA MONO-MAC-6 y la línea celular de LLA REH expresaron IL1RAP (B). Las células de leucemia linfoide aguda (LLA) se recibieron de pacientes en el momento del diagnóstico. Se presenta la expresión de IL1RAP en células $CD34^+CD38^-$ y $CD34^+CD38^+$ de un paciente con LLA Ph^+ representativo se presenta (C). El blanco muestra las muestras teñidas de control y el gris muestra las muestras teñidas de IL1RAP.

Figura 8. Destrucción de las líneas celulares de LMA y LLA mediante direccionamiento de anticuerpo de IL1RAP.

En el ensayo de CCDA, se indujo muerte celular dependiente de la dosis de KMT-1 tanto en la línea celular MONO-MAC- 6 como en la REH, lo que sugiere que los anticuerpos de direccionamiento de IL1RAP pueden tener una ventana terapéutica más amplia que solo para la LMC. Como un control para efectos no específicos de la CCDA, también se usó un anticuerpo de conejo IgG en los experimentos. El gráfico muestra el promedio y la desviación estándar de la muerte celular inducida por anticuerpos de tres experimentos independientes.

Figura 9. Destrucción de células madre de LMA y LLA por direccionamiento de anticuerpo de IL1RAP.

En el ensayo de CCDA, se observó muerte celular inducida por KMT-1 tanto en las células primarias de LMA $CD34^+CD38^-$ (**A**) como de LLA $CD34^+CD38^-$ (**B**), lo que confirma que los anticuerpos de direccionamiento de IL1RAP también tienen un efecto terapéutico en la LMA y la LLA con regulación por incremento de IL1RAP en su superficie celular. Como un control para efectos no específicos de la CCDA, también se usó en los experimentos un anticuerpo de conejo IgG. El gráfico muestra la muerte celular inducida por anticuerpo específico.

Figura 10. La IL1RAP se expresa en células madre leucémicas de pacientes con TMP y SMP.

Gráficos de contorno que muestran la expresión de IL1RAP en células $CD34^+CD38^-$ de dos pacientes con TMP (TMP-1 y TMP-2), con y sin la mutación JAK2 (**A**). El histograma muestra la expresión de IL1RAP en un paciente de SMP que progresó a LMA (**B**). El blanco muestra las muestras teñidas de control y el gris muestra las muestras teñidas con anticuerpos anti-IL1RAP.

Figura 11. La IL1RAP se expresa en la superficie de células cancerosas de tumores sólidos.

Diferentes líneas celulares derivadas de tumores sólidos humanos se tiñeron con IL-1 RAcP/IL-1 R3-APC anti-humano (n.º de cat. FAB676A, R&D system) (líneas negras) y control de isotipo (líneas grises). El análisis por citometría de flujo muestra la expresión de IL1RAP en COLO829 (melanoma maligno), HCC1954 (carcinoma ductal de mama), NCI-8228 (adenocarcinoma de pulmón), NCI-H716 (cáncer de colon), OV-90 (adenocarcinoma de ovario), H716 (cáncer de colon), H2228 (adenocarcinoma de pulmón), SH-4 (melanoma), SR (linfoma) y SW 1783 (astrocitoma).

Figura 12. La IL1RAP se expresa en la superficie de células cancerosas de tumores sólidos.

El histograma del análisis por citometría de flujo en células de cuatro diferentes líneas celulares de cáncer humano marcadas con mab81.2, un anticuerpo contra IL1RAP, muestra la expresión de IL1RAP en H716 (cáncer de colon), H2228 (adenocarcinoma de pulmón), HCC1954 (carcinoma ductal de mama), y SH-4 (melanoma).

Figura 13. El direccionamiento de anticuerpo de IL1RAP dirige las células NK humanas de la CCDA en células cancerosas humanas.

Los gráficos muestran el grado de la muerte celular específica inducida por el anticuerpo mab81.2, IL1RAP anti-humano y células NK humanas en un ensayo de CCDA. Como control de isotipo, en los experimentos se incluyó un anticuerpo IgG1 humano no específico.

Figura 14. Efecto del mAb 81.2 en el crecimiento *in vivo* de la línea celular de melanoma SK-MEL-5.

El mAb 81.2 se administró a 10 mg/kg de peso corporal por vía intraperitoneal dos veces a la semana. Se trató a los ratones control con volúmenes equivalentes de PBS. Cada grupo experimental contenía diez ratones. Los resultados se presentan como el volumen tumoral promedio (mm^3); las barras de error representan el Error Estándar de la Media (SEM).

EJEMPLO 1

La IL1RAP es un biomarcador de superficie celular para células madre de leucemia mieloide crónica

Sumario

Las estrategias terapéuticas para la leucemia mieloide crónica (LMC) con el objetivo de lograr una cura permanente del trastorno, requerirán una erradicación completa de las células madre de LMC. Las células madre de LMC, que comparten la capacidad de autorrenovarse con las células madre hematopoyéticas (CMH) normales, representan una pequeña población de células leucémicas que hasta ahora han sido indistinguibles de las normales (CMH) utilizando marcadores de superficie celular. Una estrategia para apuntar a las células madre de LMC sería identificar un biomarcador para las células madre de LMC, al que pudieran dirigirse los anticuerpos terapéuticos futuros. En este estudio, los inventores identificaron que la IL1RAP estaba habitualmente regulada por incremento tanto en células de LMC CD34 + primitivas y como resultado de la expresión de P210 BCR/ABL1 ectópica utilizando análisis de expresión génica global. Los inventores mostraron además que la expresión de IL1RAP divide la población rara de células $CD34^+CD38^-$, que alojan células tanto de LMC como de CMH normales, en dos fracciones; una con una expresión baja/ausente, y la otra con expresión mayor de IL1RAP. Después de establecer un protocolo que permitiera la detección de BCR/ABL1 mediante FISH en pequeños números de células clasificadas, los inventores observaron que dentro de las células de LMC $CD34^+CD38^-$; las células de $IL1RAP^+$ fueron BCR/ABL1+, mientras que las células de $IL1RAP^-$ fueron casi exclusivamente BCR/ABL1-. Realizando además ensayos de célula de inicio de cultivo a largo plazo (LTC-IC) en las dos poblaciones de células, los inventores encontraron que las células madre de LMC y CMH normal podrían separarse de forma prospectiva. Por tanto, en este estudio se identifica a la IL1RAP como el primer biomarcador de la superficie celular que distingue células madre de LMC de CMH normales y abre nuevos caminos para las estrategias terapéuticas y de diagnóstico en la LMC así como en trastornos relacionados tales como leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia linfoblástica aguda (LLA), trastornos mieloproliferativos (TMP) y síndrome mielodisplásico (SMD).

Introducción

Para identificar un biomarcador de superficie celular para células madre de LMC, los inventores realizaron análisis de expresión génica global e identificaron la proteína accesoria del receptor de interleucina 1 (IL1RAP) como el principal candidato, estando regulada por incremento tanto en las células de pacientes con LMC primitivas y como resultado de la expresión de P210 BCR/ABL1 ectópica. Con el desarrollo de un ensayo para detectar BCR/ABL1 en números bajos de células clasificadas, los inventores mostraron que la expresión de IL1RAP permite la separación prospectiva de las células leucémicas primitivas y las células normales. A través de ensayos de célula de inicio de cultivo a largo plazo, los inventores mostraron además que la IL1RAP es un biomarcador de la superficie celular para células madre de LMC, lo que permite por primera vez la separación prospectiva de las células madre de LMC de las CMH normales.

Materiales y métodos

Recolección de células de pacientes con LMC

Aislamiento y transducción de células sanguíneas de cordón $CD34^+$

Las muestras de sangre y, ocasionalmente de médula ósea, de pacientes con LMC se obtuvieron en el momento del diagnóstico antes de iniciar el tratamiento después del consentimiento informado según un protocolo aprobado por la Consejo de ética local. Las muestras fueron recibidas tanto del Departamento de Hematología en el Hospital de la Universidad de Lund, Suecia y de Rigshospitalet, Copenhague, Dinamarca. Las células mononucleares (CMN) se separaron utilizando Lymphoprep™ (Axis-Shield PoC AS, Oslo, Noruega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y las células $CD34^+$ se enriquecieron utilizando el kit de aislamiento de células $CD34^+$ (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Alemania) como se ha descrito anteriormente[22], en una base regular, produciendo así una

pureza de células $CD34^+$ superior a 95 %. Una subfracción de células mononucleares se almacenó viablemente en nitrógeno líquido antes de iniciar la tinción de anticuerpo. Las células $CD34^+$ se dividieron en dos fracciones; una fracción se lavó con PBS y se resuspendió en Trizol y se congeló a -80 ºC, mientras que la otra fracción fue congelada en nitrógeno líquido. Como muestras de referencia, se obtuvieron muestras de médula ósea de voluntarios sanos después de consentimiento informado en el Hospital de la Universidad de Lund, seguido de aislamiento de las células CD34 como se ha descrito anteriormente.

Análisis en micromatriz

El análisis en micromatriz se realizó utilizando cortes de oligonucleótido del Swegene DNA Microarray Resource en la Universidad de Lund, Suecia. Se realizaron hibridaciones utilizando el kit Pronto Universal Hybridization (Corning Inc, Corning, NY). El aislamiento del ARN y el análisis de micromatriz se realizaron esencialmente como se ha descrito anteriormente[23]. La visualización de datos se realizó utilizando el software Qlucore Omics Explorer 2.0 (Qlucore, Lund, Suecia).

Análisis por citometría de flujo

Los análisis de citometría de flujo se realizaron en un FACS Canto y la clasificación de las células por citometría de flujo se realizó en un FACS Aria (ambos de BD). Antes de la tinción celular, las células $CD34^+$ se descongelaron de acuerdo con procedimientos estándar y se lavaron una vez en PBS con 2 % de FCS (medio de lavado). Se usó el anticuerpo policlonal frente a IL1RAP anti-humano de cabra marcado con biotina (lote 667, R&D Systems, Abingdon, Reino Unido) a una dilución de 1:100 para la tinción de células durante 30 minutos en hielo. Después, se lavaron las células y se utilizó estreptavidina conjugada con PE a una dilución de 1:200 durante 30 minutos. Los anticuerpos monoclonales anti-CD34 conjugados con APC y anti-CD38 conjugados con FITC se usaron para cotinción (excepto IL1RAP, todos los anticuerpos usados se adquirieron en Beckton-Dickinson Immunocytometry Systems, Mountain View, CA). Antes de la clasificación celular, las células se lavaron dos veces para evitar una unión inespecífica de la estreptavidina conjugada con PE. Se utilizaron anticuerpos control de isotipo equivalente como controles negativos.

Clasificación celular y FISH de interfaz

Los portaobjetos de vidrio se trataron con poli-L-lisina al 0,01 % (Sigma-Aldrich, Estocolmo, Suecia) durante dos horas mientras se mantenían en una cámara de humedad, se lavaron una vez con agua, y se secaron en una placa caliente a 37 °C hasta que estuvieran secos. Después se usó un bolígrafo hidrófobo (Daido Sangyo Co., Ltd. Tokio, Japón) para dibujar círculos con una placa de cultivo de tejido de 96 pocillos como molde. Antes de la clasificación celular, pero después de por lo menos dos horas de secado a temperatura ambiente, se aplicaron 25 µl de PBS a los anillos para formar gotas. Durante la clasificación de las células, se clasificaron de 30 a 3.000 células simultáneamente directamente en dos gotas. Para permitir la fijación de las células a la superficie y para evitar el secado de las gotas, los portaobjetos se mantuvieron en una cámara húmeda en hielo durante 30 minutos antes de fijar las células en metanol: ácido acético (3:1) durante 10 min. Posteriormente, los portaobjetos se incubaron en un horno a 70 ºC durante la noche, seguido por FISH. Se utilizaron sondas de doble color para BCR/ABL1 (Abbot, Wiesbaden, Alemania).

Células de inicio de cultivo a largo plazo (LTC-IC)

Las células de estroma $M_2 10B_4$ se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con FCS al 10 % como se describió anteriormente[24,25]. Dos días antes de la clasificación celular, las células de estroma se sembraron en pocillos de una placa de 96 pocillos a una densidad de 50.000 células por ml en 200 µl de medio Myelocult (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canadá) con hidrocortisona 10^{-6} M (Sigma-Aldrich, Estocolmo, Suecia). Veinticuatro horas antes de la clasificación celular, las células de estroma se irradiaron con 1000 Rad. Durante la clasificación celular, 100-500 células se clasificaron directamente en los pocillos previamente revestidos con estroma por duplicado y 100 µl de medio se intercambió 3 horas más tarde. Una vez a la semana, se repitió el intercambio de 100 µl de medio de cultivo. Después de 5-6 semanas, las células se lavaron y sembraron en placas en medio de metilcelulosa (MethoCult H44435; Stem Cell Technologies) en una placa de 24 pocillos. Dos semanas más tarde, se puntuó el número de colonias. Las colonias de pocillos individuales se combinaron, se lavaron, se aplicaron gotas de PBS en portaobjetos, y seguido de análisis de FISH como se ha descrito anteriormente.

Expresión de P210 BCR/ABL1 en células sanguíneas de cordón $CD34^+$

Las muestras de sangre del cordón umbilical se recolectaron de partos normales después de obtener consentimiento informado según un protocolo aprobado por el Consejo de ética local. Las células $CD34^+$ se enriquecieron como se ha descrito previamente [22], produciendo una pureza de $CD34^+$ células superior a 95 %. Se utilizaron los vectores virales de MSCV-IRES-GFP (MIG) de pseudotipo RD114 y MIG-P210 en este estudio[23]. Las células $CD34^+$ se cultivaron y transdujeron en medio SFMM (Stem Cell Technology, Vancouver, Canadá) suplementado con trombopoyetina (TPO; 50 ng/ml), factor de células madre (SCF; 100 ng/ml), y ligando Flt-3 (FL; 100 ng/ml) como se ha descrito anteriormente[23].

