

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 446 215**

21 Número de solicitud: 201231274

51 Int. Cl.:

C07K 16/28

(2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

06.08.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

06.03.2014

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (80.0%)**

SERRANO, 117

28006 MADRID ES y

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (20.0%)

72 Inventor/es:

TORIBIO GARCÍA, María Luisa;

GARCÍA PEYDRÓ, Marina y

SÁNCHEZ MADRID, Francisco

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

54 Título: **APLICACIÓN TERAPÉUTICA DE AGENTES INHIBIDORES DE CD44 FRENTE A LA
LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA (ALL) HUMANA.**

57 Resumen:

La presente invención describe la aplicación terapéutica de agentes inhibidores de CD44 frente a la leucemia linfoblástica aguda (ALL) humana. En concreto, la presente invención hace referencia a un agente inhibidor de la función de CD44 para su uso en medicina, preferentemente para la prevención y/o tratamiento de la T-ALL humana, así como a una composición farmacéutica y un kit. La presente invención también hace referencia a un método de prevención y/o tratamiento de la T-ALL humana, a un modelo de células pre-leucémicas de la T-ALL humana en ratón inducidas por ICN1, y a un modelo de xenotrasplante en ratón para el estudio de las alteraciones moleculares tempranas que se asocian a la generación de las células que inician y mantienen la T-ALL humana.

ES 2 446 215 A2

DESCRIPCIÓN

Aplicación terapéutica de agentes inhibidores de CD44 frente a la leucemia linfoblástica aguda (ALL) humana.

SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención forma parte del sector de la química y la farmacia, en concreto se refiere al uso terapéutico de agentes inhibidores de la función de la molécula CD44 para el tratamiento y/o la prevención de la leucemia linfoblástica aguda (ALL) humana, con especial mención al subtipo de leucemia T linfoblástica aguda (T-ALL).

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

La ALL es un tumor agresivo que constituye el cáncer pediátrico más común. Entre las ALLs, la ALL de linfocitos B (B-ALL) es el subtipo más frecuente y mejor estudiado. El subtipo T-ALL constituye el 10-15% de las ALLs pediátricas y el 25% de las adultas y su patogénesis es menos conocida. El tratamiento convencional con quimioterapia de la T-ALL tiene una alta frecuencia de recaídas y la supervivencia a 5 años en estos casos es menor del 30% (Aifantis *et al.*, 2008). Esta mala respuesta es debida a la resistencia a los tratamientos convencionales de las células iniciadoras de la leucemia, conocidas como LICs, y refleja la necesidad de encontrar tratamientos alternativos frente a ellas.

A día de hoy, no existen terapias dirigidas específicamente contra las LICs de las T-ALLs, ni se han descrito marcadores que permitan identificar a las células iniciadoras de este tipo de leucemia linfocítica, o a las moléculas implicadas en su función. Por el contrario, en otros tipos de leucemias distintas a la T-ALL, como las leucemias mieloides, tanto aguda (AML) como crónica (CML), se ha descrito que la molécula de adhesión CD44, un receptor del ácido hialurónico esencial en la mielopoiesis normal, es fundamental para establecer la interacción de las LICs mieloides con su nicho en la médula ósea (BM) y para mantener sus propiedades oncogénicas en un modelo de ratón (Jin *et al.* 2006; Krause *et al.*, 2006; Hertweck *et al.* 2011). De hecho, se ha demostrado la relevancia de CD44 como diana terapéutica en estas leucemias mieloides humanas en modelos de ratón *in vivo* (Jin *et al.*, 2006). Además, CD44 se sobre-expresa en algunos tipos de leucemias de linfocitos B, como la B-ALL, donde parece ser un marcador de LICs asociado con mal pronóstico y recaída (Hertweck *et al.* 2011; Coustan-Smith *et al.*, 2011). En otros tipos de leucemias linfocíticas B, como la leucemia linfocítica crónica (LLC), la sobre-expresión de CD44 tiene una función inductora de supervivencia, y también se asocia con mal pronóstico, por lo que se ha sugerido que CD44 también podría ser una diana de intervención terapéutica en leucemias de linfocitos B (Giannopoulos *et al.*, 2009; Herishanu *et al.* 2011; Buggins *et al.* 2011). Sin embargo, esta posibilidad no se ha demostrado formalmente.

En el caso de las T-ALL, las LICs están incluidas en la población de linfoblastos T inmaduros que infiltran la BM. Las LICs de la T-ALL se originan por la aparición de mutaciones oncogénicas en diversas moléculas de señalización que intervienen en el desarrollo de los linfocitos T en el timo. Entre ellas, las mutaciones activadoras en el gen *NOTCH1* son frecuentes en más del 50% de las T-ALL humanas (Weng *et al.* 2004). Estas formas mutadas (en concreto ICN1) son capaces de generar en el ratón una leucemia similar a la T-ALL humana (Pear *et al.*, 1996), lo que refuerza la función proto-oncogénica de Notch1 *in vivo*.

Sin embargo, actualmente, se desconoce el impacto *in vivo* de la activación aberrante de Notch1 en progenitores hematopoyéticos humanos, y no se han descrito hasta la fecha modelos humanizados de generación de T-ALL dependiente de Notch1, similares a los de ratón (Pear *et al.*, 1996), que permitan analizar los múltiples eventos que determinan la generación de la T-ALL humana, incluyendo la generación de las LICs.

Aunque CD44 se sobre-expresa en las LICs de varios tumores hematológicos mieloides y linfocíticos B (Liu and Jiang, 2006; Hertweck *et al.* 2011), la posibilidad de que CD44 sea una molécula de relevancia en las LICs de las T-ALLs no se ha contemplado hasta la fecha. El motivo principal de la falta de atención hacia CD44 en las T-ALL es debido al hecho de que CD44 debe ser una molécula funcionalmente dispensable en el linaje de los linfocitos T, ya que su expresión disminuye progresivamente hasta desaparecer de la membrana durante el desarrollo normal en el timo (Márquez *et al.* 1995). Puesto que el desarrollo de los linfocitos T es dependiente de la activación de Notch1 (Radtke *et al.* 1999; Pui *et al.* 1999), no se espera que CD44 se induzca en leucemias del linaje T, especialmente en aquellas donde Notch1 es activo (Pear *et al.*, 1996; Weng *et al.* 2004).

Debido a la falta de modelos de T-ALL humana dependiente de Notch1 *in vivo*, actualmente no se ha podido analizar formalmente si la activación aberrante de Notch1 (en concreto ICN1) en los progenitores hematopoyéticos humanos de los linfocitos T es capaz de regular la expresión de moléculas de relevancia funcional para las LICs de las T-ALL, como CD44 u otras. Esta información es esencial, ya que permitiría desarrollar estrategias terapéuticas frente a la T-ALL humana basadas en agentes inhibidores de estas moléculas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención hace referencia a un agente inhibidor de la función de la proteína CD44 codificada por el gen CD44 con SEQ ID No. 1, para su uso en medicina, en concreto para la preparación de una composición

farmacéutica o medicamento útil para la prevención y/o tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda humana. Preferentemente, la leucemia linfoblástica aguda humana es una leucemia T linfoblástica aguda (T-ALL).

En una realización preferente de la presente invención, se hace referencia al agente inhibidor anteriormente descrito, caracterizado por que es capaz de inhibir el injerto y/o la expansión de células humanas iniciadoras de la leucemia linfoblástica aguda humana en la médula ósea de un paciente.

En otra realización preferente de la presente invención, se hace referencia al agente inhibidor anteriormente descrito, caracterizado por que dicho agente es un anticuerpo o un fragmento del mismo, capaz de reconocer específicamente y/o selectivamente la proteína CD44 codificada por el gen CD44 con SEQ ID No. 1. Preferentemente, el anticuerpo es monoclonal.

En otra realización preferente de la presente invención, se hace referencia al agente inhibidor anteriormente descrito, caracterizado por que dicho agente es un vector de silenciamiento génico que comprende al menos una secuencia nucleotídica complementaria del gen CD44 con SEQ ID No. 1, capaz de silenciar su expresión. Preferentemente, el vector es lentiviral.

En otra realización preferente de la presente invención, se hace referencia al agente inhibidor anteriormente descrito, caracterizado por que dicho agente es un agente bloqueante de un ligando de la proteína CD44 codificada por el gen CD44 con SEQ ID No. 1. Preferentemente, dicho ligando es el ácido hialurónico.

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

La presente invención hace referencia también a un kit para el tratamiento y/o prevención de la leucemia linfoblástica aguda humana caracterizada/o por comprender al menos un agente inhibidor definido anteriormente, o al menos una composición farmacéutica y/o medicamento definida/o anteriormente.

La presente invención hace referencia también a un método de prevención y/o tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda humana que comprende la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente inhibidor definido anteriormente, o una composición farmacéutica y/o medicamento definida/o anteriormente, o un kit definido anteriormente.

La presente invención hace referencia también a un modelo de generación de células pre-leucémicas de la leucemia T-ALL humana en ratón inducidas por ICN1. Preferentemente, dicho modelo de células se caracteriza por que dichas células son linfocitos T humanos aberrantes con fenotipo pre-leucémico CD4+CD8+ doble positivo con altos niveles de expresión de la proteína CD44 codificada por el gen CD44 con SEQ ID No. 1.

La presente invención hace referencia también a un modelo de xenotrasplante en ratón caracterizado por que comprende un injerto en la médula ósea de linfocitos T humanos aberrantes con fenotipo pre-leucémico CD4+CD8+ doble positivo con altos niveles de expresión de la proteína CD44 codificada por el gen CD44 con SEQ ID No. 1.

La presente invención hace referencia también a un método de obtención del modelo de xenotrasplante en ratón definido anteriormente, caracterizado por que comprende las siguientes etapas esenciales: i) trasplantar progenitores hematopoyéticos humanos transducidos con el oncogén ICN1 en al menos un ratón inmunodeficiente; y ii) generar linfocitos T aberrantes con fenotipo pre-leucémico CD4+CD8+ doble positivo con altos niveles de expresión de la proteína CD44 codificada por el gen CD44 con SEQ ID No. 1.

Por último, la presente invención hace referencia también al uso del modelo celular descrito anteriormente, o del modelo de xenotrasplante de ratón descrito anteriormente, para el estudio de las alteraciones moleculares tempranas que se asocian a la generación de las células que inician y mantienen la leucemia T-ALL humana, así como para el estudio pre-clínico de posibles agentes terapéuticos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En concreto en la presente invención:

1. Se identifica la proteína CD44 codificada por el gen CD44 con SEQ ID No. 1, de ahora en adelante indicada como "CD44", como una diana transcripcional de Notch1 en progenitores hematopoyéticos humanos. SEQ ID No. 1 corresponde a ENSG00000026508, e identifica la secuencia nucleotídica del gen CD44 en *Homo sapiens* desde 5 kilobases "upstream" del sitio de inicio de la transcripción hasta el primer exón codificante.

2. Se generan modelos de células pre-leucémicas T-ALL humanas en ratón. En concreto células T humanas aberrantes con fenotipo pre-leucémico CD4⁺CD8⁺ doble positivo (DP) con altos niveles de expresión de CD44

(CD44^{hi}), en la BM de ratones RAG-2^{-/-} x γ_c ^{-/-} xenotrasplantados con progenitores hematopoyéticos humanos (de sangre de cordón umbilical o de timo neonatal) en los que se ha expresado la forma oncogénica ICN1 de Notch1 por transducción retroviral.

3. Se demuestra la inducción de CD44 por ICN1 en las células pre-leucémicas. En concreto, se demuestra la función de CD44 como molécula implicada en el injerto en la médula ósea de linfocitos T humanos aberrantes pre-leucémicos inducidos por ICN1 en un modelo de xenotrasplante en ratón, utilizando dos estrategias:

a) Por sobre-expresión de CD44; se demuestra el efecto cooperativo de la expresión de ICN1 y CD44 sobre el incremento del injerto en la BM de progenitores hematopoyéticos humanos trasplantados en ratones RAG-2^{-/-} x γ_c ^{-/-}.

b) Por inhibición de CD44; se demuestra que el tratamiento *in vitro* con agentes inhibidores de la función de CD44 bloquea el injerto en la BM de las células T humanas aberrantes pre-leucémicas inducidas por ICN1.

4. Se demuestra el tratamiento para prevenir el injerto de las células pre-leucémicas. En concreto se demuestra que el tratamiento *in vivo* con agentes inhibidores de la función de CD44, inhibe el injerto en la BM de células T humanas aberrantes pre-leucémicas, inducidas por ICN1 en un modelo de ratón.

5. Se demuestra el tratamiento para prevenir la expansión de células leucémicas primarias T-ALL humanas *in vivo* y evitar el establecimiento y la progresión de la enfermedad. En concreto se demuestra que el tratamiento *in vitro* e *in vivo* con agentes inhibidores de la función de CD44, inhibe el injerto y la expansión de leucemias T-ALL humanas primarias trasplantadas en ratón.

En la presente invención, el tratamiento terapéutico de la T-ALL humana se ensaya utilizando un modelo preclínico en ratones inmunodeficientes RAG-2^{-/-} x γ_c ^{-/-} previamente generados (Weijer *et al.* 2002) que se trasplantan con leucemias humanas T-ALL primarias procedentes de sangre periférica de pacientes no tratados diagnosticados de T-ALL.

Para el tratamiento preventivo de la T-ALL se utiliza un modelo de inducción de T-ALL humana que se ha desarrollado sobre la base del modelo establecido previamente en ratón (Pear *et al.* 1996). El modelo consiste en el xenotrasplante de ratones RAG-2^{-/-} x γ_c ^{-/-} obtenidos previamente (Weijer *et al.* 2002) con progenitores hematopoyéticos humanos (de sangre de cordón umbilical o de timo neonatal) transducidos con la forma oncogénica ICN1 de Notch1, que se ha demostrado que induce T-ALL en ratón (Pear *et al.* 1996).

En la presente invención, el término: "leucemia T linfoblástica aguda (T-ALL)" se refiere a un tumor agresivo de linfocitos T inmaduros que se caracteriza por la infiltración de la BM y la sangre con linfoblastos de fenotipo linfoide T (Aster *et al.*, 2008; Aifantis *et al.*, 2008).

En la presente invención, el término: "pre-leucemia T-ALL humana" se refiere a la población de células T humanas con capacidad proliferativa, que presentan un fenotipo aberrante CD4+CD8+ doble positivo (DP) con altos niveles de expresión de CD44 (CD44^{hi}), y que injertan la BM de ratones inmunodeficientes RAG-2^{-/-} x γ_c ^{-/-} que han sido trasplantados con progenitores hematopoyéticos humanos (de sangre de cordón umbilical o de timo neonatal) que expresan la forma oncogénica ICN1 de Notch1. Se utiliza este término por analogía al término utilizado para definir a la población CD4+CD8+ DP CD44^{hi} derivada de precursores de ratón en los que se expresa ICN1 (Pear *et al.*, 1996; Weng *et al.* 2004) u otros oncogenes como K-Ras (Kindler *et al.*, 2008), que injertan la BM de ratones receptores y eventualmente generan leucemias T-ALL per se o tras la colaboración de otros eventos oncogénicos.

En la presente invención, el término: "leucemia humana T-ALL primaria" se refiere a células no manipuladas procedentes de sangre periférica de pacientes diagnosticados de leucemia T-ALL, que no han sido sometidos a tratamiento.

En la presente invención, el término: "CD44" se refiere a una glicoproteína de membrana codificada por el gen CD44 con SEQ ID No. 1, perteneciente al grupo de las moléculas de adhesión, que se une al ácido hialurónico como principal ligando y participa en: activación celular, recirculación, migración y metástasis, adhesión a la matriz extracelular, angiogénesis, y proliferación y diferenciación celular (Hertweck *et al.*, 2011). En hematopoyesis, CD44 participa en: la interacción de los progenitores con el estroma de la BM, la maduración y muerte inducida por activación de linfocitos T, la extravasación y migración linfoide, la activación leucocitaria. CD44 también participa en el desarrollo y progresión de neoplasias hematológicas, así como en su invasividad, injerto en la BM y movilización desde la BM a la periferia (Hertweck *et al.*, 2011).

En la presente invención, el término: "Notch1" se refiere a uno de los miembros de una familia altamente conservada de receptores de membrana (Notch), implicados en procesos de proliferación, apoptosis, diferenciación celular, determinación de linajes celulares y oncogenesis (Artavanis-Tsakonas, 1999).

En la presente invención, el término: “forma oncogénica ICN1 de Notch1” se refiere a la porción intracelular del receptor Notch1 que: 1) en condiciones fisiológicas, tras la activación de Notch1 por el reconocimiento de su ligando, se libera del resto de la molécula y se trasloca al núcleo donde se une al factor de transcripción CSL y al coactivador MAML1 y actúa como regulador de la transcripción, (Aster *et al.*, 2008; Kopan and Ilagan, 2009); y 2) en condiciones patológicas debido a mutaciones activadoras se libera y trasloca al núcleo de forma independiente de ligando, induciendo la generación de leucemias T-ALL (Pear *et al.*, 1996; Weng *et al.* 2004).

En la presente invención, el término: “células T humanas aberrantes con fenotipo pre-leucémico CD4⁺CD8⁺ doble positivo (DP) con altos niveles de expresión de CD44 (CD44^{hi})” se refiere a las células con capacidad proliferativa que injertan la BM de ratones inmunodeficientes RAG-2^{-/-} x γ_c ^{-/-} que han sido trasplantados con progenitores hematopoyéticos humanos (de sangre de cordón umbilical o de timo neonatal) en los que se ha expresado la forma oncogénica ICN1 de Notch1 por transducción retroviral. Se utiliza este término por analogía al término utilizado para definir a la población CD4⁺CD8⁺ DP CD44^{hi} derivada de precursores de ratón en los que se expresa ICN1 (Pear *et al.*, 1996; Weng *et al.* 2004) u otros oncogenes como K-Ras (Kindler *et al.*, 2008), que injertan la BM de ratones receptores y eventualmente generan leucemias T-ALL.

En la presente invención, el término: “inhibidores de la función de CD44” se refiere a todos aquellos agentes capaces de inhibir la transcripción y/o expresión proteica de CD44, o de interaccionar con la proteína CD44 en la membrana induciendo la muerte de la célula que la expresa, o de bloquear la interacción de CD44 con sus ligandos o de bloquear la interacción de los ligandos como el ácido hialurónico con su receptor CD44.

Como agentes inhibidores de la función de CD44, la presente invención hace referencia a aquellos agentes conocidos por un experto en la materia. A continuación se citan los siguientes ejemplos de manera no limitante:

a) anticuerpos anti-CD44, preferentemente monoclonales (mAbs) y/o policlonales, capaces de interaccionar con la molécula CD44 humana de membrana e inducir:

a.1) la muerte de la célula leucémica que expresa CD44 por citotoxicidad celular mediada por complemento o por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), o

a.2) la diferenciación terminal, la muerte por apoptosis o la inhibición de proliferación de las células leucémicas, o

a.3) la internalización de CD44 y/o el bloqueo de la unión de CD44 de la célula leucémica con sus ligandos.

b) vectores de silenciamiento génico portadores de secuencias nucleotídicas complementarias del gen *CD44* humano, capaces de silenciar CD44, preferentemente vectores lentivirales, y

c) agentes bloqueantes de ligandos de CD44, preferentemente el ácido hialurónico (HA) (Liao *et al.*, 1995), tales como oligosacáridos HA competidores del HA endógeno.

El término “anticuerpo anti-CD44”, tal como se emplea en esta memoria, se refiere de forma no limitante a moléculas de inmunoglobulinas que contienen un sitio de fijación de antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona) con la molécula de la invención, y un fragmento Fc capaz de fijar complemento. No se excluyen del término las porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas. Ejemplos de porciones de moléculas de inmunoglobulinas inmunológicamente activas incluyen fragmentos F(ab) y F(ab')₂, los cuales pueden ser generados tratando el anticuerpo con una enzima tal como la pepsina, que contienen un sitio de fijación de antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona) con la molécula de la invención reconocen, pero carecen del fragmento Fc y no son capaces de fijar complemento. Preferentemente, también se incluyen péptidos específicos bloqueantes. Los anticuerpos pueden ser policlonales (incluyen típicamente anticuerpos distintos dirigidos contra determinantes o epítopos distintos) o monoclonales (dirigidos contra un único determinante en el antígeno). El anticuerpo monoclonal puede ser alterado bioquímicamente o mediante manipulación genética, o puede ser sintético, careciendo, posiblemente, el anticuerpo en su totalidad o en partes, de porciones que no son necesarias para el reconocimiento de la molécula de la invención y estando sustituidas por otras que comunican al anticuerpo propiedades ventajosas adicionales. El anticuerpo puede ser también recombinante, quimérico, humanizado, sintético o una combinación de cualquiera de los anteriores. Un “anticuerpo o polipéptido recombinante” (rAC) es un anticuerpo que ha sido producido en una célula hospedadora transformada o transfectada con el ácido nucleico codificante del anticuerpo frente a la molécula de la invención, o que produce el anticuerpo contra la molécula de la invención como resultado de la recombinación homóloga.