Resultados y discusión

El análisis de expresión génica global identifica que la IL1RAP está regulada por aumento en las células $CD34^+$ *de LMC*

Se han realizado muchos esfuerzos en investigaciones dirigidas a identificar un biomarcador de superficie celular para células madre LMC Ph^+ (revisado por C Eaves14). Las células leucémicas y normales pueden identificarse más fácilmente de forma retrospectiva en LMC después de la detección del gen de fusión BCR/ABL1 específico de leucemia por FISH, convirtiéndolo en un trastorno ideal para evaluar intentos para separar prospectivamente células leucémicas y normales. Sin embargo, hasta ahora, no se ha identificado ningún marcador de superficie celular que permita la separación prospectiva de las células madre de LMC de las CMH normales. Los análisis de expresión global de genes han demostrado ser una estrategia poderosa en la búsqueda de nuevos marcadores de CMH tales como los receptores SLAM que distinguen las células hematopoyéticas y las progenitoras[15]. Para buscar genes regulados por aumento que codifican biomarcadores de superficie celular candidatos para células madre de LMC, se compararon los perfiles transcripcionales de las células de $CD34^+$ de muestras de 11 pacientes con LMC y 5 muestras de médula ósea (mo) normales. Los genes regulados por aumento identificados en la LMC fueron igualados a la categoría de Intología de Genes (GO) “integral a la membrana de plasma” que ha sido curada manualmente para incluir todas las moléculas de CD conocidas (véase Materiales y Métodos para detalles). En total, 13 genes regulados por aumento en células de LMC $CD34^+$ igualaron a la categoría de gen de membrana de plasma integral (datos no mostrados). Para ligar más los genes regulados por aumento más directamente con la expresión de P210 BCR/ABL1, los inventores generaron en paralelo una lista de genes regulados por aumento como resultado de la expresión de P210 BCR/ABL1 en células $CD34^+$ sanguíneas de cordón. Este análisis tuvo como resultado 23 genes regulados por aumento que igualan la misma lista de genes de categoría GO (datos no mostrados). De manera interesante, sólo un gen, la proteína accesoria del receptor de interleucina 1 (IL1RAP), mostró una fuerte regulación por aumento tanto en células $CD34^+$ de LMC como en células $CD34^+$ sanguíneas de cordón a consecuencia de la expresión de P210 BCR/ABL1. Los hallazgos de que la IL1RAP estuvo presente en ambas listas de genes sugieren que su regulación por aumento en células LMC primitivas está asociada cercanamente a la expresión de P210 BCR/ABL1 e indica que la IL1RAP es un antígeno novedoso asociado a la leucemia en células de LMC primitivas.

La IL1RAP está regulada por aumento en las células $CD34^+CD38^-$ *de pacientes con LMC y se induce a consecuencia de la expresión de P210 BCR/ABL1 ectópico*

La IL1RAP es un miembro de la superfamilia de receptor del tipo Toll y es un correceptor bien conocido del receptor de interleucina 1 del tipo 1 (IL-1R1)[16]. Por tanto, la IL1RAP es crucial en la mediación del efecto de la citocina IL-1 proinflamatoria, pero también está involucrada en la mediación de la señal de IL-33, una citocina que activa los linfocitos T y los mastocitos a través de la unión a su receptor ST2, que posteriormente se dimeriza con la IL1RAP17. La activación de la IL-1R1 ha demostrado anteriormente que estimula el crecimiento de colonias de las células de LMC sensibles a interferón18, sin embargo, la IL1RAP según el conocimiento de los inventores no se ha relacionado directamente con la LMC.

Ya que P210 *BCR/ABL1* está presente en las células de LMC como una marca de la enfermedad, idealmente, un biomarcador de superficie celular confiable en LMC, debe estar asociado directamente a la presencia y expresión de P210 BCR/ABL1. De acuerdo con los datos de la micromatriz, la expresión de IL1RAP estaba, de hecho, regulada por aumento en la superficie celular en las células de CB $CD34^+$ siguiendo la expresión de P210 BCR/ABL1 retroviral (Figura 1). Esto sugiere que el P210 BCR/ABL1 regula la expresión de IL1RAP, ya sea directamente o por un efecto indirecto, reforzando su candidatura como un biomarcador de LMC.

A continuación, los inventores investigaron la expresión de IL1RAP en la superficie celular de las células de LMC $CD34^+CD38^+$, que representa la mayoría de las células $CD34^+$ y las más maduras. En esta población de células, se observó una regulación por aumento de la IL1RAP en comparación a la expresión en correspondientes células normales de bm (Figuras 2A, 2B). Las células $CD34^+CD38^+$ normales mostraron una menor expresión de IL1RAP que se superpuso parcialmente con la expresión en las células LMC. Después, los inventores cambiaron al compartimiento de las células $CD34^+CD38^-$ de células normales, que contenían las CMH. De acuerdo con un estudio anterior, esta población mostró una expresión de IL1RAP baja/ausente (Figura 2C)[19]. Marcadamente, las células $CD34^+CD38^-$ de pacientes con LMC, que albergan tanto las células madre de Ph^+ LMC como las CMH normales fueron divididas en dos poblaciones, una teniendo una expresión de IL1RAP baja/ausente, la otra teniendo mayor expresión de IL1RAP (Figura 2C). En la sangre periférica (PB) de cinco pacientes con LMC, la fracción de células positivas a IL1RAP constituyó entre 75 % y 95 % de las células $CD34^+CD38^-$ (n = 5). Basado en estas conclusiones, los inventores especularon que la expresión de IL1RAP quizás distinga las células normales y leucémicas dentro del compartimento de células $CD34^+CD38^-$ en LMC. Ya que todas las células madre de LMC y CMH normales se encuentran exclusivamente dentro de las células $CD34^+CD38$, tal separación entre las células normales y leucémicas, permitiría una separación prospectiva de células madre de LMC de las CMH normales.

El flujo-gota-FISH muestra que la expresión de IL1RAP separa las células normales y leucémicas dentro de las

células LMC $CD34^+CD38^-$

Para analizar si la expresión de IL1RAP distingue las células normales (Ph^-) y las leucémicas (Ph^+) dentro del compartimiento de células de LMC $CD34^+CD38^-$, establecimos un nuevo protocolo para hacer la hibridación fluorescente in situ (FISH) en números pequeños de células clasificadas (véase Material y Métodos). Los primeros pasos en este protocolo se basan en parte en un método de clasificación celular en gotas en portaobjetos, seguido de inmunotinción de célula única[20]. Aplicando este nuevo protocolo que implica la clasificación celular directamente en gotas en portaobjetos seguido de FISH, en lo anterior referido como Flujo-gota-FISH, los inventores clasificaron tan solo 30 células en una gota, de las cuales, 15 núcleos se clasificaron con éxito mediante FISH (LMC-5, Figura 3). De manera interesante, encontramos por Flujo-gota-FISH que las células LMC $CD34^+CD38^-IL1RAP^+$ fueron *BCR/ABL1*$^+$, mientras que las células LMC $CD34^+CD38^-IL1RAP^-$ fueron casi exclusivamente Ph^- (n = 5, Figura 3). Estos datos muestran que la expresión de IL1RAP separa las células leucémicas y normales dentro del compartimiento de células LMC $CD34^+CD38^-$, indicando que las células madre de LMC y las CMH normales se pueden separar prospectivamente.

Las células madre de LMC son $CD34^+CD38^-IL1RAP^+$ *mientras las CMH normales son* $CD34^+CD38^-IL1RAP^{-/low}$

Los estudios en células madre de LMC de fase crónica se han basado hasta ahora en el acceso a pacientes con LMC raro en los que el compartimiento de células madre ha sido dominado por las células leucémicas después de ensayos a largo plazo[14]. Ya que las células madre de LMC muestran generalmente un mal injerto en ratones inmunodeficientes, el ensayo de célula de inicio de cultivo a largo plazo (LTC-IC) se usa extensamente como un ensayo sustituto para la detección de células madre candidatas a LMC. Para probar si LMC $CD34^+CD38^-IL1RAP^+$ y $CD34^+CD38^-IL1RAP^-$/low contienen únicamente células madre de LMC y CMH normales, respectivamente, se probaron las dos poblaciones celulares en el ensayo de LTC-IC. Para las células de médula ósea $CD34^+$ de controles normales, las células formadoras de colonia de cultivo a largo plazo (LTC-CFC) fueron encontradas en una frecuencia >100 veces mayor entre las células $CD34^+CD38^-IL1RAP^-$ en comparación con las células $CD34^+CD38^-IL1RAP^+$ (Figura 4A, n= 2), indicando que $CD34^+CD38^-IL1RAP^-$ normales están jerárquicamente arriba de las células $CD34^+CD38^-IL1RAP^+$. En LMC, observamos un promedio de 3.6 veces mayor frecuencia de LTC-CFC dentro de las células $CD34^+CD38^-IL1RAP^-$ en comparación con las células $CD34^+CD38^-IL1RAP^+$ (n= 5, Figura 4A), sugiriendo que las células LMC $CD34^+CD38^-IL1RAP^-$ están más enriquecidas para las células primitivas. De manera importante, aunque se encontró un número mayor de LTC-IC entre las células $CD34^+CD38^-IL1RAP^-$ que dentro de las células $CD34^+CD38^-IL1RAP^+$ tanto de muestras de pacientes con LMC como de los controles normales, el FISH en las colonias de LMC LTC reveló una discriminación casi completa entre las células Ph^- y Ph^+ en los dos grupos (Figura 4B). Las colonias de LMC LTC derivadas de células $CD34^+CD38^-IL1RAP^-$ fueron casi exclusivamente Ph-, mientras las $CD34^+CD38^-IL1RAP^+$ fueron casi exclusivamente Ph^+. Estos datos sugieren que la IL1RAP es un biomarcador de superficie celular novedoso que puede ser utilizado para separar células madre de LMC de CMH normales.

En el presente documento, los inventores identificaron mediante el análisis de expresión global de genes un antígeno novedoso de superficie celular, IL1RAP, que después de la exposición en ensayos múltiples cumplió con los criterios de ser un biomarcador de superficie celular novedoso para células madre Ph^+ LMC. Basado en este descubrimiento, las terapias dirigidas futuras en LMC podrían ser diseñadas para apuntar a las células madre de LMC mientras al mismo tiempo se preservan las CMH normales utilizando un anticuerpo terapéutico dirigido hacia la IL1RAP. Además, un cóctel de anticuerpos que contiene anticuerpos anti-CD34, anti-CD38 y anti-IL1RAP puede usarse para propósitos de diagnóstico y para estudios de seguimiento de pacientes con LMC bajo tratamientos diferentes. De manera importante, una separación prospectiva de células normales y de células madre de LMC permitirá futuros estudios mecanicistas de estas dos poblaciones de células. Además, los inventores mostraron también en el presente documento que el Flujo-gota-FISH podría servir como un método útil para caracterizar aberraciones genéticas en pequeños números de células clasificadas, tales como células madre leucémicas, un tipo célula que se ha purificado hasta poblaciones de células cada vez más pequeñas y puras[21]. Para futuros estudios, este método podría por ejemplo permitir la detección de aberraciones genéticas en varias pequeñas poblaciones de células madre leucémicas y células progenitoras, hallazgos que probablemente darán nuevas ideas acerca de los órdenes que han adquirido varias aberraciones, conocimiento clave para comprender la leuquimiogénesis. Además, el Flujo-gota-FISH podría ser utilizado para vigilar los efectos terapéuticos en las células madre leucémicas durante el tratamiento. De manera importante, en el presente documento, los inventores identificaron utilizando el Flujo-gota-FISH que la IL1RAP es el primer biomarcador de superficie celular que distingue las células madre de LMC de las CMH normales, un hallazgo que abre nuevas oportunidades terapéuticas para la LMC y otros trastornos hematológicos neoplásicos asociados a la regulación por aumento de IL1RAP en células madre y/o células progenitoras.

Referencias:

1. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. Blood. 2000;96:3343-3356.
2. Fialkow PJ, Denman AM, Jacobson RJ, Lowenthal MN. Chronic myelocytic leukemia. Origin of some lymphocytes from leukemic stem cells. J Clin Invest. 1978;62:815-823.
3. Kavalerchik E, Goff D, Jamieson CH. Chronic myeloid leukemia stem cells. J Clin Oncol. 2008;26:2911-2915.

4. Jiang X, Zhao Y, Smith C, et al. Chronic myeloid leukemia stem cells possess multiple unique features of resistance to BCR-ABL targeted therapies. Leukemia. 2007;21:926-935.
5. Copland M, Hamilton A, Brick LJ, et al. Dasatinib (BMS-354825) targets an earlier progenitor population than imatinib in primary CML but does not eliminate the quiescent fraction. Blood. 2006;107:4532-4539.
6. Jin L, Hope KJ, Thai Q, Smadja-Joffe F, Dick JE. Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. Nat Med. 2006;12:1167-1174.
7. Tavor S, Petit I, Porozov S, et al. CXCR4 regulates migration and development of human acute myelogenous leukemia stem cells in transplanted NOD/SCID mice. Cancer Res. 2004;64:2817-2824.
8. Jin L, Lee EM, Ramshaw HS, et al. Monoclonal antibody-mediated targeting of CD123, IL-3 receptor alpha chain, eliminates human acute myeloid leukemic stem cells. Cell Stem Cell. 2009;5:31-42.
9. Majeti R, Chao MP, Alizadeh AA, et al. CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. Cell. 2009;138:286-299.
10. Hosen N, et al. CD96 is a leukemic stem cell-specific marker in human acute myeloid leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104:11008-11013.
11. van Rhenen A, van Dongen GA, Kelder A, et al. The novel AML stem cell associated antigen CLL-1 aids in discrimination between normal and leukemic stem cells. Blood. 2007; 110:2659-2666.
12. Eisterer W, Jiang X, Christ O, et al. Different subsets of primary chronic myeloid leukemia stem cells engraft immunodeficient mice and produce a model of the human disease. Leukemia. 2005;19:435-441.
13. Bhatia M, Wang JC, Kapp U, Bonnet D, Dick JE. Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94:5320-5325.
14. Jiang X, Zhao Y, Forrest D, Smith C, Eaves A, Eaves C. Stem cell biomarkers in chronic myeloid leukemia. Dis Markers. 2008;24:201-216.
15. Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. Cell. 2005;121:1109-1121.
16. Subramaniam S, Stansberg C, Cunningham C. The interleukin 1 receptor family. Dev Comp Immunol. 2004;28:415-428.
17. AH S, Huber M, Kollewe C, Bischoff SC, Falk W, Martin MU. IL-1 receptor accessory protein is essential for IL-33-induced activation of T lymphocytes and mast cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007; 104: 18660- 18665.
18. Estrov Z, et al. Suppression of chronic myelogenous leukemia colony growth by interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist and soluble IL-1 receptors: a novel application for inhibitors of IL-1 activity Blood. 1991;78:1476-1484.
19. Hystad ME, Myklebust JH, Bo TH, et al. Characterization of early stages of human B cell development by gene expression profiling. J Immunol. 2007;179:3662-3671.
20. Ema H, Morita Y, Yamazaki S, et al. Adult mouse hematopoietic stem cells: purification and single-cell assays. Nat Protoc. 2006;1:2979-2987.
21. Dick JE. Stem cell concepts renew cancer research. Blood. 2008; 112:4793-4807.
22. Nilsson M, Karlsson S, Fan X. Functionally distinct subpopulations of cord blood $CD34^+$ cells are transduced by adenoviral vectors with serotype 5 or 35 tropism. Mol Ther. 2004;9:377-388.
23. Jaras M, Johnels P, Agerstam H, et al. Expression of P190 and P210 BCR/ABL1 in normal human CD34(+) cells induces similar gene expression profiles and results in a STAT5-dependent expansion of the erythroid lineage. Exp Hematol. 2009;37:367-375.
24. Hogge DE, et al. Enhanced detection, maintenance, and differentiation of primitive human hematopoietic cells in cultures containing murine fibroblasts engineered to produce human steel factor, interleukin-3, and granulocyte colony- stimulating factor. Blood. 1996;88:3765-3773.
25. Castor A, Nilsson L, Astrand-Grundstrom I, et al. Distinct patterns of hematopoietic stem cell involvement in acute lymphoblastic leukemia. Nat Med. 2005;11:630-637.