El término “vector de silenciamiento génico” tal como se emplea en esta memoria, se refiere a un plásmido de origen viral (lentiviral, retroviral, o adenoviral), preferentemente lentiviral, que codifica para una o varias secuencias nucleotídicas complementarias del gen *CD44* humano, preferentemente un shRNA, inhibiendo su transcripción. El vector expresa además la proteína verde fluorescente (GFP) como trazador de las células silenciadas. A continuación se citan de manera no limitante los siguientes ejemplos:

- a) shRNA, referido a una horquilla de ARN complementario de una secuencia del RNA de *CD44* humano, que inhibe su transcripción,
- b) siRNA, referido a un ARN pequeño de interferencia complementario de una secuencia del RNA de *CD44* humano que inhibe su transcripción,
- c) microRNA, referido a un ARN de 21-25 nucleótidos capaz de inhibir la expresión de *CD44* humano a nivel post-transcripcional,
- d) ribozimas, referido a moléculas de ARN cuyo plegamiento tridimensional les permite catalizar reacciones de corte de secuencias específicas del ARN mensajero de *CD44* humano, inhibiendo su función, y
- e) aptámeros o señuelos de RNA, referido a secuencias de ARN cuya estructura tridimensional les permite unirse a una proteína e inutilizarla, inhibiendo la expresión de *CD44* humano.

El término "agente bloqueante de ligandos de *CD44*", tal como se emplea en esta memoria, se refiere a todos aquellos agentes que bloquean la interacción de los ligandos de *CD44* con la molécula *CD44* expresada en la superficie de las células leucémicas. Se citan como ejemplos preferentes pero no limitantes:

- a) anticuerpos monoclonales y/o policlonales específicos de ligandos de *CD44*, como por ejemplo la osteopontina; u
- b) oligosacáridos bloqueantes del ligando de *CD44* HA, que compiten con el HA endógeno por su unión a *CD44* y lo desplazan, inhibiendo su función.

El término "prevención", tal como se entiende en la presente invención, consiste en evitar el establecimiento *in vivo* de la T-ALL humana causado tras el injerto de las LICs de la T-ALL en la BM. El término "tratamiento" supone combatir los efectos causados tras el injerto y la expansión de las LICs que inician y mantienen las T-ALLs humanas, para estabilizar el estado de los individuos y prevenir la progresión de la enfermedad.

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

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. La forma oncogénica ICN1 de Notch1 incrementa el injerto en la BM de las HSCs humanas e induce la generación de células T *CD44*^{hi} aberrantes en un modelo de xenotrasplante en ratón. Se aislaron células madre hematopoyéticas (HSCs) humanas de sangre de cordón umbilical (CB) por selección inmunomagnética, eliminando células maduras de diversos linajes (*Lin*⁻) y seleccionando células positivas para el marcador *CD34* (*CD34*⁺). Las células se infectaron con retrovirus portadores de la forma oncogénica ICN1 de Notch1 y GFP (▲) o sólo con GFP como control de la transducción retroviral (○) y se trasplantaron por inyección intrahepática en ratones inmunodeficientes *RAG-2*^{-/-} *x* *γc*^{-/-}, evaluándose su capacidad de reconstitución por citometría de flujo en los órganos indicados. (A) Números absolutos de células humanas transducidas recuperadas de BM, bazo (spleen) y timo (thymus) 9 semanas post-trasplante (identificadas por la expresión de la molécula *CD45*). Los números se corrigieron para un valor de 10⁵ HSCs transducidas trasplantadas/ratón. (B) Análisis por citometría de flujo de las poblaciones de células humanas generadas a partir de los progenitores trasplantados. Se muestran los porcentajes de células humanas de los linajes hematopoyéticos indicados (progenitores *CD34*⁺ *Lin*⁻ células mieloides, células B, células T maduras simples positivas (SP) *CD4*⁺ o *CD8*⁺, o células T inmaduras doble positivas (DP) *CD4*⁺*CD8*⁺), generadas a partir de HSCs GFP⁺ o ICN1⁺ en BM, bazo y sangre periférica (PB) a 9 semanas post-trasplante. (C) Perfiles de expresión de *CD44* en células T humanas DP TCRαβ⁺ GFP⁺ o ICN1⁺ generadas en el timo y la BM de los ratones trasplantados. (D) Porcentajes de células humanas GFP⁺ o ICN1⁺ detectadas en la sangre de los ratones trasplantados a 4-10 semanas post-trasplante. Los porcentajes se normalizaron a un 25% de células iniciales trasplantadas. Los resultados proceden de cuatro experimentos independientes.

Figura 2. Repoblación y fenotipo de ratones trasplantados con HSCs humanas primarias o transducidas con GFP o ICN1. (A) Análisis por citometría de flujo de las poblaciones de células humanas generadas a partir de los progenitores trasplantados. Se muestran los porcentajes de células de los linajes hematopoyéticos señalados recuperados en BM, bazo y PB de ratones trasplantados con HSCs primarias humanas sin manipular, tras 9 semanas post-trasplante. Los resultados mostrados corresponden a 4 experimentos independientes. (B) Perfiles representativos de expresión de los marcadores de membrana *CD4* vs *CD8*, TCRαβ vs *CD3* y *CD19* vs *CD13* en las

células humanas generadas en la BM (panel superior) y timo (panel inferior) de ratones trasplantados con HSCs humanas GFP⁺ o ICN1⁺ a 9 semanas post-trasplante.

Figura 3. La expresión ectópica de ICN1 en progenitores tempranos del timo (ETPs) humano xenotrasplantados en ratón induce su injerto en la médula ósea. Los ETPs se aislaron de timos humanos postnatales por selección inmunomagnética en base a la expresión del marcador CD34 (CD34⁺). Los ETPs se infectaron con retrovirus portadores de ICN1 y GFP o sólo de GFP como control. Las células transducidas se trasplantaron en ratones RAG-2^{-/-} x $\gamma_c^{-/-}$. (A-B) Números absolutos de células humanas GFP⁺ (○) o ICN1⁺ (▲) presentes en BM (A) y timo (B) a distintos tiempos post-trasplante. Los números se normalizaron a un valor de 10⁵ ETPs transducidos y trasplantados/ratón. Los datos proceden de 8-14 experimentos independientes. (C) Análisis por citometría de flujo (FACS) de las células humanas recuperadas de la BM de los animales trasplantados. Se muestran los porcentajes de las poblaciones humanas GFP⁺ y GFP⁺ (panel superior) o ICN1⁺ e ICN1⁺ (panel inferior), identificadas por el marcador leucocitario CD45. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes.

Figura 4. Generación de células T humanas aberrantes CD44hi inducida *in vivo* por la expresión ectópica de ICN1 en progenitores de timo. Se trasplantaron ETPs humanos transducidos con retrovirus portadores de ICN1 y GFP o sólo de GFP en ratones inmunodeficientes RAG-2^{-/-} x $\gamma_c^{-/-}$. (A) Análisis por citometría de flujo de las poblaciones de células humanas generadas a partir de los progenitores trasplantados. Se muestran los perfiles de expresión de los marcadores CD4 vs CD8 y TCR $\alpha\beta$ vs CD3 en células humanas GFP⁺ o ICN1⁺ generadas en la BM (panel izquierdo) y el timo (panel derecho) 4 semanas después del trasplante. (B) Análisis de la clonalidad de las poblaciones aberrantes generadas. Se analizó por PCR el repertorio para regiones TCRV β del TCR en timocitos CD4⁺ CD8⁺ (DP) no transducidos (panel superior) vs células ICN1⁺ DP de BM (panel inferior). Se muestran los resultados de 3 muestras independientes. (C) Análisis por FACS de la expresión de CD44 en células transducidas DP TCR $\alpha\beta$ ⁺ presentes en BM y timo de los ratones trasplantados.

Figura 5. La expresión de CD44 correlaciona con los niveles de expresión del transgen ICN1 en las células humanas trasplantadas. La eficiencia de la expresión del transgen ICN1 en las células humanas transducidas se determinó mediante citometría de flujo, cuantificando la media de intensidad de fluorescencia (MFI) del trazador de la transducción GFP en células procedentes de: (A) timo o BM de ratones trasplantados con ETPs ICN1⁺, y (B) timo, BM, bazo y PB de ratones trasplantados con HSCs humanas GFP⁺ (○) o ICN1⁺ (▲). Los datos corresponden a 13 y 6 experimentos independientes, respectivamente.

Figura 6. La activación de Notch1 regula la expresión de CD44. (A) Expresión de CD44, determinada mediante citometría de flujo como media de la intensidad de fluorescencia (MFI), en poblaciones humanas progenitoras de linfocitos T (CD4ISP), células pre-T (preTCR⁺) y células T inmaduras DP TCR $\alpha\beta$ ⁺ generadas en el timo y la BM de ratones trasplantados con ETPs. (B-C) Expresión relativa de CD44 en: (B) ETPs GFP⁺ o ICN1⁺ 36 horas después de la transducción retroviral, o (C) células de la línea celular T-ALL SupT1 transducidas con un vector control (GFP⁺), con ICN1 (ICN1⁺) o con un inactivador de Notch (dnMAML1⁺). Los resultados se normalizaron respecto a la MFI de CD44 en: (B) ETPs antes de la transducción, o (C) células SupT1 control transducidas con GFP. Los datos representan la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) de: (A) 3-9, (B) 3 y (C) 3-4 experimentos independientes. (D-F) Expresión relativa de los genes *CD44*, *Hes1*, y *IL2RG* determinada por PCR cuantitativa a tiempo real y normalizada para *GAPDH*. Los datos corresponden a: (D) ETPs GFP⁺ o ICN1⁺ a 36 horas post-transducción, (E) células SupT1 GFP⁺, ICN1⁺ o dnMAML1⁺, (F) timocitos humanos DP control o células ICN1⁺ DP de BM procedentes de ratones trasplantados con ETPs. Los valores corresponden a la media $\pm$ SEM de triplicados procedentes de al menos 3 muestras independientes.

Figura 7. ICN1 induce la expresión de CD44 *in vitro* e *in vivo*. (A) MFI de CD44, determinada por FACS, en células T CD4ISP, preTCR y DP TCR $\alpha\beta$ ⁺ y linfocitos B generados en timo y BM de ratones trasplantados con HSCs humanas transducidas con GFP o ICN1. Se muestra la media $\pm$ SEM de 3-5 muestras independientes. (B-C) Expresión relativa de CD44 en la línea celular T CUTLL1 transducida con: (B) GFP, ICN1 o dnMAML1, o con: (C) GFP o ICN1 tratadas con un inhibidor de Notch (GSI) o DMSO como control durante los periodos indicados. Los datos se normalizaron respecto a la MFI de CD44 en células CUTLL1 transducidas con GFP (B), o transducidas con GFP y tratadas con DMSO (C). Los resultados mostrados corresponden a la media $\pm$ SEM de al menos 3 experimentos independientes.

Figura 8. Notch1 regula la transcripción de CD44 dependiente del complejo CSL/MAML. (A) Representación esquemática de los 4 posibles sitios de unión del factor de transcripción CSL identificados en la región 5' del gen *CD44* humano. Los números indican la distancia en pb respecto al sitio de inicio de la transcripción (+1). (B-C) La actividad transcripcional se determinó mediante ensayos de inducción de luciferasa en células T SupT1 transfectadas con el vector trazador pGL3-luciferasa vacío (pGL3) o en el que se clonaron: (B) los 4 posibles sitios CSL mostrados en A (s1+2+3+4) o (C) secuencias que incluyen combinaciones de 2 sitios CSL originales o mutados (*mut*). Todas las muestras se co-transdujeron con vectores retrovirales que codifican para GFP (control), ICN1 (Notch1 activo) y/o dnMAML1 (inhibidor de la activación de Notch). Los datos representan la inducción de la actividad de la luciferasa respecto a los controles que incluyen: (B) el vector pGL3-luciferasa vacío + retrovirus-GFP,

o (C) el vector pGL3-luciferas con cada una de las combinaciones CSL+ retrovirus-GFP. (D) La unión de ICN1 a los sitios CSL identificados se analizó en ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). Se utilizaron anticuerpos anti-Notch1 o inmunoglobulinas control (ctrl Igs) para precipitar el DNA de las líneas celulares T-ALL CUTTL1, SupT1 and HPB-ALL. Los resultados se normalizaron respecto a la muestra de partida y al inmunoprecipitado obtenido con la Ig control. Las barras en B-D representan la media $\pm$ SEM de al menos 3 experimentos independientes.

Figura 9. Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) de la región reguladora de CD44. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para cada uno de los 4 posibles sitios de unión a CSL en el gen *CD44* o para el sitio de unión a CSL descrito en el gen *C-MYC* como control positivo. Se muestra un ChIP representativo de los datos resumidos en la Figura 8D.

Figura 10. La función de CD44 es esencial, aunque insuficiente, para inducir el injerto aberrante de los ETPs humanos en la BM. Análisis de la implicación de CD44 en la inducción del injerto aberrante en la BM de ETPs humanos transducidos con ICN1. Se representan los números absolutos de células humanas recuperadas a 3 semanas post-trasplante de ratones RAG-2^{-/-} x $\gamma_c^{-/-}$ que fueron: (A) trasplantados con ETPs ICN1⁺ pre-tratados con una IgG1 control (▲) o con un anticuerpo monoclonal (mAb) bloqueante contra CD44 (B) trasplantados con ETPs ICN1⁺ y tratados *in vivo* 3 veces/semana durante 2 semanas con IgG1 control (▲) o con anti-CD44 (△), comenzando el tratamiento 5 días después del trasplante; (C) trasplantados con ETPs transducidos con ICN1 (▲) o con CD44 (◇) y no tratados, a 3 semanas post-trasplante; (D) trasplantados con ETPs co-transducidos con retrovirus portadores de ICN1 y el marcador Δ NGFR y retrovirus portadores de CD44 y GFP o sólo GFP como control, a diversos tiempos tras el trasplante. Los números se normalizaron a un valor de 10⁵ ETPs transducidos y trasplantados/ratón.

Figure 11. Fenotipo de las leucemias primarias T-ALL humanas utilizadas en el estudio preclínico. Perfiles fenotípicos de expresión de CD4 vs CD8, CD34 vs CD44, CD5 y CD7 en las muestras de BM de pacientes diagnosticados con T-ALL utilizadas en la Figura 12. (A) T-ALL5; (B) T-ALL8.

Figura 12. La administración *in vivo* de mAbs anti-CD44 inhibe el injerto en la BM y la expansión celular y la progresión de leucemias primarias T-ALL humanas. Se trasplantaron células de BM de pacientes diagnosticados de T-ALL en ratones RAG-2^{-/-} x $\gamma_c^{-/-}$ y se evaluó su capacidad de injerto *in vivo* por citometría de flujo. (A y C) Porcentajes de células T-ALL presentes en BM, PB, bazo y timo tras (A) el trasplante de células de la leucemia primaria T-ALL5 previamente tratadas con una IgG1 control o con un mAb contra CD44; (C) el trasplante de células de las leucemias primarias T-ALL5 o T-ALL8, seguido de la administración *in vivo* de IgG1 control o un mAb bloqueante anti-CD44. El esquema del procedimiento experimental empleado para analizar el efecto de la administración *in vivo* de anti-CD44 se muestra en (B). Se trasplantaron por vía intravenosa 0.5-1x10⁶ células leucémicas primarias de BM en ratones irradiados subletalmente. Una semana después del trasplante, se comenzó el tratamiento consistente en la inyección intraperitoneal de 150 μ g de anti-CD44 o de una IgG1 irrelevante 3 veces/semana. (D) El tratamiento con anti-CD44 previene el establecimiento y progresión de la T-ALL *in vivo* y la aparición de esplenomegalia. Fotografía de los bazos extraídos de ratones trasplantados con células T-ALL8 y tratados *in vivo* con IgG1 o con anti-CD44. Los bazos mostrados son parte de los utilizados para calcular los datos representados en C.

EJEMPLOS

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

EJEMPLO 1: La forma oncogénica ICN1 de Notch1 aumenta el injerto en la médula ósea (BM) de las células madre hematopoyéticas (HSCs) humanas y promueve el desarrollo ectópico de células T CD4⁺CD8⁺ doble positivas (DP) CD44^{hi} aberrantes.

Para analizar los eventos tempranos asociados a la generación de células iniciadoras de la leucemia (LICs) T linfoblástica aguda (T-ALL) humana *in vivo*, se analizó el impacto que tiene en progenitores hematopoyéticos humanos la expresión de la forma oncogénica ICN1 de NOTCH1, ya que ICN1 es una forma de Notch1 altamente leucemogénica que se ha descrito que induce la generación de células T aberrantes CD4⁺CD8⁺ doble positivas (DP) cuando se expresa en progenitores HSCs de ratón trasplantados en ratones receptores (Pear *et al.* 1996; Pui *et al.* 1999; Aster *et al.* 2000).

Para analizar el efecto de ICN1 en progenitores humanos, hubo que desarrollar un modelo de xenotrasplante humano/ratón, a partir de ahora "modelo objeto de la invención", que constituye una modificación del modelo de trasplante de ratón previamente descrito (Pear *et al.* 1996). En este modelo objeto de la invención, las células

trasplantadas en el ratón eran células humanas, lo que permitió analizar de forma directa el efecto de la sobreexpresión de ICN1 sobre el desarrollo *in vivo* de los progenitores humanos.

Las etapas de establecimiento del modelo de xenotrasplante humano/ratón objeto de la invención se resumen seguidamente:

i) células madre hematopoyéticas (HSCs) humanas Lin⁻ (Linaje⁻) CD34⁺ de sangre de cordón umbilical (CB) se infectaron con un vector retroviral que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP) como marcador y para el oncogén ICN1, que se había usado previamente para progenitores de ratón (Pear *et al.*, 1996);

ii) las HSCs transducidas (10⁵) se trasplantaron por inyección intrahepática (ih) en ratones inmunodeficientes RAG-2^{-/-} x γ c^{-/-} neonatos (1-6 días) irradiados subletalmente (1.5Gy), tal como se describió originalmente para células humanas no manipuladas (Weijer *et al.* 2002). Los ratones inmunodeficientes RAG-2^{-/-} x γ c^{-/-} no son capaces de rechazar a las células humanas, por lo que constituyen el huésped idóneo para analizar el injerto de células progenitoras humanas *in vivo* y

iii) se analizó la reconstitución de las células humanas *in vivo* mediante análisis por citometría de flujo.

Las HSCs del paso ii) son un modelo de células pre-leucémicas T-ALL humanas en ratón. En concreto, son células T humanas aberrantes con fenotipo pre-leucémico CD4⁺CD8⁺ doble positivo (DP) con altos niveles de expresión de CD44 (CD44^{hi}), en la BM de ratones RAG-2^{-/-} x γ c^{-/-} xenotrasplantados con progenitores hematopoyéticos humanos (de sangre de cordón umbilical o de timo neonatal) transducidos con la forma oncogénica ICN1 de Notch1.

El desarrollo del modelo de xenotrasplante humano/ratón objeto de la invención, permitió observar que la expresión de ICN1 aumentaba significativamente (hasta 25 veces) el injerto de las HSCs humanas en la BM, en comparación con las HSCs control transducidas sólo con GFP (Figura 1A). Este incremento era específico de la BM, ya que no se detectaron diferencias significativas en la eficiencia de reconstitución del bazo (Spleen ó Spl) ni del timo (Thymus ó Thy) entre células ICN1⁺ y GFP⁺ (Figura 1A). El análisis de la BM indicó que ICN1 promovía la generación ectópica en la BM de células T con un fenotipo mayoritario de células tímicas CD4⁺ CD8⁺ doble positivas (DP) que expresan el receptor TCR-CD3 (TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD3⁺) (Figuras 1B y 2), pero que mantienen de forma aberrante altos niveles de expresión de la molécula de adhesión CD44 que se pierde en los timocitos DP normales (Figura 1C). Este fenotipo coincidía con el fenotipo aberrante DP CD44^{hi} descrito en el modelo de ratón para las células pre-leucémicas ICN1⁺ que se generan en la BM y migran a la periferia para generar una leucemia T-ALL (Pear *et al.* 1996; Pui *et al.* 1999; Aster *et al.* 2000; Kindler *et al.* 2008). Por tanto, las células equivalentes humanas generadas en los ratones trasplantados se denominarán de aquí en adelante “células aberrantes DP CD44^{hi}” o células pre-leucémicas objeto de la presente invención”.

En contra de los resultados obtenidos en ratón (Pear *et al.* 1996), en el modelo de xenotrasplante humano objeto de la presente invención, el fenotipo aberrante DP CD44^{hi} de las células ICN1⁺ humanas se restringió a la BM, no encontrándose estas células en ningún otro órgano (Figuras 1B, 1C y 8). De hecho, la reconstitución de células humanas ICN1⁺ en sangre periférica (PB) fue transitoria y mostró una cinética similar a la de las células control GFP⁺ (Figura 1D). Estos datos indican que las células T aberrantes humanas desaparecen de los ratones xenotrasplantados sin llegar a generar una leucemia T-ALL evidente. En efecto, no se identificaron blastos leucémicos DP CD44^{hi} en PB en cinéticas largas, hasta 17 semanas post-trasplante, y los injertos ICN1⁺ de la BM fueron incapaces de inducir leucemia en trasplantes secundarios (Tabla 1).