EJEMPLO 2

Dirigir los anticuerpos de IL1RAP a células madre leucémicas y células progenitoras causa citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (CCDA)

Sumario

Las estrategias terapéuticas para leucemias dirigidas a lograr una cura permanente requerirán una erradicación completa de las células madre leucémicas. Las células madre leucémica, representan una pequeña población de células leucémicas, hasta ahora han sido indistinguibles de las células madre hematopoyéticas (CMH) normales utilizando marcadores de superficie celular. Un nuevo concepto para apuntar a las células madre leucémicas sería identificar un biomarcador de superficie celular para células madre leucémicas, a que los que podrían dirigirse futuros anticuerpos terapéuticos (véase el Ejemplo 1).

En este estudio, los inventores generaron un anticuerpo anti-IL1RAP y proporcionaron prueba de concepto de que los anticuerpos anti-IL1RAP dirigidos a las células madre de la leucemia mieloide crónica (LMC), a las células madre de la leucemia mieloide aguda (LMA), a las células madre de la leucemia linfoblástica aguda (LLA) pueden usarse para inducir citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (CCDA), mientras que ningún efecto citotóxico fue observado en las CMH normales. Además, de los inventores mostraron una CCDA dirigida de IL1RAP dependiente de la dosis en las líneas celulares positivas de IL1RAP de KU812 (LMC), MONO-MAC-6 (leucemia

mieloide aguda; LMA) y REH (línea celular linfoblástica aguda; LLA). Los inventores también mostraron que las células madre de SMP y TMP han aumentado la expresión de IL1RAP, indicativo de que los futuros anticuerpos de direccionamiento a anti-IL1RAP terapéuticos serán efectivos también en estos trastornos.

Este estudio así abre una oportunidad terapéutica novedosa en LMC, en LMA, en LLA, en SMP, y en TMP por direccionamiento de anticuerpos de IL1RAP en células madre leucémicas.

Materiales y métodos

Generación de KMT-1; un anticuerpo policlonal de conejo anti- humano frente a IL1RAP

Se inmunizó a los conejos con el dominio extracelular de IL1RAP. El suero de conejos se purificó según procedimientos estándar, excepto que se añadió una etapa adicional, en la que los anticuerpos que se unen al dominio de inmunoglobulina, presentes en la proteína inmunizante para aumentar la semivida, se desechó mediante la unión a columnas cargadas de inmunoglobulina. En los ELISA se confirmó que los anticuerpos purificados se unían al dominio extracelular de IL1RAP y que no había anticuerpos que se unieran al dominio de inmunoglobulina humana. Cuando se usó en citometría de flujo, se utilizó un anticuerpo IgG de cabra anti-conejo conjugado con PE como reactivo secundario.

Ensayo de CCDA

El ensayo de CCDA se basó en un protocolo descrito anteriormente[1]. Brevemente, las células diana se marcaron con PKH26 (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y las células se introdujeron directamente dentro de los pocillos de una placa de 96 pocillos, o se sembraron dentro de los pocillos después de la clasificación de las células $CD34^+CD38^-$. Las líneas celulares KU812 y KG-1 y las células $CD34^+$ primarias se sembraron a 10.000 células por pocillo, mientras las células $CD34^+CD38^-$ primarias se sembraron a 2.000-3.000 células por pocillo. Posteriormente, los anticuerpos se añadieron a los pocillos a diferentes concentraciones y se incubaron durante 20 min antes de añadir 100.000 células efectoras NK a cada pocillo. Las células NK se extrajeron de voluntarios sanos después de obtener el consentimiento informado utilizando un kit de aislamiento de células negativo a células NK de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germana). Los anticuerpos IgG de conejo purificados de un conejo no inmunizado se usaron como anticuerpos de control en los experimentos (R&D Systems Abingdon, RU). Las células positivas a 7-AAD para detección de la muerte celular se midieron utilizando un citómetro de flujo FACS CANTO (BD). El promedio y la desviación estándar de la muerte celular inducida por anticuerpos se calcularon según la ecuación siguiente: (Porcentaje de células 7-AAD+ a la concentración definida de anticuerpo - Porcentaje de células 7-AAD+ sin anticuerpo) / (0.01 x Porcentaje de células 7-AAD- sin anticuerpo) de por lo menos tres experimentos independientes (excepto la Figura 9; solo un experimento).

Las muestras de once pacientes con LMA y dos pacientes con LLA Ph^+ se recibieron del hospital de la Universidad de Lund y la expresión de IL1RAP se analizó en las poblaciones de células $CD34^+CD38^+$ y $CD34^+CD38^-$ utilizando los mismos ajustes que para el análisis de células de LMC. La línea celular de LMA MONO-MAC-6 y la línea celular de LLA REH también se analizaron en los ensayos de CCDA utilizando el mismo ajuste que para las líneas celulares KG-1 y KU812.

Resultados

Dirigir anticuerpos de IL1RAP en células madre de LMC y células progenitoras pero también en una línea celular de LMC dirige las células NK a CCDA

La citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (CCDA) es un mecanismo conservado del sistema inmunológico innato, por el que se cree que varios anticuerpos terapéuticos, tales como Rituximab dirigidos contra CD20, ejercen por lo menos parcialmente su efecto terapéutico[2]. Para probar si la CCDA podría lograrse utilizando IL1RAP como diana, los inventores generaron un anticuerpo policlonal de conejo anti- IL1RAP humano, de ahora en adelante denominado KMT-1, ya que el dominio Fc de anticuerpos de conejo en contraste con los anticuerpos de cabra es reconocido por las células del sistema inmunológico humano.

Como se esperaba, se observaron niveles bajos de CCDA en la línea celular de leucemia negativa/baja para IL1RAP KG-1, aún a altas concentraciones de KMT-1 (Figura 5A, B). Por el contrario, en la línea celular de LMC KU812 que expresa IL1RAP, se observó CCDA mediada por células citopáticas naturales (NK) en presencia de KMT-1 (Figura 5A, B), lo que demuestra que KMT-1 tiene el potencial de inducir CCDA reclutando células inmunes citotóxicas para las células diana $IL1RAP^+$.

En células primarias de pacientes con LMC y de controles normales, KMT-1 mostró un patrón de tinción ligeramente más débil, pero similar al del anticuerpo policlonal anteriormente usado de cabra anti-IL1RAP humano (Ejemplo 1, Fig. 6A). Las células inmaduras de LMC-1, LMC-3 y LMC-4 (no quedaba ninguna célula de LMC-2 y LMC-5) se analizaron en ensayos de CCDA en paralelo a las células de muestras sanas control. En las células de LMC $CD34^+$,

la unión de KMT-1 dio lugar a una CCDA de mayores niveles que las células de control $CD34^+$ normales, correlacionando al nivel de expresión de IL1RAP, en particular a menores concentraciones de anticuerpo (Figura 6B). De manera más marcada, entre las células $CD34^+CD38^-$ enriquecidas de células madre, KMT-1 no indujo CCDA de células $CD34^+CD38^-$ normales, mientras que se observó un claro efecto de CCDA dependiente de la dosis en células LMC $CD34^+CD38^-$(Figura 6B), de nuevo mostrando una fuerte correlación con el patrón de expresión de IL1RAP en estos tipos de células.

Los anticuerpos dirigidos a IL1RAP en células de LMA y LLA dirigen las células NK a CCDA

Se observó expresión de IL1RAP en células de LMA $CD34^+CD38^-$ en 9 de 11 muestras analizadas (Figura 7A). En la población de células $CD34^+CD38^+$, se observó un patrón de expresión de IL1RAP similar (Figura 7A). Además, la IL1RAP se expresó en la línea celular de LMA MONO-MAC-6 y la línea celular de LLA REH (Figura 7B). La expresión IL1RAP también se observó en las células LLA $CD34^+CD38^-$ pH^+ en 2 de 2 muestras probadas (Figura 7C). Utilizando IL1RAP como objetivo, las líneas celulares de MONOMAC-6 y de REH también se analizaron en ensayos de CCDA. En ambas líneas celulares, se observó un efecto de direccionamiento a CCDA de la IL1RAP dependiente de la dosis (Figura 8), lo que demuestra que los anticuerpos anti-IL1RAP terapéuticos tienen una aplicación más amplia que solo para la LMC.

Los inventores también realizaron experimentos de CCDA en células primarias de LMA y LLA $CD34^+CD38^-$ y demostraron prueba de principio de que también en estos trastornos puede lograrse un aumento en la muerte celular utilizando KMT-1 (Figura 9).

Además, las células $CD34^+CD38^-$ de un paciente con SMP que progresó a LMA y dos pacientes con TMP (uno de ellos con mutación+ JAK2) se tiñeron con un anticuerpo dirigido a IL1RAP. Se observó un aumento en la expresión de IL1RAP con respecto a células normales de médula ósea $CD34^+CD38^-$ (Figura 10, Figura 2C).

Discusión

En el presente estudio, los inventores han identificado la IL1RAP como el primer biomarcador de superficie celular que distingue células madre de LMC candidatas de las CMH normales y utilizado este conocimiento para inducir muerte celular dependiente de anticuerpos de células madre de LMC. Además, los inventores identificaron que la IL1RAP está regulada por aumento en células madre de LMA, células madre de LLA, células madre de TMP y células madre de SMD y de los inventores mostraron que tanto las células madre de LMA y LLA pueden ser eliminados utilizando un anticuerpo de direccionamiento de IL1RAP, mientras que las células madre normales no fueron afectados. Basado en el hallazgo de que las células madre de LMC, LLA y LMA pueden ser eliminadas por anticuerpos redirigidos a la IL1RAP, se espera que también las células madre de TMP y SMD se eliminaran en el ensayo de CCDA. Estas conclusiones abren un nuevo concepto para tratamientos de pacientes con leucemia por direccionamiento directo de las células madre de leucemia, un concepto que es distinto de los inhibidores de tirosina cinasa actualmente utilizados, que de manera apuntan a células aguas abajo las células madre de LMC[3.4].

La razón por la cual las células madre de LMC son resistentes a fármacos tales como Glivec es parcialmente confusa, pero los factores que pueden contribuir son características tales como quietud y un nivel relativamente alto de expresión de BCR/ABL1, pero también la expresión combinada de proteínas específicas de transportadoras de membrana en estas células[3.5.6]. Dadas estas características de las células madre de LMC, es sumamente deseable encontrar enfoques novedosos de tratamiento para finalmente erradicar las células madre de LMC. Una terapia a base de anticuerpos apuntando directamente a las células madre de LMC serviría en tal estrategia ya que el modo de acción de los anticuerpos es independiente de los mecanismos de resistencia conocidos que causan que las células madre de LMC no respondan a los tratamientos inhibidores de cinasa. Las limitaciones principales para tales desarrollos han sido la falta completa de un receptor de superficie celular que distingue LMC+ Ph^+ de las células madre normales, sanos (Ph-). En el presente documento, los inventores identificaron a la IL1RAP como tal diana de los análisis de expresión global de genes y se ligó de manera importante su expresión a la expresión de BCR/ABL1 (véase el Ejemplo 1 anterior).

De manera Importante, por la generación de un anticuerpo dirigido a IL1RAP, en el presente documento, los inventores, por primera vez, proporcionaron prueba de concepto de que las células madre de LMC candidatos pueden ser apuntados mientras al mismo tiempo se preserva la CMH normal. De manera Importante, ya que el modo de acción de los anticuerpos en CCDA es dirigir células inmunológicas a la destrucción de las células diana, los mecanismos terapéuticos son independientes de los mecanismos conocidos que causan resistencia al inhibidor de tirosina cinasa en LMC utilizando tratamientos actuales. Entonces, el direccionamiento de anticuerpo de células madre de LMC tiene la capacidad de erradicar las células madre de LMC, ya sea solo o en combinación con los regímenes actuales, llevando finalmente a una cura permanente para pacientes de LMC.

De manera interesante, los inventores también observaron que los anticuerpos dirigidos a IL1RAP pueden causar CCDA de las células madre de LMA; el tipo más común de leucemia aguda entre adultos que tienen un pronóstico malo, y también las células madre de LLA; el tipo más común de leucemia infantil. En conjunto, el hallazgo de expresión de la IL1RAP en las células madre leucémicas que tienen un inmunofenotipo de $CD34^+CD38^-$ en LMC, en

LMA, LLA, SMD, y TMP, y los experimentos de CCDA que demuestran muerte celular de una manera dependiente de IL1RAP, indica que estos trastornos pueden tratarse con anticuerpos terapéuticos anti-IL1RAP.

En los experimentos de CCDA presentados en el presente documento se utilizó un anticuerpo policlonal anti-IL1RAP humano (que es en esencia una mezcla de varios anticuerpos monoclonales diferentes). Sin embargo, los expertos en la técnica apreciarán que también pueden identificarse anticuerpos monoclonales individuales dirigidos a IL1RAP que tengan potencial de CCDA.