Tabla. 1. Injerto en ratones inmunodeficientes sometidos a trasplantes secundarios con células T humanas ICN1⁺. Se aislaron células humanas generadas en la BM de ratones RAG-2^{-/-} x γ c^{-/-} trasplantados 9 semanas antes con HSCs de CB transducidas con GFP (GFP⁺) o ICN1+GFP (ICN1⁺) y se implantaron en nuevos ratones receptores para evaluar su potencial de repoblación y/o de generación de leucemia.

1 ^{er} trasplante		2 ^o trasplante			
Células transferidas	Nº de ratones receptores	Nº de células trasplantadas/ratón	Semanas tras trasplante	Órgano analizado	Nº de ratones con injerto humano
HSCs GFP ⁺	7	2.1x10 ⁵	4-8	PB/BM	0/9
HSCs ICN1 ⁺	6	2.6x10 ⁵	4-8	PB/BM	0/9

En conjunto, estos resultados indican que ICN1 proporciona señales a las HSCs humanas capaces de inducir su diferenciación ectópica en la BM en células T pre-leucémicas con un fenotipo aberrante DP CD44^{hi}; aunque ICN1 es insuficiente para generar una leucemia T-ALL humana en el ratón durante el periodo analizado.

Este mismo patrón de reconstitución con células T aberrantes pre-leucémicas se había observado previamente en los modelos de alotrasplante de ratón en los que las HSCs se transducen con una forma mutada débil de NOTCH1 que sólo genera leucemia en cooperación con otras mutaciones (Chiang M.Y. *et al.* 2006; Chiang M.Y. *et al.*

2008). Por tanto, el modelo de xenotrasplante objeto de la presente invención, constituye el primer modelo disponible de generación *in vivo* de células T humanas de fenotipo aberrante pre-leucémico.

La generación de células aberrantes humanas inducidas por ICN1 representa una herramienta única para el estudio de las alteraciones moleculares tempranas que se asocian a la generación de LICs en la T-ALL, cuya secuencia de aparición no es posible analizar a tiempo real en los pacientes en el momento del diagnóstico, cuando ya se ha establecido la leucemia.

EJEMPLO 2: ICN1 reprograma a los progenitores tempranos residentes en el timo humano (ETPs) induciendo su injerto en la BM y promueve la generación ectópica de células T humanas DP CD44^{hi} aberrantes.

Se ha sugerido que la T-ALL se origina por la transformación oncogénica de las células T durante su desarrollo en el timo. Por ello, los precursores intratímicos de los linfocitos T constituirían la célula diana de los eventos tempranos que darían lugar a la leucemogénesis de células T inducida por isoformas oncogénicas de NOTCH1 (Pui C.H. *et al.* 2004; Hagenbeek T.J. *et al.* 2008). Para confirmar esta hipótesis en humanos, se utilizó el modelo de xenotrasplante descrito en el ejemplo 1 y se analizó el impacto que ejerce *in vivo* la expresión de la forma pro-oncogénica ICN1 en los precursores tempranos del timo (ETPs) humano que ya han perdido el potencial de injertar la BM *in vivo* (Márquez C. *et al.* 1995). Se observó que los ETPs del grupo control, transducidos con GFP, no eran capaces de injertar la BM de los ratones trasplantados, pero repoblaron significativamente el timo (Figuras 3A y 3B).

Por el contrario, la expresión ectópica de ICN1 dio lugar a un eficiente injerto de los ETPs humanos en la BM de los ratones trasplantados, sin modificar significativamente la reconstitución del timo (Figura 3A y 3B). Como se muestra en la Figura 3C, ya a 4 horas post-trasplante eran detectables bajas proporciones de células ICN1⁺ y control (GFP⁺ o no transducidas) en la BM de los ratones xenotrasplantados, que repoblaron la BM con cinéticas similares durante la primera semana. Posteriormente, las células control se redujeron hasta ser básicamente indetectables, mientras que la población ICN1⁺ aumentó de forma progresiva (hasta 1000 veces) durante las primeras 3-4 semanas y se mantuvo estable en la BM hasta 7 semanas post-trasplante (Figura 3A). Estos datos indican que la señalización por ICN1 no afecta a la migración inicial de los ETPs humanos a la BM, ni a su entrada en la BM, sino que favorece su proliferación, expansión y retención en ese microambiente específico. Por lo tanto, la mutación ICN1 no sólo incrementa la reconstitución *in vivo* de la BM con células humanas que tienen capacidad intrínseca de injertar la BM, como son las HSCs de CB, sino que también reprograma a los precursores intratímicos ETPs que han perdido este potencial, y promueve su injerto eficiente en la BM.

Como se observó con las HSCs, los ETP transducidos con ICN1 se diferenciaron extratímicamente en la BM, generando células T con un fenotipo aberrante DP TCRαβ⁺ CD3⁺ (Figura 4A), que no se diseminaron por la periferia, ni generaron T-ALL en un período de 15 semanas (datos no mostrados). Conforme a la ausencia de transformación oncogénica, las células humanas ICN1⁺ DP de la BM presentaban un repertorio policlonal de TCRβ indistinguible del de timocitos DP control (Figura 4B). Sin embargo, estas células presentaron el fenotipo pre-leucémico aberrante, caracterizado por altos niveles de CD44, observado en las células derivadas de HSCs ICN1⁺. La expresión de CD44 correlacionaba con los niveles de expresión del transgen ICN1, que eran significativamente más altos (hasta un 40% mayor) en las células ICN1⁺ DP de BM derivadas de ETPs (Figura 3A y 5A) o de HSCs (Figura 5B). Además, la expresión de CD44 fue siempre más elevada en las células ICN1⁺ de la BM que en las poblaciones ICN1⁺ de timo, bazo o PB. (Figura 5B). Por lo tanto, el injerto selectivo en la BM de células ICN1⁺ DP aberrantes, derivadas tanto de ETPs como de HSCs, muestra una correlación directa entre los niveles de expresión de CD44 e ICN1, lo que sugiere un papel específico de la señalización por Notch1 y CD44 en el proceso de injerto en la BM.

En conjunto, estos resultados demuestran la eficiencia de la forma pro-oncogénica ICN1 de NOTCH1 en la generación ectópica de células T con un fenotipo pre-leucémico aberrante DP CD44^{hi} a partir tanto de HSCs como de ETPs humanos, y sugieren la implicación funcional de CD44 en el proceso.

EJEMPLO 3: ICN1 regula la transcripción de CD44 dependiente del complejo CSL/MAML.

Se investigaron los mecanismos moleculares subyacentes a la generación ectópica de células T y al injerto en la BM inducidos por ICN1. Para ello, el estudio se centró en CD44, debido a su elevada expresión en las células ICN1⁺ DP aberrantes que repueblan la BM, así como a su reportada función como molécula mediadora del injerto de las HSCs convencionales y de las células madre o iniciadoras de leucemias mieloides en la BM (Avigdor A. *et al.* 2004; Jin L. *et al.* 2006). Se confirmó la expresión aberrante de CD44 en todas las células ICN1⁺ del linaje T que repoblaron la BM *in vivo*, independientemente de su origen (ETPs o HSCs) y estadio de diferenciación, incluyendo no sólo la población mayoritaria DP TCRαβ⁺, sino también sus precursores pre-TCR⁺ y CD4⁺ inmaduros simples positivos (CD4ISP). Por el contrario, todas las poblaciones ICN1⁺ que se diferenciaron en el timo presentaron niveles de CD44 convencionales (Figuras 6A y 7A).

La correlación observada entre la expresión de CD44 e ICN1 podría indicar que CD44 se regula por la activación de Notch1. Conforme a esta posibilidad, se observó que los ETPs humanos transducidos con ICN1 mantenían mayores niveles de expresión de CD44 *in vitro* que los ETPs GFP⁺ control (Figura 6B). Además, ICN1 indujo a nivel clonal el aumento de la expresión de CD44 endógeno que expresan las líneas T SupT1 y CUTLL1, mientras que la inhibición

de Notch mediada por: i) una forma dominante negativa del coactivador MAML1 (dnMAML1) o, ii) el tratamiento con un inhibidor de gamma-secretasas (GSI), disminuyó la expresión de CD44, efecto que pudo ser rescatado por la expresión ectópica de ICN1 (Figuras 6C, 7B y 7C). Colectivamente, estos resultados demuestran que la activación de Notch1 permite mantener una mayor expresión de CD44 en timocitos primarios e incrementa los niveles de expresión endógena en líneas celulares T-ALL.

Para averiguar si ICN1 es capaz de regular la expresión de CD44 a nivel transcripcional, se realizaron estudios cuantitativos de expresión génica. Se observó que tanto los ETPs primarios, como las líneas celulares T-ALL, transducidos con ICN1 mostraban niveles transcripcionales de *CD44* mayores que las correspondientes células GFP⁺ control. Por el contrario, la inhibición de la señalización de Notch1 mediada por dnMAML1 redujo la expresión de *CD44* (Figura 6D y 6E), cuyo patrón transcripcional era idéntico al del gen diana de NOTCH1 *HES1*, pero distinto del correspondiente al gen irrelevante *IL2RG* (Figuras 6D y 6E). Además, se confirmó a nivel cuantitativo la expresión *in vivo* del gen *CD44* era mayor en células ICN1⁺ DP aberrantes de la BM que en timocitos DP convencionales (Figura 6F).

Considerando estos datos, se analizó la posibilidad de una regulación transcripcional directa del gen *CD44* por NOTCH1, dependiente de su unión al factor de transcripción CSL. Se identificaron 4 posibles sitios de unión de CSL en la región 5' del gen *CD44*, concretamente a -4.7, -4.4, -3.8 y -3.5 kb del sitio de inicio de la transcripción (Figura 8A). Para determinar la capacidad de activación transcripcional de estas secuencias, se utilizó la línea celular T-ALL SupT1 transducida con un vector trazador portador de luciferasa, en el que se clonó el fragmento -4.8 a -3.5 Kb del gen *CD44*. En estos ensayos, ICN1 indujo la expresión de luciferasa, que era suprimida específicamente por dnMAML1 (Figura 8B), demostrando la funcionalidad de los sitios de unión a CSL en *CD44*. Además, la mutagénesis individual de los sitios de unión a CSL indicados en SEQ ID No. 1, mostró que cada uno de ellos poseía actividad transcripcional (Figura 8C). Finalmente, la utilización de ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) en las líneas T-ALL SupT1, CUTLL1 y HPB-ALL, demostró que la forma endógena de Notch1 activo era capaz de unirse *in vivo* a todos los motivos CSL de la región reguladora de *CD44* (Figuras 8D y 9).

En conjunto, estos resultados demuestran que *CD44* es una diana transcripcional de NOTCH1 dependiente del complejo CSL/ MAML. Por tanto, en la presente invención se identifica a CD44 como una diana transcripcional de Notch1 en progenitores hematopoyéticos humanos.

EJEMPLO 4: CD44 es esencial para promover el injerto de linfocitos T humanos aberrantes DP CD44^{hi} inducidos por ICN1 en la BM.

Considerando que la expresión aberrante de CD44 inducida por ICN1 se limita a las células T que colonizan la BM, se procedió a estudiar la contribución de CD44 en la reprogramación de los ETPs para su injerto en la BM. Con esta finalidad, se pensó en una estrategia de bloqueo de la función de CD44. Para ello, los ETPs transducidos con ICN1 se trataron *in vitro* con un anticuerpo monoclonal (mAb) bloqueante de ratón contra CD44 humano disponible comercialmente (clon 515; BD Biosciences, Kansas *et al.*, 1990) y su capacidad de injertar *in vivo* se analizó en el modelo de xenotrasplante en ratones RAG-2^{-/-} x γ c^{-/-}. Este tratamiento dio lugar a un bloqueo completo de la repoblación de la BM por células ICN1⁺, mientras que el pre-tratamiento con un mAb control no tuvo ningún efecto (Figura 10A). Datos similares se pueden obtener mediante una estrategia de silenciamiento de CD44, utilizando células transducidas con vectores lentivirales portadores de shRNA frente a CD44. Además, la administración *in vivo* de un mAb anti-CD44 (clon HP2/9; de la Hera *et al.* 1989; Liao *et al.* 1995) en ratones trasplantados 7 días antes con los ETPs ICN1⁺ humanos reducía notable y específicamente la repoblación de la BM (Figura 10B), lo que revela la posibilidad de manipular *in vivo* el injerto en la BM de las células T aberrantes mediante el bloqueo de CD44. Por tanto, la interacción con el nicho de la BM mediada por CD44 es necesaria para permitir el injerto de los linfocitos T pre-leucémicos aberrantes inducidos por ICN1 a partir de los ETPs humanos y esa interacción puede bloquearse mediante el tratamiento *in vivo* con un mAb anti-CD44. Sin embargo, la expresión ectópica de CD44 no es suficiente para inducir el injerto de los ETPs en ausencia de ICN1 (Figura 10C), sino que se requiere la cooperación de Notch1 y CD44, ya que la expresión ectópica combinada de CD44 e ICN1 aumentó y prolongó de forma significativa la capacidad de los ETPs de reconstituir la BM en los ratones trasplantados (Figura 10D).

En su conjunto, estos resultados demuestran que el bloqueo de las interacciones mediadas por CD44 mediante el uso de un agente inhibidor de la función de CD44, constituye una terapia eficiente para impedir el injerto en la BM de los linfocitos T pre-leucémicos aberrantes inducidos por ICN1 y, por tanto, la generación de T-ALL.

EJEMPLO 5: El bloqueo de la función de CD44 mediante el uso de un agente inhibidor, impide el injerto en la BM, la expansión oncogénica y la progresión *in vivo* de T-ALL humanas primarias: evidencia preclínica de una nueva estrategia terapéutica contra la T-ALL.

El hallazgo de que ICN1 induce la expresión de CD44 y regula la interacción de las células T humanas aberrantes con el microambiente de la BM es especialmente relevante, ya que el incremento de la expresión de CD44 no sólo se ha descrito en células T pre-leucémicas en modelos de ratón (Kindler *et al.* 2008), sino que también se ha observado en las LICs de diversas leucemias humanas que incluyen la leucemia mieloide aguda (AML) y la leucemia mieloide crónica (CML) (Jin *et al.* 2006; Krause *et al.*, 2006; Liu and Jiang, 2006; Hertweck *et al.* 2011).

Considerando estos datos, analizamos si las interacciones mediadas por CD44 también podrían participar en el injerto *in vivo* en la BM de leucemias T-ALL humanas primarias. Para ello, se utilizó el modelo de xenotrasplante de las leucemias T-ALL primarias en ratones inmunodeficientes RAG-2^{-/-} x γ C^{-/-}. En primer lugar, se analizaron células de BM o PB procedentes de pacientes no tratados diagnosticados con T-ALL y se confirmó la expresión *in vivo* de CD44 en estas leucemias (Figura 11). A continuación las leucemias se trataron con un mAb bloqueante contra CD44 humano (clon 515; BD Biosciences; Kansas et al., 1990) y se analizó el efecto del tratamiento sobre su capacidad de injerto y progresión *in vivo* tras su trasplante en ratones inmunodeficientes RAG-2^{-/-} x γ C^{-/-}. El análisis por citometría de flujo a diversos tiempos post-trasplante mostró que el pre-tratamiento con un agente inhibidor de la función de CD44, como un mAb anti-CD44, impedía tanto el injerto de la T-ALL en la BM como la expansión de las células leucémicas en timo, bazo y PB de los ratones trasplantados (Figura 12A). Datos similares se pueden obtener con células leucémicas transducidas con vectores lentivirales portadores de shRNA frente a CD44.

Por tanto, las células iniciadoras de la T-ALL parecen requerir la interacción de CD44 con el nicho adecuado en la BM para mantener sus propiedades leucemogénicas y promover su expansión *in vivo*.

Para valorar la relevancia clínica de estos resultados, se analizó el efecto del tratamiento *in vivo* por administración intraperitoneal de un mAb bloqueante anti-CD44 (clon HP2/9; de la Hera et al. 1989; Liao et al. 1995) en ratones inmunodeficientes RAG-2^{-/-} x γ C^{-/-} que habían sido trasplantados con leucemias T-ALL primarias humanas 7 días antes del inicio del tratamiento. Este tratamiento disminuyó notablemente la carga leucémica total en BM, bazo, timo y PB de los ratones trasplantados a lo largo de 6 semanas (Figura 12B), en comparación con animales tratados con un mAb irrelevante del mismo isotipo (Figura 12C). Como consecuencia, el tratamiento con un agente inhibidor de la función de CD44, como un mAb anti-CD44, inhibió el desarrollo y progresión de la T-ALL en el bazo, impidiendo la aparición de esplenomegalia que se observa en los ratones control (Figura 12D). Estos resultados demuestran que el bloqueo de la función de CD44 inhibe con una gran eficiencia tanto el mantenimiento como la progresión de las leucemias humanas T-ALL *in vivo*. Por tanto, CD44 y su ligando, el ácido hialurónico, constituyen nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de la T-ALL.

BIBLIOGRAFÍA

- 5 Aifantis I, Raetz E, Buonamici S. 2008. Molecular pathogenesis of T-cell leukaemia and lymphoma. *Nat Rev Immunol.* 8:380-390.
- Artavanis-Tsakonas, S, Rand, MD, Lake, RJ. 1999. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284:770-776.
- 10 Aster JC, Xu L, Karnell FG, Patriub V, Pui JC, Pear WS. 2000. Essential roles for ankyrin repeat and transactivation domains in induction of T-cell leukemia by Notch1. *Mol Cell Biol.* 20:7505-15.
- 15 Avigdor A, Goichberg P, Shvitiel S, Dar A, Peled A, Samira S, Kollet O, Hershkovich R, Alon R, Hardan I, Ben-Hur H, Naor D, Nagler A, Lapidot T. 2004. CD44 and hyaluronic acid cooperate with SDF-1 in the trafficking of human CD34+ stem/progenitor cells to bone marrow. *Blood.* 103:2981-9.
- 20 Buggins AG, Levi A, Gohil S, Fishlock K, Patten PE, Calle Y, Yallop D, Devereux S.2011. Evidence for a macromolecular complex in poor prognosis CLL that contains CD38, CD49d, CD44 and MMP-9. *Br J Haematol*,154:216-22.
- 25 Chiang MY, Xu ML, Histen G, Shestova O, Roy M, Nam Y, Blacklow SC, Sacks DB, Pear WS, Aster JC. 2006. Identification of a conserved negative regulatory sequence that influences the leukemogenic activity of NOTCH1. *Mol Cell Biol.* 26:6261-71.
- 30 Chiang MY, Xu L, Shestova O, Histen G, L'heureux S, Romany C, Childs ME, Gimotty PA, Aster JC, Pear WS. 2008. Leukemia-associated NOTCH1 alleles are weak tumor initiators but accelerate K-ras-initiated leukemia. *J Clin Invest.* 118:3181-94.
- 35 Coustan-Smith E, Song G, Clark C, Key L, Liu P, Mehrpooya M, Stow P, Su X, Shurtleff S, Pui CH, Downing JR, Campana D. 2011. New markers for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood,* 117:6267-76.
- de la Hera A, Acevedo A, Marston W, Sanchez-Madrid F. 1989. Function of CD44 (Pgp-1) homing receptor in human T cell precursors. *Int Immunol.* 1:598-604.
- 40 Giannopoulos K, Mertens D, Bühler A, Barth TF, Idler I, Möller P, Kröber A, Greiner J, Chocholska S, Dmoszyńska A, Roliński J, Döhner H, Stilgenbauer S, Schmitt M. 2009. The candidate immunotherapeutic target, the receptor for hyaluronic acid-mediated motility, is associated with proliferation and shows prognostic value in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia,* 23: 519-27.
- 45 Hagenbeek TJ, Spits H. 2008. T-cell lymphomas in T-cell-specific Pten-deficient mice originate in the thymus. *Leukemia.* 22:608-19.
- Herishanu Y, Gibellini F, Njuguna N, Hazan-Halevy I, Farooqui M, Bern S, Keyvanfar K, Lee E, Wilson W, Wiestner A. Activation of CD44, a receptor for extracellular matrix components, protects chronic lymphocytic leukemia cells from spontaneous and drug induced apoptosis through MCL-1. *Leuk Lymphoma,* 52:1758-69.
- Hertweck MK, Erdfelder F, Kreuzer KA. 2011. CD44 in hematological neoplasias. *Ann Hematol.* 90:493-508.
- 50 Jin L, Hope KJ, Zhai Q, Smadja-Joffe F, Dick JE. 2006. Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nat Med.* 12:1167-74.
- 55 Kansas GS, Muirhead MJ, Dailey MO. 1990. Expression of the CD11/CD18, leukocyte adhesion molecule 1, and CD44 adhesion molecules during normal myeloid and erythroid differentiation in humans. *Blood.* 76:2483-2492.
- Kindler T, Cornejo MG, Scholl C, Liu J, Leeman DS, Haydu JE, Fröhling S, Lee BH, Gilliland DG. 2008. K-RasG12D-induced T-cell lymphoblastic lymphoma/leukemias harbor Notch1 mutations and are sensitive to gamma-secretase inhibitors. *Blood.* 112:3373-82.
- 60 Liao HX, Lee DM, Levesque MC, Haynes BF. 1995. N-terminal and central regions of the human CD44 extracellular domain participate in cell surface hyaluronan binding. *J Immunol.* 155:3938-45.
- 65 Kopan, R, Ilagan, MX. 2009. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* 137:216-233.