Referencias

1. Wilkinson RW, Lee-MacAry AE, Davies D, Snary D, Ross EL. Antibodydependent cell-mediated cytotoxicity: a flow cytometry-based assay using fluorophores. J Immunol Methods. 2001;258:183-191.
2. Morris JC, Waldmann TA. Antibody-based therapy of leukaemia. Expert Rev Mol Med. 2009;11:e29.
3. Copland M, Hamilton A, Elrick LJ, et al. Dasatinib (BMS-354825) targets an earlier progenitor population than imatinib in primary LMC but does not eliminate the quiescent fraction. Blood. 2006;107:4532-4539.
4. Jorgensen HG, Allan EK, Jordanides NE, Mountford JC, Holyoake TL. Nilotinib exerts equipotent antiproliferative effects to imatinib and does not induce apoptosis in CD34* CML cells. Blood. 2007;109:4016-4019.
5. Graham SM, Jorgensen HG, Allan E, et al. Primitive, quiescent, Philadelphiapositive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. Blood. 2002;99:319-325.
6. Jiang X, Zhao Y, Smith C, et al. Chronic myeloid leukemia stem cells possess multiple unique features of resistance to BCR-ABL targeted therapies. Leukemia. 2007;21:926-935.

EJEMPLO 3 Expresión génica en tumores sólidos

Materiales y métodos

Utilizando el motor de búsqueda Oncomine (www.oncomine.org), los inventores identificaron todos los conjuntos de datos que contenían varias líneas celulares establecidas de diferentes tipos de tumor. El conjunto de datos más grande identificado fue el conjunto de datos "Wooster Cell Line2". Este conjunto de datos contiene 308 líneas celulares de cáncer, representando 20 tipos diferentes de tumor. El término de consulta utilizado fue "IL1RAP" con el parámetro indicador "205277_at".

Resultados

En total, los inventores identificaron 17 tipos diferentes de tumor sólido que estaban representados por líneas celulares que cumplen sus criterios para una expresión regulada por aumento de IL1RAP (véase la tabla 1). El porcentaje de líneas celulares dentro de cada tipo de tumor que muestra regulación por aumento de IL1RAP varió de 4 % (cáncer colorrectal) a 67 % (melanoma, cáncer de próstata). Entre los tipos de tumor, los inventores identificaron algunas de las entidades de cáncer más comunes en seres humanos, incluyendo neoplasias malignas de mama, colon, pulmón, próstata y vejiga. Además, algunos tipos de tumor asociados a resultados clínicos malos, tales como melanoma y tumores cerebrales mostraron una expresión altamente regulada por aumento de IL1RAP.

Conclusiones

Los inventores concluyeron que varias entidades tumorales diferentes muestran un nivel de expresión génica de IL1RAP regulada por aumento.

Estos datos indican que el tratamiento con anticuerpos dirigidos contra IL1RAP proporcionará una nueva vía terapéutica en varios tipos diferentes de cáncer humano.

Tabla 1

Regulación por aumento de IL1RAP en 308 líneas celulares cancerosas que representan diferentes tipos de tumores *	
Tipo de tumor	**Número de tumores que muestran regulación por aumento de IL1RAP****
Cáncer de vejiga	3/9 (33 %)
Cáncer de cerebro y del SNC	7/16 (44 %)
Cáncer de mama	4/19 (21 %)
Cáncer de cuello uterino	4/7 (57 %)
Cáncer colorrectal	1/23 (4 %)
Cáncer esofágico	3/4 (75 %)
Cáncer gástrico	1/5 (20 %)
Cáncer de cabeza y cuello	3/6 (50 %)
Cáncer de riñón	1/8 (12 %)
Cáncer de hígado	3/9 (33 %)

Cáncer de pulmón	14/73 (19 %)
Linfoma	2/38 (5 %)
Melanoma	8/12 (67 %)
Cáncer de ovario	2/5 (40 %)
Cáncer de páncreas	3/9 (33 %)
Cáncer de próstata	2/3 (67 %)
Sarcoma	5/13 (38 %)
*El conjunto de datos en 308 líneas de células cancerosas se buscó usando Oncomine (www.oncomine.org). El término de consulta utilizado fue "IL1RAP" con el parámetro indicador "205227_at. La plataforma usada fue Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays (Affymetrix Inc.) **Solo las líneas de células tumorales que muestran un nivel de expresión igual o mayor de IL1RAP que en la línea celular positiva para el cromosoma Filadelfia KU812 se puntuaron como "reguladas por incremento". Los inventores ya han demostrado que KU812 tiene una expresión proteica regulada por incremento de IL1RAP en la superficie celular (Järås *et al.,* 2010, *PNAS* **107**(14): 16280-5).	

EJEMPLO 4 - Análisis de la expresión de IL1RAP en líneas celulares humanas mediante citometría de flujo

Materiales y métodos

Reactivos

- Bloqueadores del receptor Fc de BD Biosciences
  - CD16 anti-humano (n.º de cat. 555404)
  - CD32 anti-humano (n.º de cat. 555447)
- Control de isotipo IgG1 k APC-ratón (n.º de cat. 555751) de BD Biosciences
- IL-1 RAcP/IL-1 R3-APC anti-humano (cat no FAB676A) de R&D system

Líneas celulares

Tabla 2

Línea celular	**Descripción**	**ATCC/DSMZ N.º de catálogo**
KG-1	Leucemia mieloide aguda humana (utilizada como control negativo)	ACC 14
KU-812	Leucemia mieloide crónica humana en crisis blástica mieloide (utilizada como control positivo)	ACC 378
NCI-H2228	Adenocarcinoma de pulmón	CRL-5935
NCI-H716	Cáncer de colon	CCL-251
HCC1954	Carcinoma ductal de mama	CRL-2338
SR	Linfoma	CRL-2262
OV-90	Adenocarcinoma de ovarios	CRL-11732
COLO 829	Melanoma maligno	CRL-1974
SH-4	Melanoma	CRL-7724
SW 1783	Astrocitoma	HTB-13

Las líneas celulares se cultivaron en condiciones estándar en el medio recomendado por los proveedores.

Análisis de FACS

Las células (350 000) se resuspendieron en 2 ml de tampón para FACS (PBS sin suplementación con calcio ni magnesio con 0,5 % de BSA), y se centrifugaron durante 4 minutos a 300 x g. El sobrenadante se desechó y los receptores de Fc se bloquearon incubando las células con mAb anti-CD16/CD32 a una concentración de 3 µg/ml en un volumen de 30 µl durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después se añadieron 55 µl de tampón para FACS y 4 µl de anticuerpo de isotipo marcado con APC o 5 µl de anticuerpo monoclonal marcado con APC dirigido contra IL1RAP humana a las células y se incubaron durante 30 minutos a +4 °C. Las células se lavaron con 3 ml de tampón para FACS, se centrifugaron durante 4 minutos a 300 x g y se desechó el sobrenadante. Por último, se resuspendieron las células en 200 µl de tampón para FACS y se realizó el análisis de citometría de flujo de acuerdo con los parámetros estándar en un citómetro de flujo FACS CantoII (BD Biosciences).

Resultados

Los niveles de expresión de IL1RAP en las líneas celulares de tumor sólido analizadas se muestran en la tabla 3 siguiente y en la Figura 11.

Tabla 3

Expresión de IL1RAP en diferentes líneas celulares humanas. Los valores representan la intensidad media de la fluorescencia.			
Línea celular	**Blanco**	**Isotipo**	**Anti-IL1RAP**
KG-1	46	52	113
KU-812	62	69	451
NCI-H2228	80	96	587
NCI-H716	60	96	2043
HCC1954	112	119	410
SR	51	54	2257
OV-90	78	89	1921
COLO 829	77	82	3732
SH-4	40	51	5189
SW 1783	119	153	341

Conclusiones

La expresión de IL1RAP fue observada en las líneas celulares de tumor sólido NCI-H2228, NCI-H716, HCC1954, SR, OV-90, COLO 829, SH-4 y SW 1783. La expresión en estas líneas celulares fue comparable o más alta que esa en la línea celular de leucemia mieloide crónica humana KU-812.

EJEMPLO 5 ***Dirigir los anticuerpos de IL1RAP a las células de tumor sólido causa citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (CCDA)***

Materiales y métodos

Desarrollo y producción del anticuerpo monoclonal quimérico 81.2 hIgG1.

Una línea celular de hibridoma murino que secretaba anticuerpos monoclonal específicos de la parte extracelular de IL1RAP humana se generó mediante procedimientos estándar. Brevemente, se inmunizó a ratones BALB/C con una proteína de fusión que consiste en la parte extracelular de IL1RAP y la parte de Fc de IgG1 humana (Pro100-Lys330). Los esplenocitos se fusionaron con la línea celular de mieloma de ratón Sp2/0 y los clones productores y los anticuerpos dirigidos contra la parte extracelular de IL1RAP se aislaron mediante detección selectiva con la proteína de fusión utilizada para las inmunizaciones y se sometieron a contraselección con IgG1 humana.

El anticuerpo producido por el clon de la línea celular de hibridoma 81.2 fue del tipo de IgG1/kappa y se encontró que tenía una especificidad alta por células positivas a IL1RAP y la proteína recombinante humana IL1RAP (21-367). De esta línea celular, se aisló el ARN total y el ADNc que representa las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, VH y VK, se amplificó mediante PCR, se clonó y se secuenció.

El elemento genético que codifica la VK murina en el marco con la parte constante de gen kapa humano se sintetizó y se clonó en un vector de expresión de mamífero plasmídico.

El fragmento de PCR que codifica para la VH murino se combinó con las partes constantes de IgG1 humana y se clonó en un vector de expresión de mamífero plasmídico.

Las células HEK 293 se cotransfectaron con ambos plásmidos y las células se cultivaron en medio sin suero suplementado con 100 ng/ml de kifunensina. El anticuerpo quimérico 81.2 hIgG1 se purificó del medio de cultivo mediante cromatografía de Proteína G.

Citometría de flujo

Se recogieron células de cuatro líneas celulares diferentes de cáncer sólido humano, H2228 (adenocarcinoma; cáncer de pulmón no microcítico), H716 (adenocarcinoma colorrectal), HCC1954 (carcinoma ductal de mama), y SH-4 (melanoma) y se tiñeron con mab81.2, un anticuerpo anti-IL1RAP humano (Cantargia AB, Lund, Suecia). Para la detección, las células se tiñeron con un anticuerpo IgG anti-humano secundario conjugado con PE (Thermo-Fisher, Waltham, MA), y las células se analizaron utilizando un citómetro de flujo FACS CANTO (BD Immunocyteometry Systems, Mountain View, CA).

Ensayo de CCDA

El ensayo de CCDA se basó en un protocolo descrito anteriormente (véase el Ejemplo 2 anterior). En breve, las células diana se marcaron con PKH26 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y se sembraron en una placa de 96 pocillos a una densidad de 10.000 células por pocillo. Después, se añadieron anticuerpos a los pocillos a concentraciones diferentes y se incubaron durante 30 minutos antes que añadir 100.000 células efectoras NK a cada pocillo. Las células NK se extrajeron de voluntarios sanos después de que dieran su

consentimiento informado utilizando un kit de aislamiento de células negativo para células NK de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Alemania). Un anticuerpo IgG1 humano no específico se usó como control en los experimentos (Eureka Therapeutics, Emeryville, CA).

El grado de muerte celular se evaluó mediante detección de las células positivas para 7 AAD utilizando un citómetro de flujo FACS CANTO (BD). El nivel de muerte celular inducida por anticuerpos se calculó según la ecuación siguiente: Porcentaje de células 7 AAD + a la concentración de anticuerpo definida - Porcentaje de células 7 AAD + sin anticuerpo.

Resultados

Un anticuerpo contra IL1RAP humano marca las células cancerosas no leucémicas humanas en la citometría de flujo, y dirige las células NK a CCDA, dando como resultado la muerte de las células cancerosas humanas

Los inventores han mostrado que KMT1, un anticuerpo policlonal contra la IL1RAP humana, puede dirigir las células NK a CCDA, e inducir la muerte celular de la línea celular KU812 de LMC de alta expresión de IL1RAP, pero no en las células KG1 de baja expresión de IL1RAP (véase el Ejemplo 2 anterior).

Los resultados del presente estudio muestran que no solo las células leucémicas son sensibles a la CCDA mediada por IL1RAP, sino también las células de cánceres humanos sólidos. Se estudiaron cuatro líneas celulares de cáncer humano diferentes, representando cuatro tipos diferentes de cáncer humanos sólido y todas mostraron expresión de IL1RAP en la superficie celular (Fig. 12).

También se demostró que las cuatro líneas celulares analizadas eran sensibles a la CCDA mediada por mab81.2, un anticuerpo contra la IL1RAP humana, en lo que parece ser una manera dependiente de la dosis (Fig. 13).

Conclusión

El presente estudio confirma que la IL1RAP se expresa en la superficie celular de varios tipos de cáncer humano, incluyendo cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de mama, y melanoma maligno.

Utilizando un anticuerpo dirigido contra la IL1RAP, se mostró que las células de las cuatro líneas celulares de tumor sólido eran una diana de la muerte mediada por NK específicas en un ensayo de CCDA.

EJEMPLO 6 ***Eficacia del anticuerpo monoclonal 81.2 in vivo en un modelo de xenoinjerto en ratón SK-MEL-5 de melanoma humano***

Materiales y métodos

Desarrollo y producción del anticuerpo monoclonal de ratón 81.2 de isotipo IgG1 e IgG2a.

Una línea celular de hibridoma murino que secretaba anticuerpos monoclonal específicos de la parte extracelular de la IL1RAP humana se generó mediante procedimientos estándar. Brevemente, se inmunizó a ratones BALB/C con una proteína de fusión que consiste en la parte extracelular de IL1RAP y la parte de Fc de IgG1 humana (Pro100-Lys330). Los esplenocitos se fusionaron con la línea celular de mieloma de ratón Sp2/0 y los clones productores y los anticuerpos dirigidos contra la parte extracelular de IL1RAP se aislaron mediante detección selectiva con la proteína de fusión utilizada para las inmunizaciones y se sometieron a contraselección con IgG1 humana.

El anticuerpo producido por el clon de la línea celular de hibridoma 81.2 fue del tipo de IgG1/kappa y se encontró que tenía una especificidad alta por las células positivas a IL1RAP y la proteína recombinante humana IL1RAP (21-367). De esta línea celular, se aisló el ARN total y el ADNc que representa las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, VH y VK, se amplificaron mediante PCR, se clonaron y se secuenciaron.