-
-
-
-
- 5 Krause DS, Lazarides K, von Andrian UH, Van Etten RA. 2006. Requirement for CD44 in homing and engraftment of BCR-ABL-expressing leukemic stem cells. *Nat Med.* 12:1175-1180.
-
- Liu J, Jiang G. 2006. CD44 and hematologic malignancies. *Cell Mol Immunol.* 3:359-365.
- 5 Márquez C, Trigueros C, Fernández E, Toribio ML. 1995. The development of T and non-T cell lineages from CD34+ human thymic precursors can be traced by the differential expression of CD44. *J Exp Med.* 181:475-83.
-
- 10 Pear WS, Aster JC, Scott ML, Hasserjian RP, Soffer B, Sklar J, Baltimore D. 1996. Exclusive development of T cell neoplasms in mice transplanted with bone marrow expressing activated Notch alleles. *J Exp Med.* 183:2283-91.
-
- Pui JC, Allman D, Xu L, DeRocco S, Karnell FG, Bakkour S, Lee JY, Kadesch T, Hardy RR, Aster JC, Pear WS. 1999. Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity* 11:299-308.
- 15 Pui CH, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. 2004. *N Engl J Med.* 350:1535-48.
-
- Radtke F, Wilson A, Stark G, Bauer M, van Meerwijk J, MacDonald HR, Aguet M. 1999. Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* 10:547-558.
- 20 Weijer K, Uittenbogaart CH, Voordouw A, Couwenberg F, Seppen J, Blom B, Vyth-Dreese FA, Spits H. Intrathymic and extrathymic development of human plasmacytoid dendritic cell precursors in vivo. 2002 *Blood.*99:2752-2759.
-
- 25 Weng, AP, Ferrando, AA, Lee, W, Morris, JP, Silverman, LB, Sanchez-Irizarry, C, Blacklow, SC, Look, T, Aster, JC. 2004. Activating mutations of NOTCH1 in human T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Science* 306: 269-271.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un anticuerpo o un fragmento del mismo, capaz de reconocer específicamente y/o selectivamente la proteína CD44 humana codificada por el gen CD44 con SEQ ID No. 1, donde dicho anticuerpo o fragmento del mismo es inhibidor de la función de dicha proteína CD44, para la preparación de una composición farmacéutica o medicamento útil para la prevención y/o tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda humana.
- 10 2. Uso del anticuerpo o del fragmento del mismo según la reivindicación 1, **caracterizado** por que dicho anticuerpo o fragmento del mismo es capaz de inhibir el injerto y/o la expansión de células humanas iniciadoras de la leucemia linfoblástica aguda humana en la médula ósea de un paciente.
- 15 3. Uso del anticuerpo o del fragmento del mismo según la reivindicación 2, **caracterizado** por que el anticuerpo es monoclonal.
- 20 4. Uso del anticuerpo o del fragmento del mismo según las reivindicaciones 1-3, **caracterizado** por que la leucemia linfoblástica aguda es una leucemia linfoblástica aguda T humana.
- 25 5. Una composición farmacéutica y/o medicamento **caracterizada/o** por comprender al menos un anticuerpo o un fragmento del mismo, capaz de reconocer específicamente y/o selectivamente la proteína CD44 humana codificada por el gen CD44 con SEQ ID No. 1, donde dicho anticuerpo o fragmento del mismo es inhibidor de la función de dicha proteína CD44, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de una leucemia linfoblástica aguda humana.
- 30 6. La composición farmacéutica según la reivindicación 5, **caracterizada** por que dicho anticuerpo o fragmento del mismo es capaz de inhibir el injerto y/o la expansión de células humanas iniciadoras de la leucemia linfoblástica aguda humana en la médula ósea de un paciente.
- 35 7. La composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 5-6, **caracterizada** por que el anticuerpo es monoclonal.
- 40 8. La composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 5-7, **caracterizada** por que comprende además una cantidad terapéuticamente aceptable de al menos un vehículo, un excipiente y/o un aditivo.
- 45 9. La composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 5-8, **caracterizada** por que la leucemia linfoblástica aguda es una leucemia linfoblástica aguda T humana.
- 50 10. Un kit para el tratamiento y/o prevención de la leucemia linfoblástica aguda humana **caracterizado** por comprender al menos un anticuerpo o un fragmento del mismo, capaz de reconocer específicamente y/o selectivamente la proteína CD44 humana codificada por el gen CD44 con SEQ ID No. 1, donde dicho anticuerpo o fragmento del mismo es inhibidor de la función de dicha proteína CD44, o al menos una composición farmacéutica y/o medicamento definida/o en las reivindicaciones 5-9.
- 55 11. Un kit según la reivindicación 10, **caracterizado** por que dicho anticuerpo o fragmento del mismo es capaz de inhibir el injerto y/o la expansión de células humanas iniciadoras de la leucemia linfoblástica aguda humana en la médula ósea de un paciente.
- 60 12. Un kit según una cualquiera de las reivindicaciones 10-11, **caracterizado** por que el anticuerpo es monoclonal.
- 65 13. Un kit según una cualquiera de las reivindicaciones 10-12, **caracterizado** por que la leucemia linfoblástica aguda es una leucemia linfoblástica aguda T humana.