El elemento genético que codifica para la VK murina en marco con la parte constante del gen kapa murino se sintetizó y se clonó en un vector de expresión de mamífero plasmídico.

El fragmento de PCR que codifica la VH murina se combinó con las partes constantes de IgG2a murina y se clonó en un vector de expresión de mamífero plasmídico.

Las células HEK 293 se cotransfectaron con ambos plásmidos y las células se cultivaron en medio sin suero. El anticuerpo de ratón 81,2 de isotipo de IgG2a se purificó del medio de cultivo mediante cromatografía de Proteína G.

Citometría de flujo

Para confirmar la expresión de IL1RAP en la línea celular de melanoma maligno humano, SK-MEL-5, y comparar la expresión con la línea celular de LMC humano KU812, ambas líneas celulares se cultivaron según procedimientos

estándar y se mantuvieron en fase de crecimiento logarítmico. En la recogida celular se marcaron 3,5 – 5,0 x 10^5 células/ml con el anticuerpo monoclonal de ratón IgG1 81.2 a 1 - 50µg/ml. Un anticuerpo control de isotipo de IgG1 se usó como control. La tinción se analizó utilizando el Citómetro de Flujo Accuri C6.

Fármacos y Tratamiento

Tabla 4

Grupo	n	Fármaco/Agente de ensayo			
		Agente	mg/kg	Vía	Posología
Control	10	Vehículo (PBS)	-	ip	2/s x 6
Tratados	10	mAb 81.2	10	ip	2/s x 6

Administración in vivo de mAb específico de IL1RAP humano 81.2 o vehículo

Ratones CD.17 SCID hembra de ocho a 12 semanas de edad recibieron una inyección, por vía subcutánea en el costado, de 1 x 10^7 células tumorales SK-MEL-5 en 50 % de Matrigel por animal. El tratamiento se inició aproximadamente una semana después de la inyección de las células de melanoma cuando los tumores habían alcanzado un tamaño de 108 - 128 mm^3. Se realizó un emparejamiento del tamaño del tumor en 20 animales dando 10 ratones cada uno en los dos grupos de tratamiento.

Un anticuerpo monoclonal IgG2a de ratón 81.2, se preparó a una dosis de 10 mg/kg y con un volumen de 10 ml/kg en PBS. A los animales de control se les dio volúmenes iguales de PBS. Los tratamientos se administraron por vía intraperitoneal. El volumen del tumor mediante determinación con calibrador y los pesos totales se controlaron dos veces a la semana.

El criterio de valoración del estudio es el retraso del crecimiento tumoral.

Resultados

Citometría de flujo

Tabla 5

Expresión de IL1RAP en la línea celular de melanoma humana SK-MEL-5 y la línea celular de LMC humana KU812. Los valores representan la intensidad media de fluorescencia

Línea celular	Nombre de la muestra	Concentración	Expresión de IL1 RAP
	Sin marcaje	N/A	473
SK-MEL-5	81.2	1 µg/ml	501
	81.2	10 µg/ml	19010
	81.2	50 µg/ml	17560
	Control de isotipo	10 µg/ml	605
	Control de isotipo	50 µg/ml	548
	Solo secundaria	1 µg/ml	497
	Sin marcaje	N/A	291
KU812	81.2	1 µg/ml	1188
	81.2	10 µg/ml	2156
	81.2	50 µg/ml	1868
	Control de isotipo	10 µg/ml	715
	Control de isotipo	50 µg/ml	463
	Solo secundaria	1 µg/ml	309

Actividad in vivo de mAb 81.2 a modo de ejemplo

El análisis del estudio en el día 33 desde el comienzo de la dosificación mostró una demora estadísticamente significativa en el crecimiento del tumor en el grupo de tratamiento en comparación al grupo de control en los días 22 ($P<0.05$), 26 y 29 ($p<0.001$) y el día 33 ($p<0.0001$) (véase la Figura 14).

Conclusión

La expresión de IL1RAP fue confirmada por citometría de flujo en la línea celular de tumor de melanoma SK-MEL-5 y mostró una expresión que fue más alta que esa en la línea celular de leucemia mieloide crónica humana KU-812.

Los datos *in vivo* indican que el anticuerpo monoclonal específico de IL1RAP, 81,2, administrado dos veces por semana a una dosis de 10 mg/kg, causó inhibición en el crecimiento de las células de tumor de la línea celular de melanoma humano que expresa IL1RAP, SK-MEL-5.

REIVINDICACIONES

1. Un agente que comprende o consiste en un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo es específico para la proteína accesoria del receptor de interleucina-1 (IL1RAP) para su uso en el tratamiento o la prevención de un cáncer en un paciente, en donde el cáncer es un tumor sólido que tiene células que expresan IL1RAP.

2. Un agente para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el tumor sólido se selecciona del grupo que consiste en cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, melanomas, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro/SNC, cáncer de cuello uterino, cáncer esofágico, cáncer gástrico, cáncer de cabeza/cuello, cáncer de riñón, cáncer de hígado, linfomas, cáncer de ovario, cáncer de páncreas y sarcomas.

3. Un agente para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde el tumor sólido se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón, de colon, de mama, linfoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, melanoma y astrocitoma.

4. Un agente para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el agente es capaz de destruir las células asociadas al tumor sólido.

5. Un agente para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el agente es capaz de inducir la apoptosis de las células asociadas al tumor sólido.

6. Un agente para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la destrucción de las células está inducida por citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (CCDA).

7. Un agente para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el agente es capaz de bloquear la unión de uno o más co-receptores a IL1RAP.

8. Un agente para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el agente comprende o consiste en un anticuerpo intacto.

9. Un agente para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el agente comprende o consiste en un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo.

10. Un agente para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el fragmento de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en fragmentos Fv (por ejemplo, Fv de cadena sencilla, Fv unido por disulfuro y anticuerpos de dominio) y fragmentos similares a Fab (por ejemplo, fragmentos Fab, fragmentos Fab' y fragmentos F(ab)2).

11. Un agente para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, es un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado.

12. Un agente para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un resto para aumentar la semivida *in vivo* del agente.

13. Un agente para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un resto citotóxico.

.

FIGURA 1

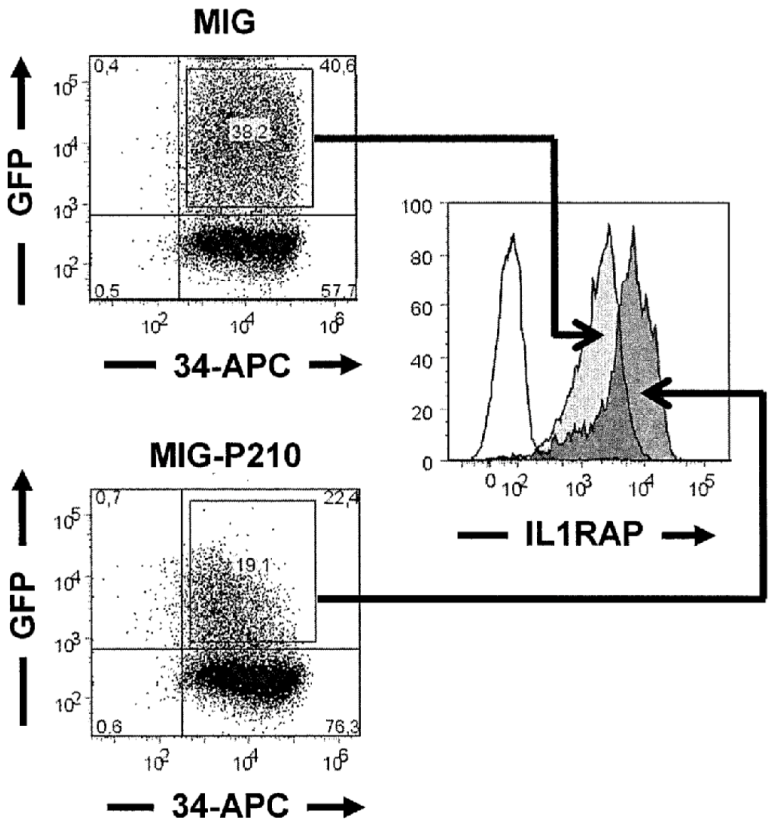

MIG
GFP
34-APC
0,4
40,6
38,2
0,5
57,7
MIG-P210
0,7
22,4
19,1
0,6
76,3
IL1RAP
100
80
60
40
20
0

FIGURA 2(A)

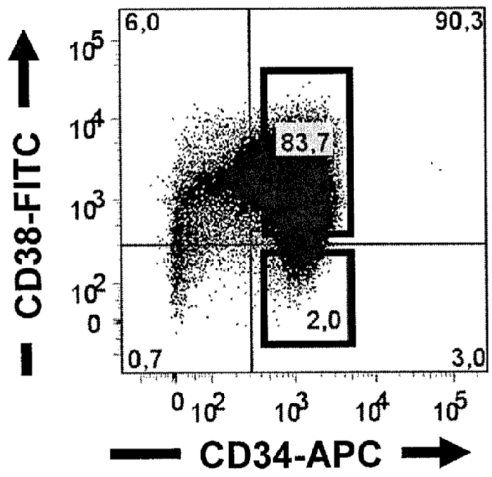


FIGURA 2(B)

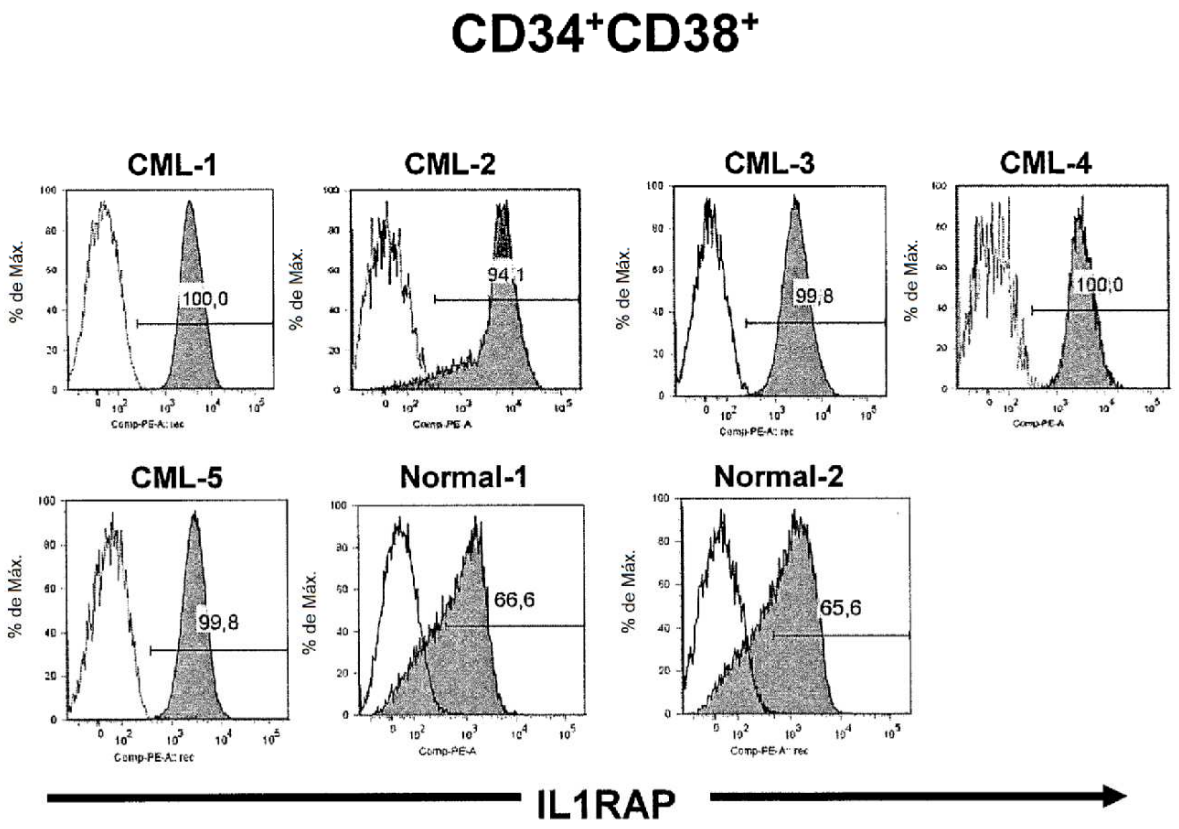

CD34+CD38+
CML-1
CML-2
CML-3
CML-4
CML-5
Normal-1
Normal-2
% de Máx.
100,0
94,1
99,8
100,0
99,8
66,6
65,6
IL1RAP

FIGURA 2(C)

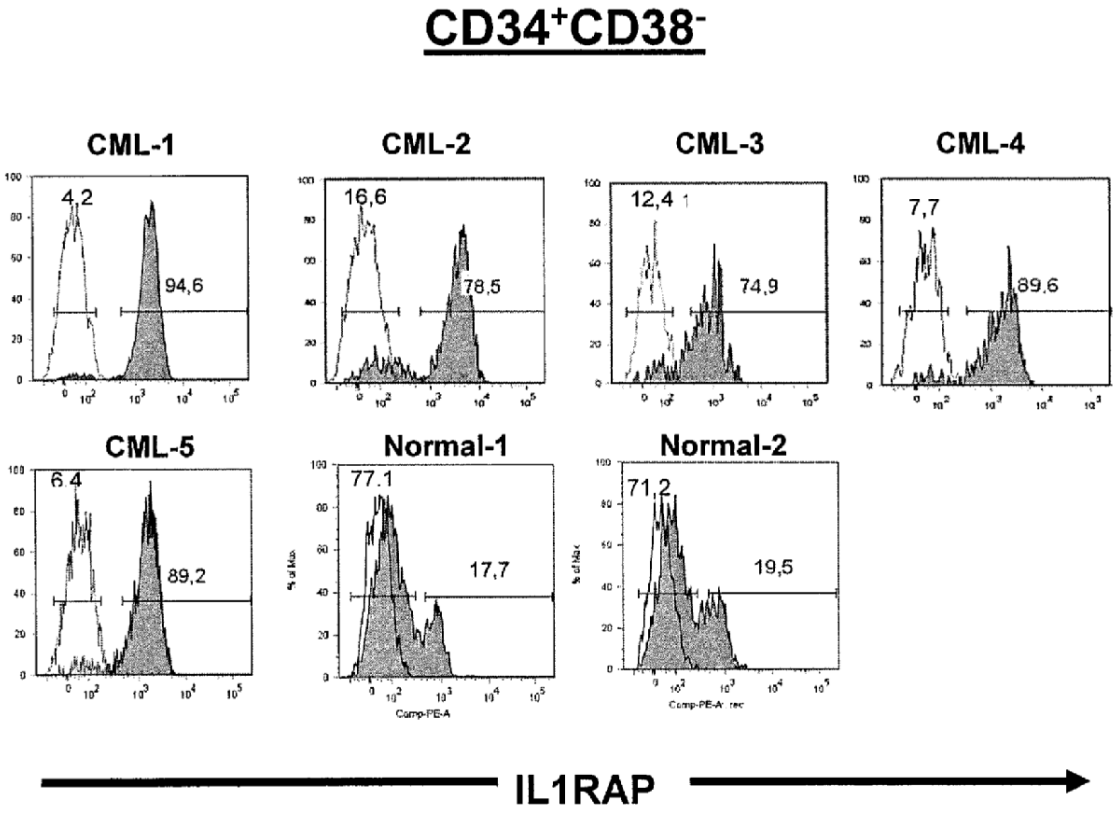

CD34+CD38-
CML-1
4,2
94,6
CML-2
16,6
78,5
CML-3
12,4
74,9
CML-4
7,7
89,6
CML-5
6,4
89,2
Normal-1
77,1
17,7
Normal-2
71,2
19,5
IL1RAP

FIGURA 3

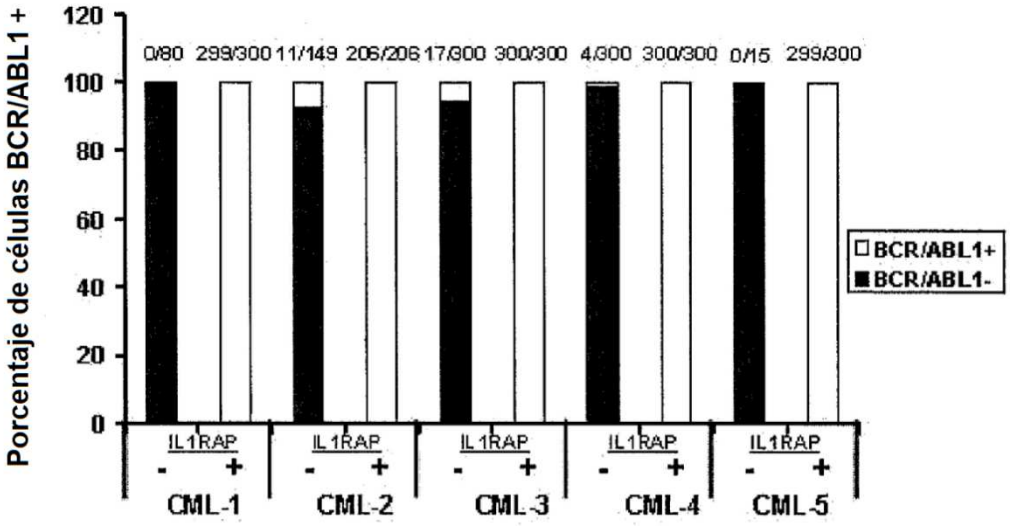

Porcentaje de células BCR/ABL1 +
120
100
80
60
40
20
0
0/80
299/300
11/149
206/206
17/300
300/300
4/300
300/300
0/15
299/300
IL1RAP
-
+
CML-1
CML-2
CML-3
CML-4
CML-5
BCR/ABL1+
BCR/ABL1-

FIGURA 4(A)

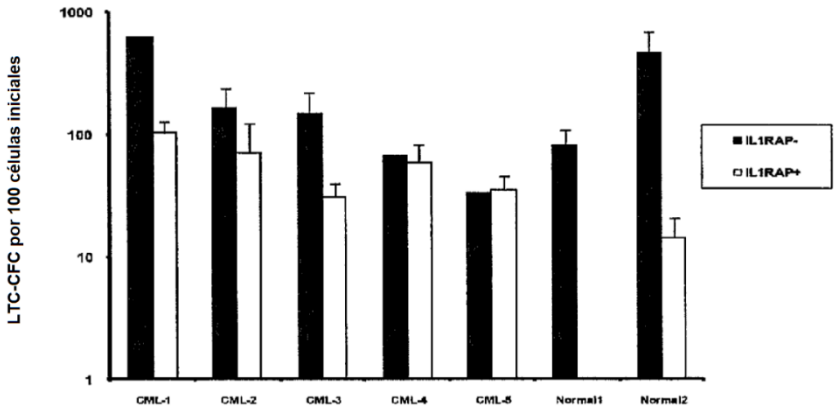

1000
100
10
1
LTC-CFC por 100 células iniciales
CML-1
CML-2
CML-3
CML-4
CML-5
Normal1
Normal2
IL1RAP-
IL1RAP+

FIGURA 4(B)

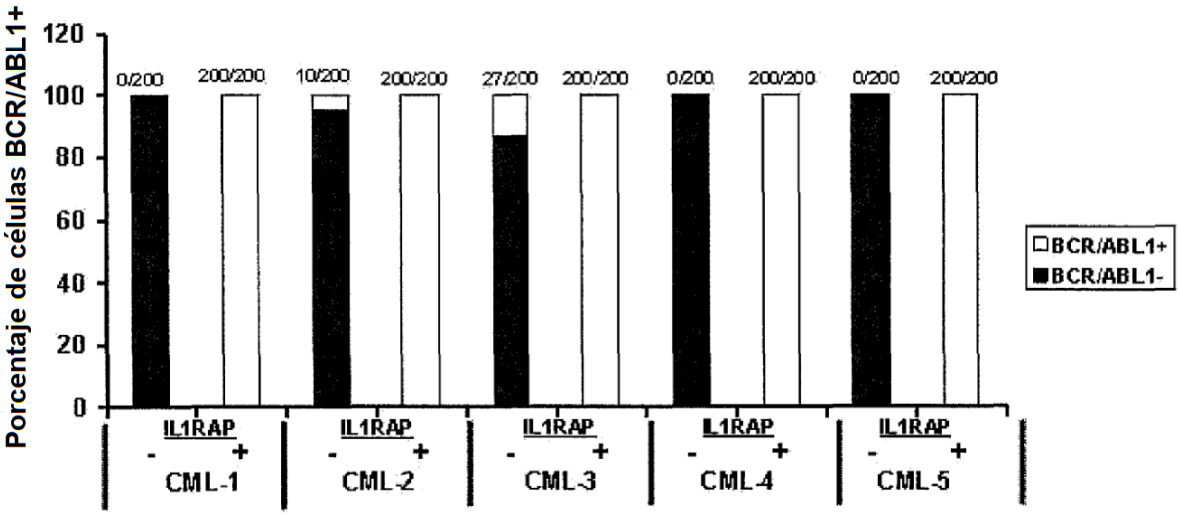

Porcentaje de células BCR/ABL1+
120
100
80
60
40
20
0
0/200
200/200
10/200
200/200
27/200
200/200
0/200
200/200
0/200
200/200
IL1RAP
- +
CML-1
CML-2
CML-3
CML-4
CML-5
BCR/ABL1+
BCR/ABL1-

FIGURA 5

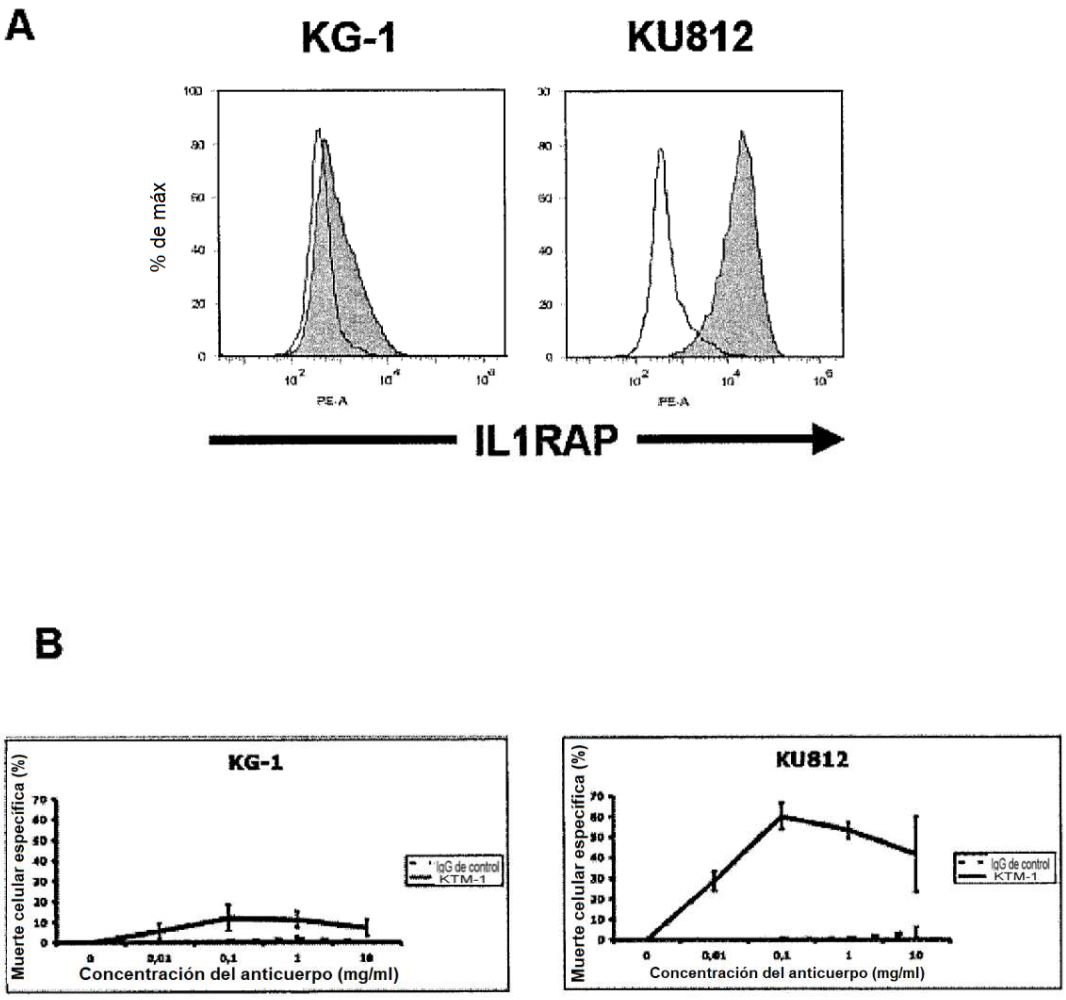

A
KG-1
KU812
% de máx
PE-A
PE-A
IL1RAP
B
KG-1
Muerte celular específica (%)
Concentración del anticuerpo (mg/ml)
IgG de control
KTM-1
KU812
Muerte celular específica (%)
Concentración del anticuerpo (mg/ml)
IgG de control
KTM-1

FIGURA 6(A)

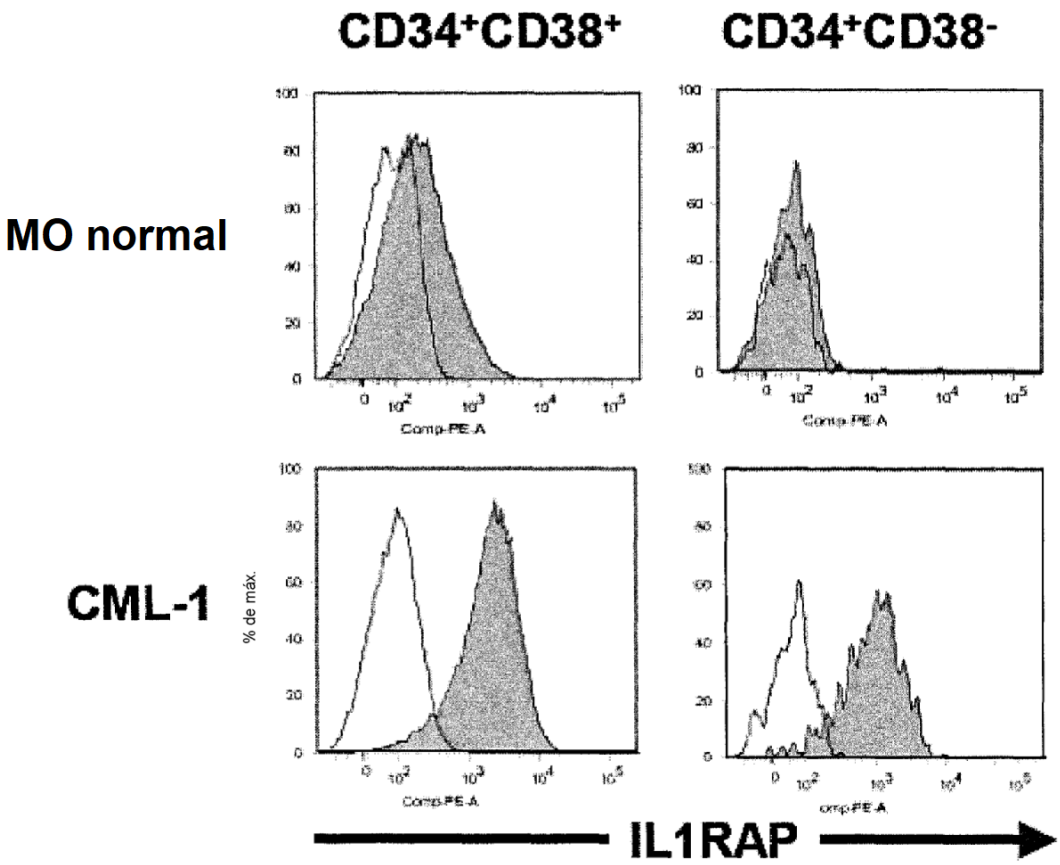


FIGURA 6(B)

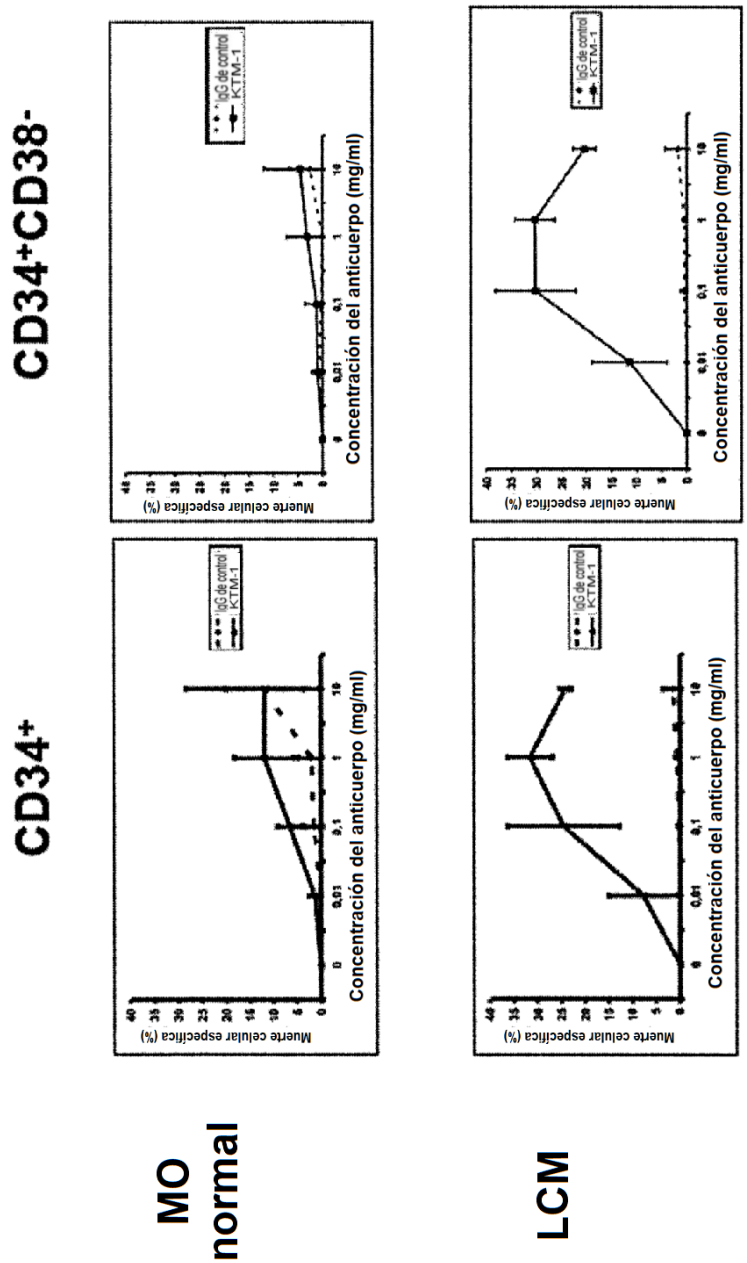

CD34+
CD34+CD38-
MO normal
LCM
Muerte celular específica (%)
Concentración del anticuerpo (mg/ml)
IgG de control
KTM-1

FIGURA 7(A Y B)

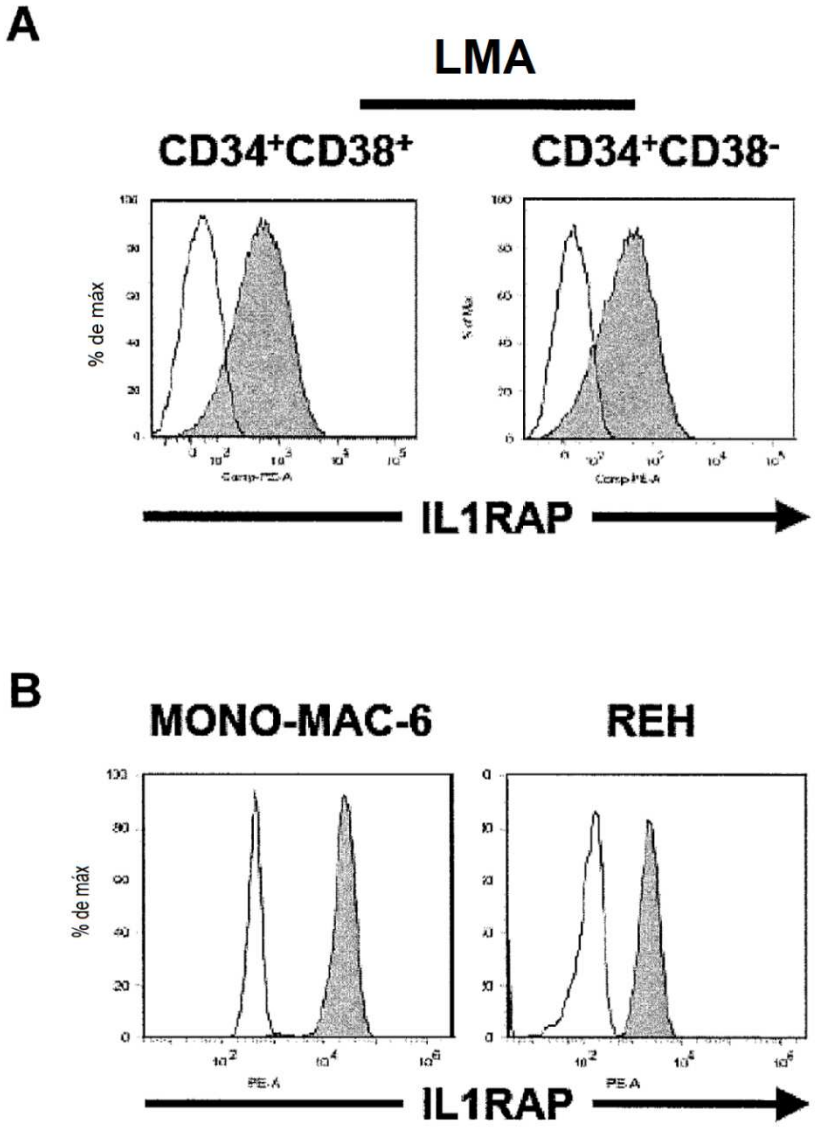

A
LMA
CD34+CD38+
CD34+CD38-
% de máx
IL1RAP
B
MONO-MAC-6
REH
% de máx
PE-A
IL1RAP

FIGURA 7(C)

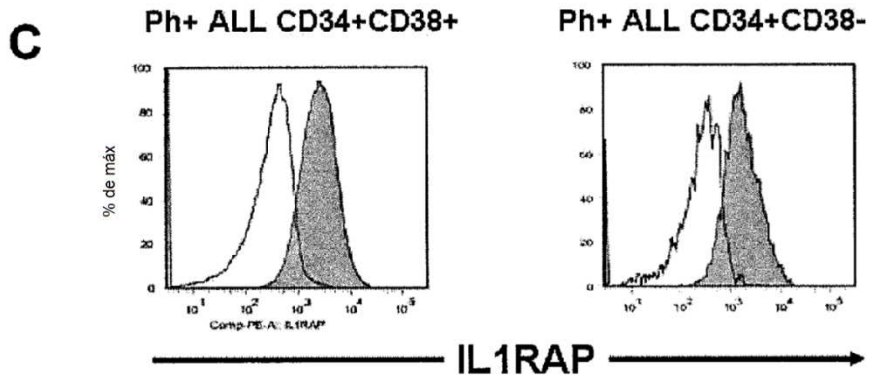


FIGURA 8

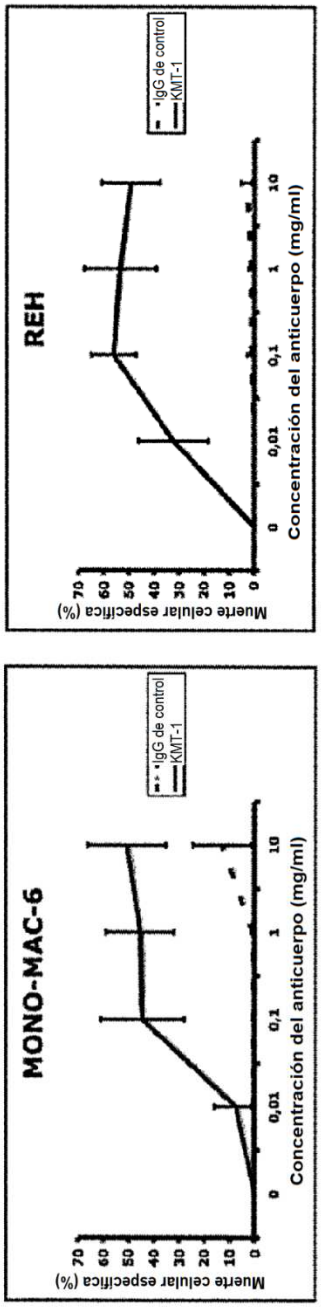

REH
MONO-MAC-6
IgG de control
KMT-1
Muerte celular específica (%)
Concentración del anticuerpo (mg/ml)
0
10
20
30
40
50
60
70
0
0,01
0,1
1
10

FIGURA 9 (A Y B)

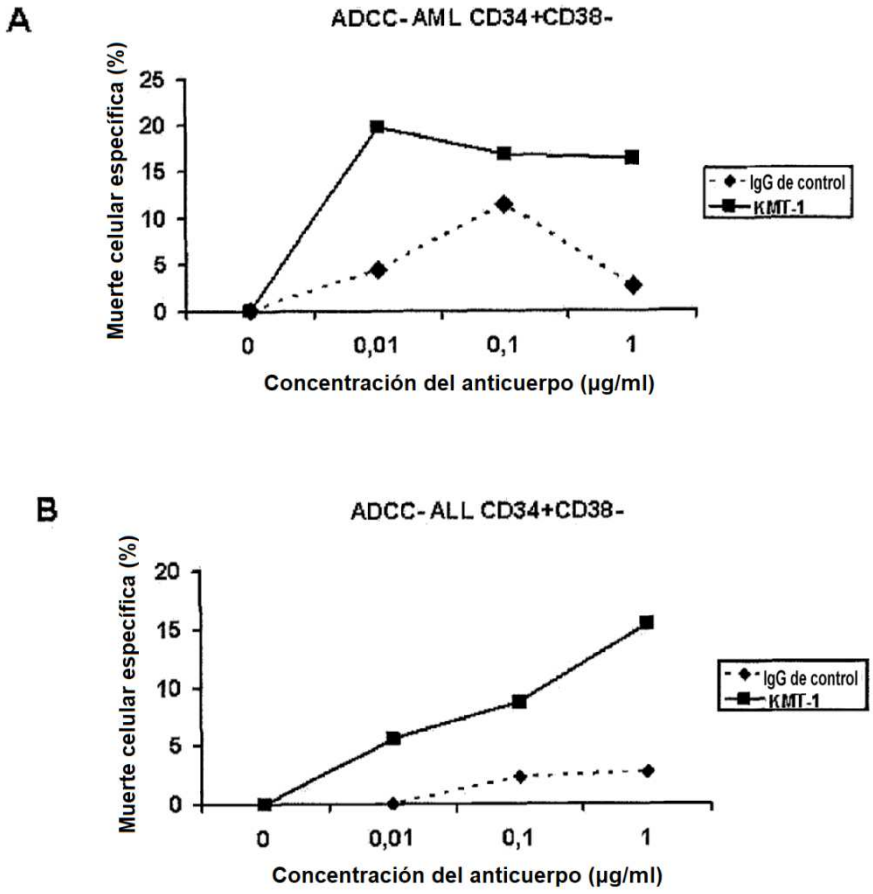

A
ADCC- AML CD34+CD38-
Muerte celular específica (%)
25
20
15
10
5
0
0
0,01
0,1
1
Concentración del anticuerpo (µg/ml)
IgG de control
KMT-1
B
ADCC- ALL CD34+CD38-
Muerte celular específica (%)
20
15
10
5
0
0
0,01
0,1
1
Concentración del anticuerpo (µg/ml)
IgG de control
KMT-1

FIGURA 10 (A Y B)

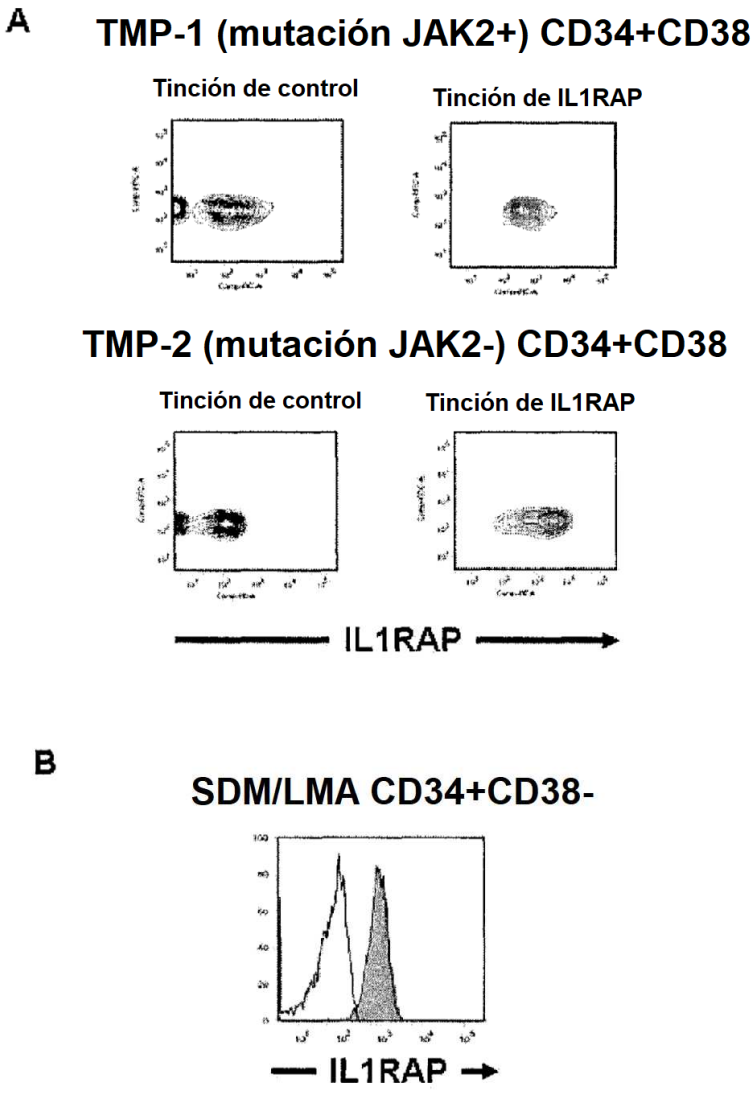


FIGURA 11

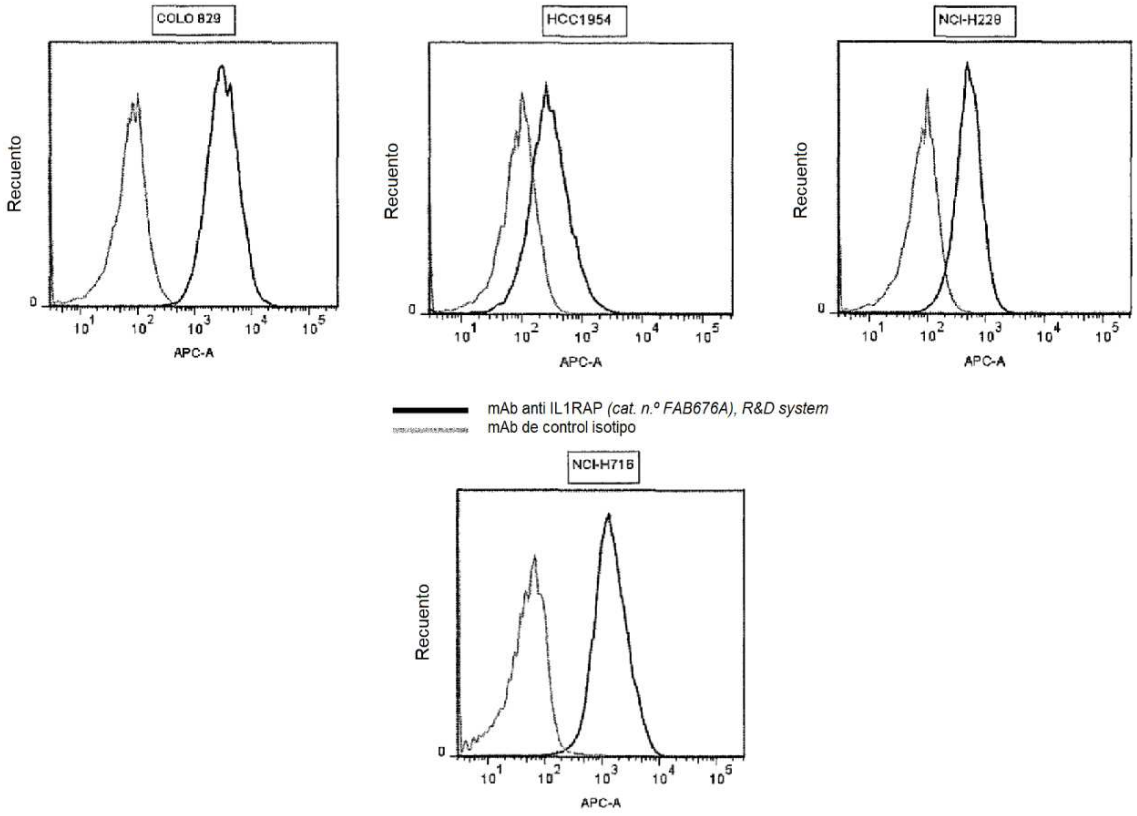

COLO 829
HCC1954
NCI-H228
Recuento
APC-A
mAb anti IL1RAP (cat. n.º FAB676A), R&D system
mAb de control isotipo
NCI-H716

FIGURA 11 - continuación

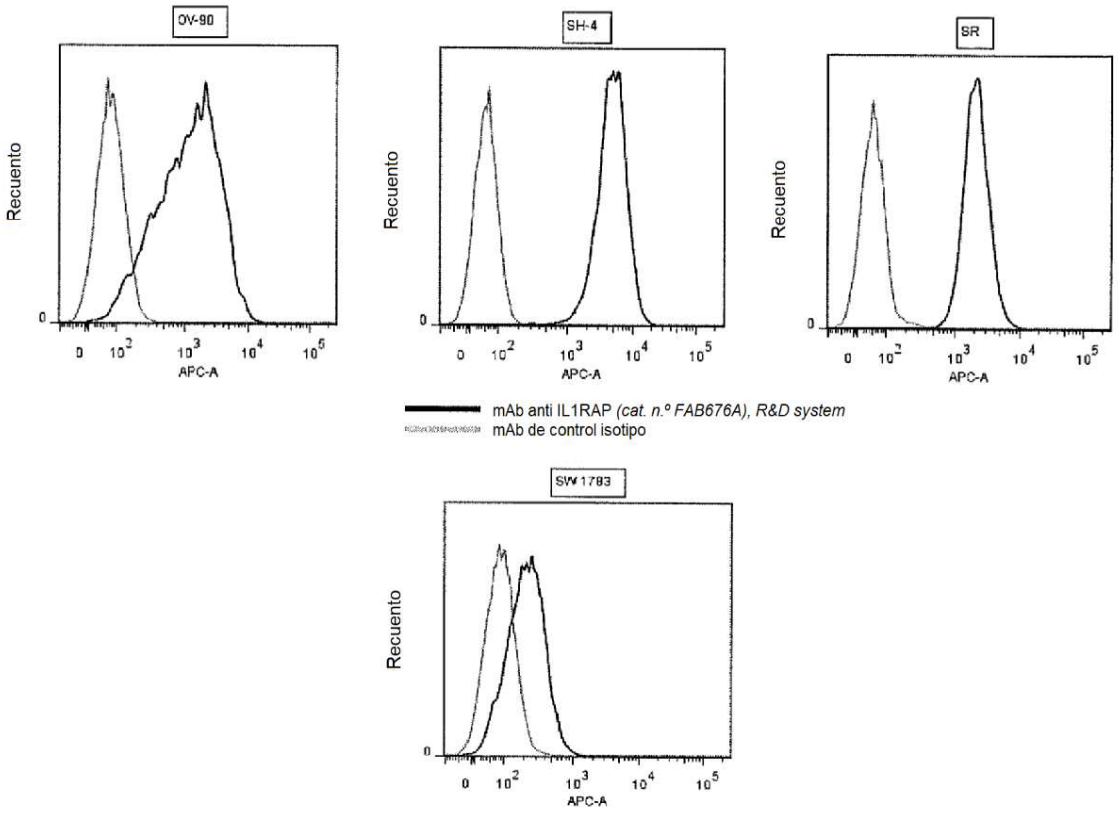


FIGURA 12

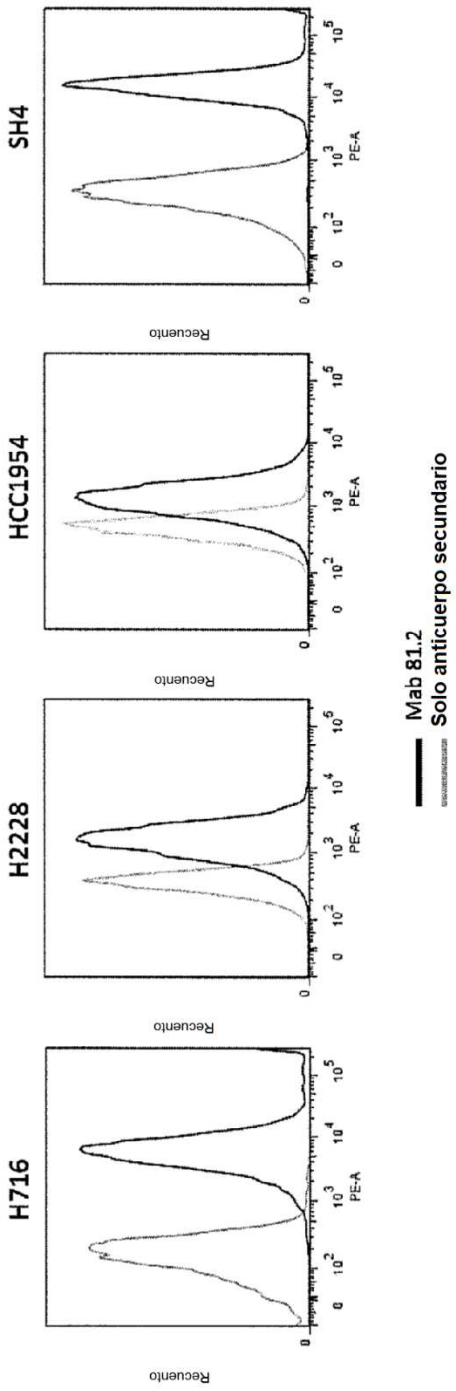

SH4
HCC1954
H2228
H716
Recuento
PE-A
Mab 81.2
Solo anticuerpo secundario

FIGURA 13

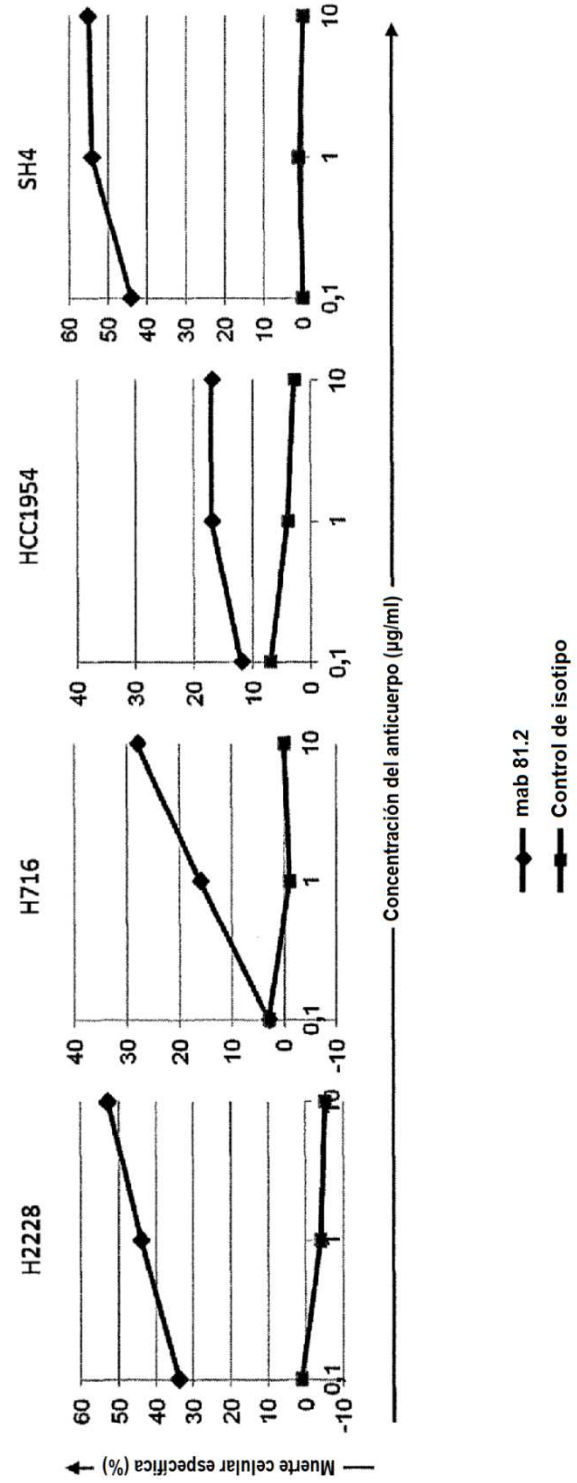
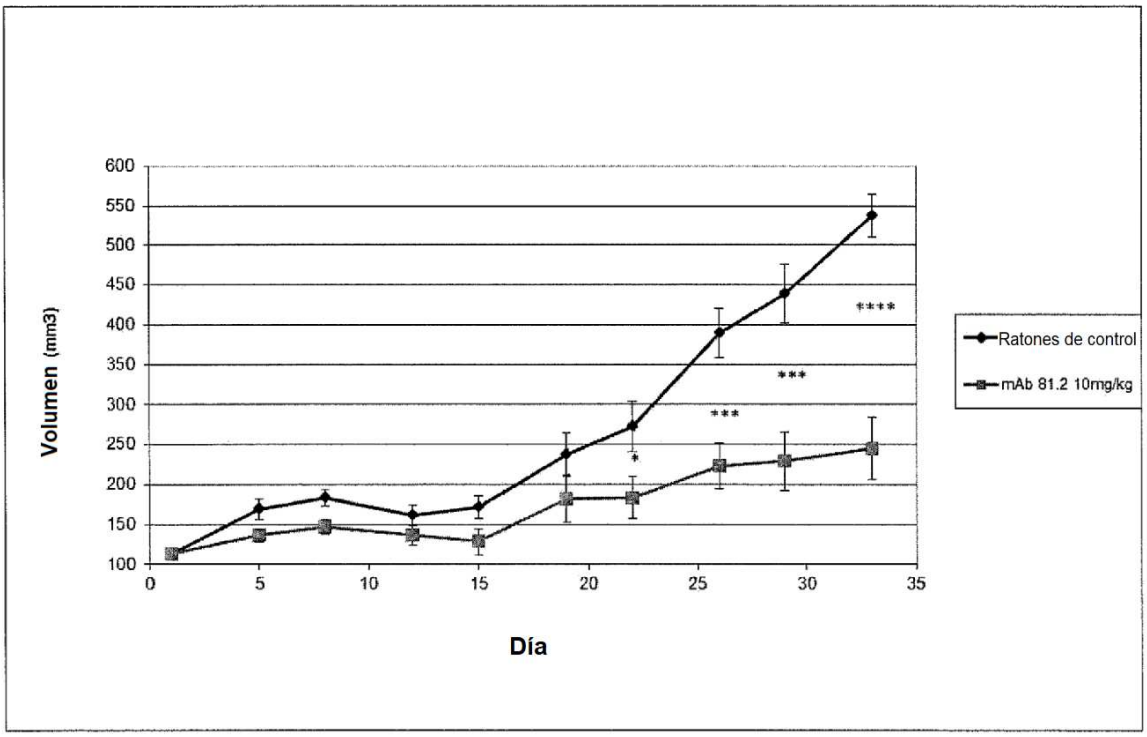

SH4
HCC1954
H716
H2228
Muerte celular específica (%)
Concentración del anticuerpo (µg/ml)
mab 81.2
Control de isotipo

FIGURA 14


Volumen (mm3)
600
550
500
450
400
350
300
250
200
150
100
0
5
10
15
20
25
30
35
Día
****
***
***
*
Ratones de control
mAb 81.2 10mg/kg