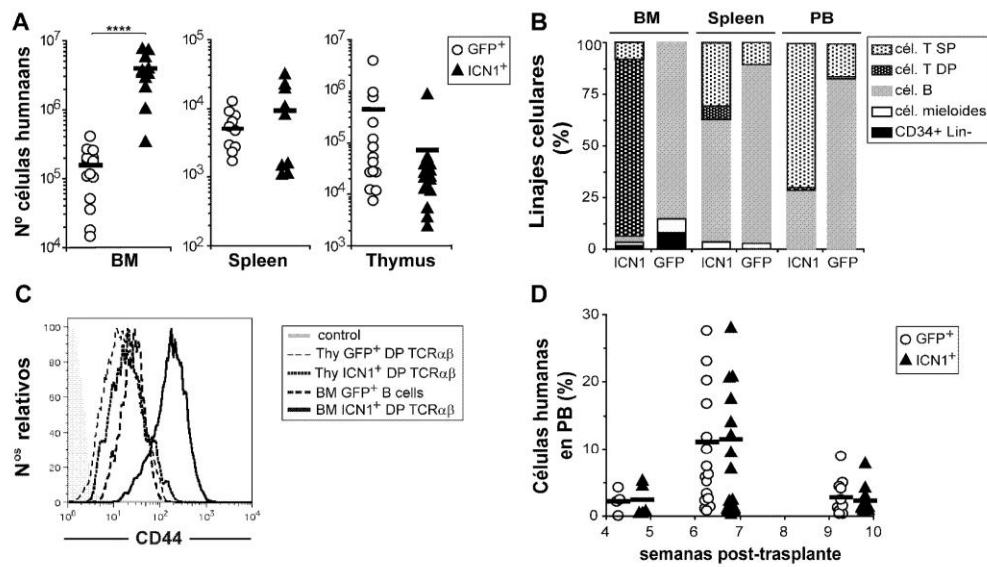


FIGURA 1

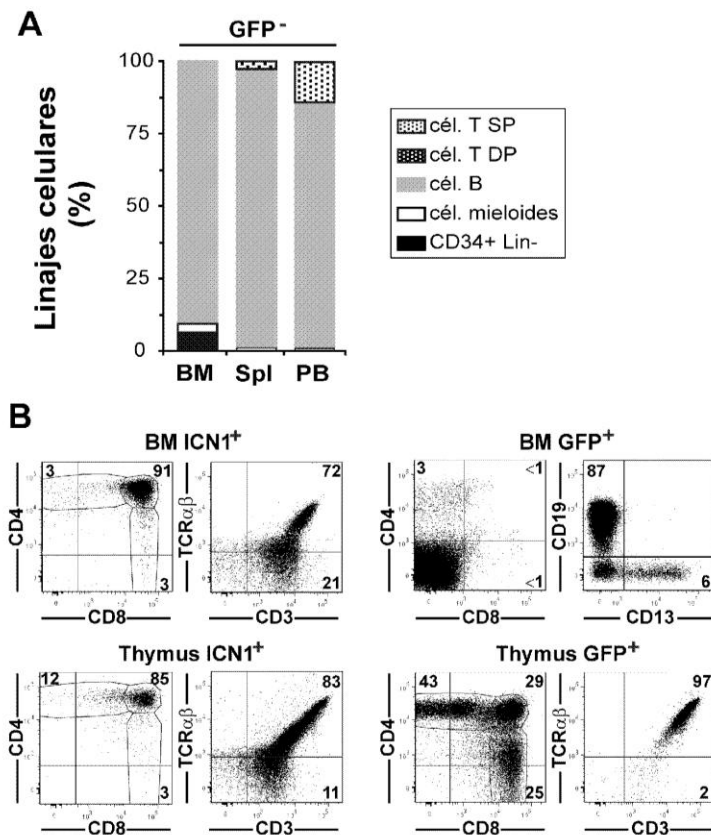


FIGURA 2

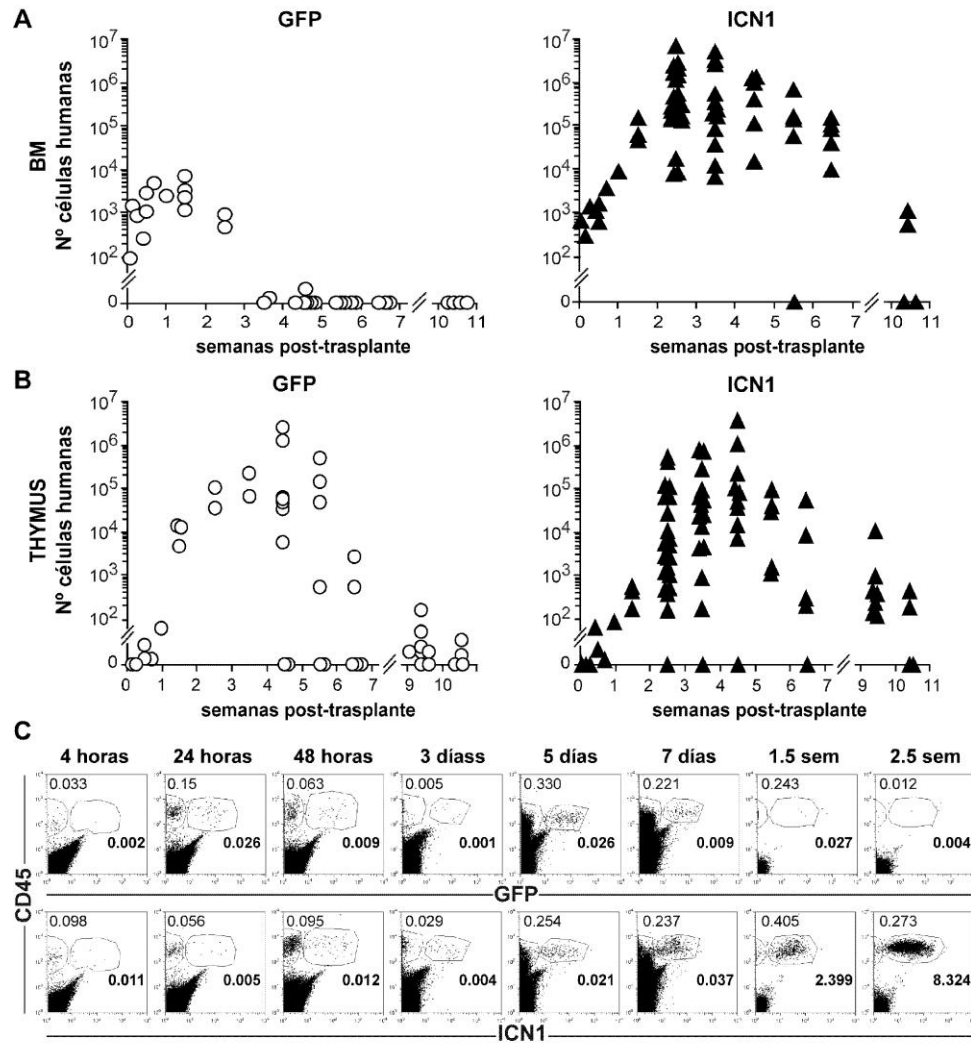


FIGURA 3

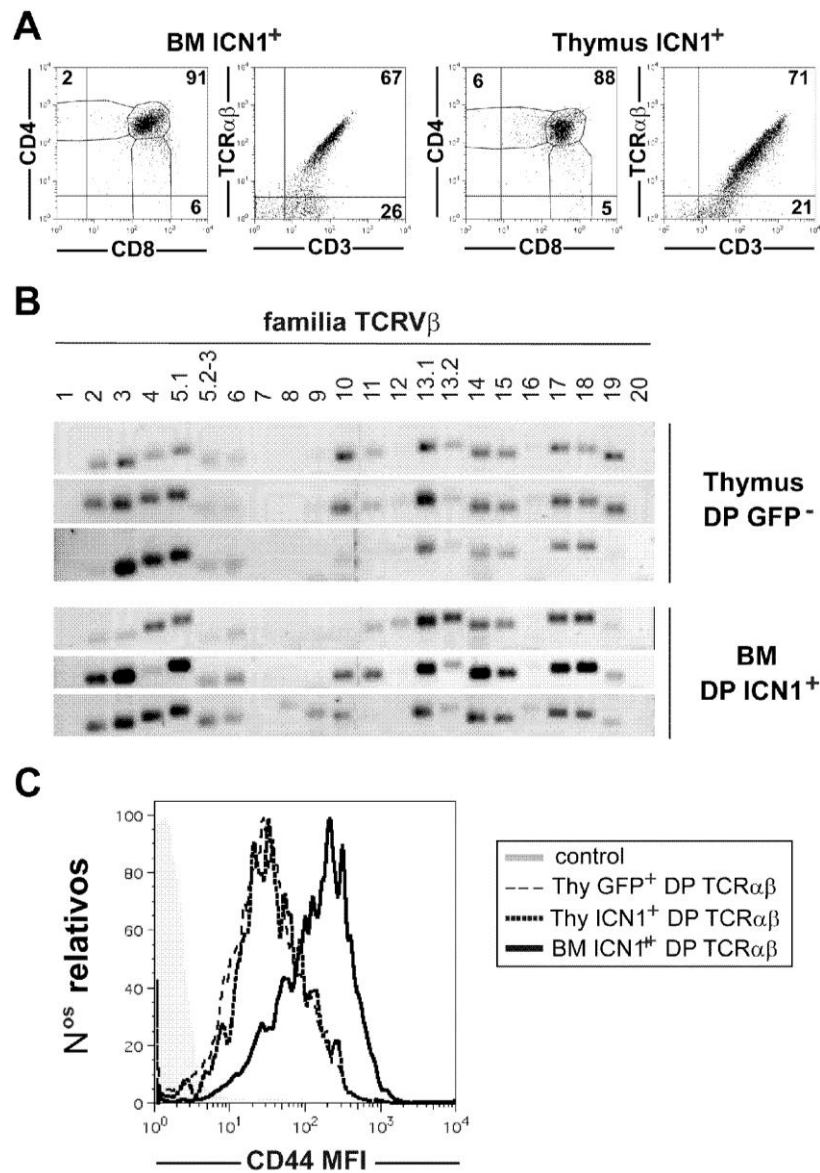


FIGURA 4

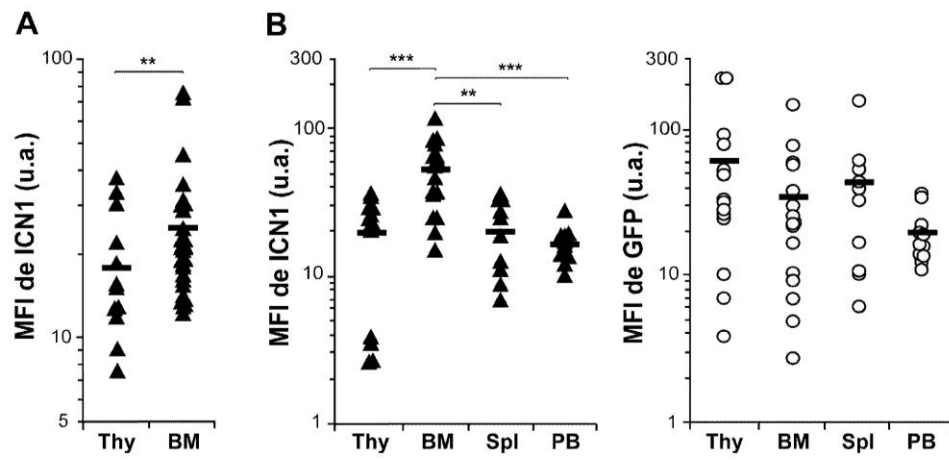


FIGURA 5

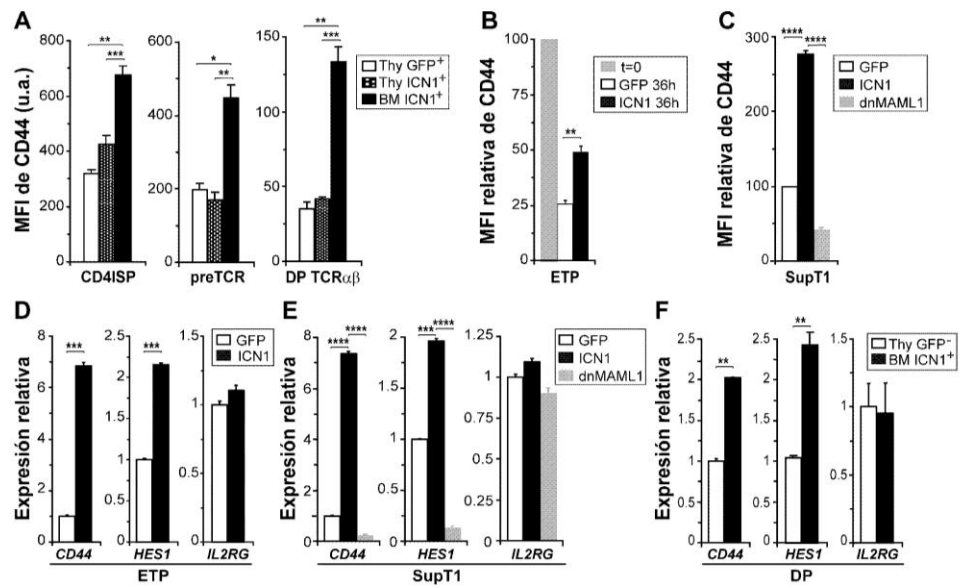


FIGURA 6

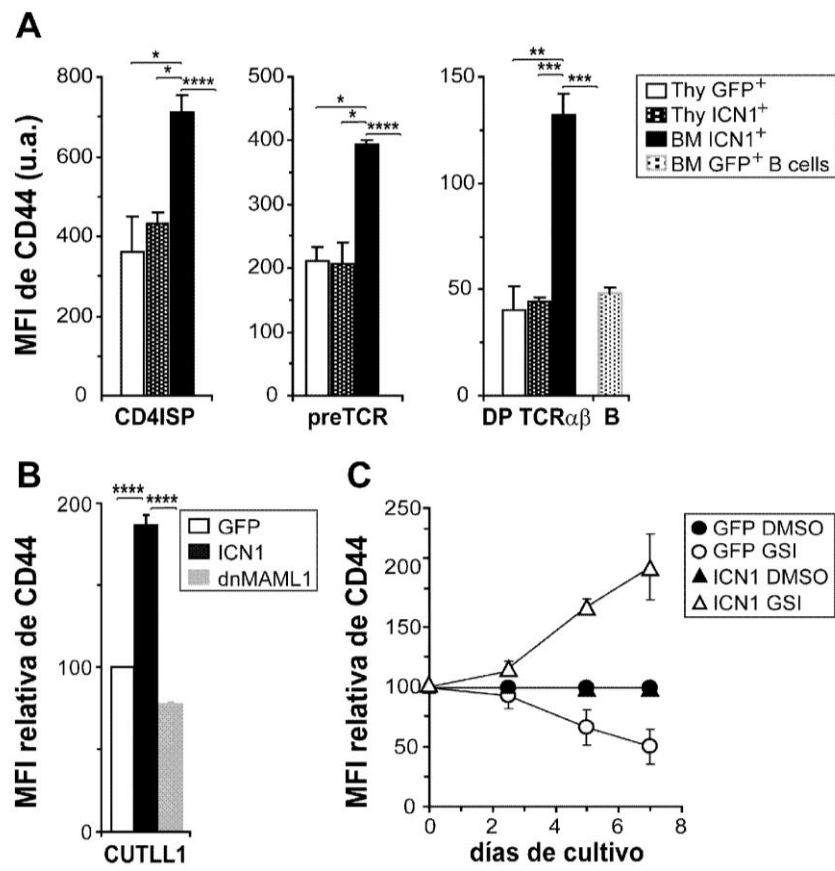


FIGURA 7

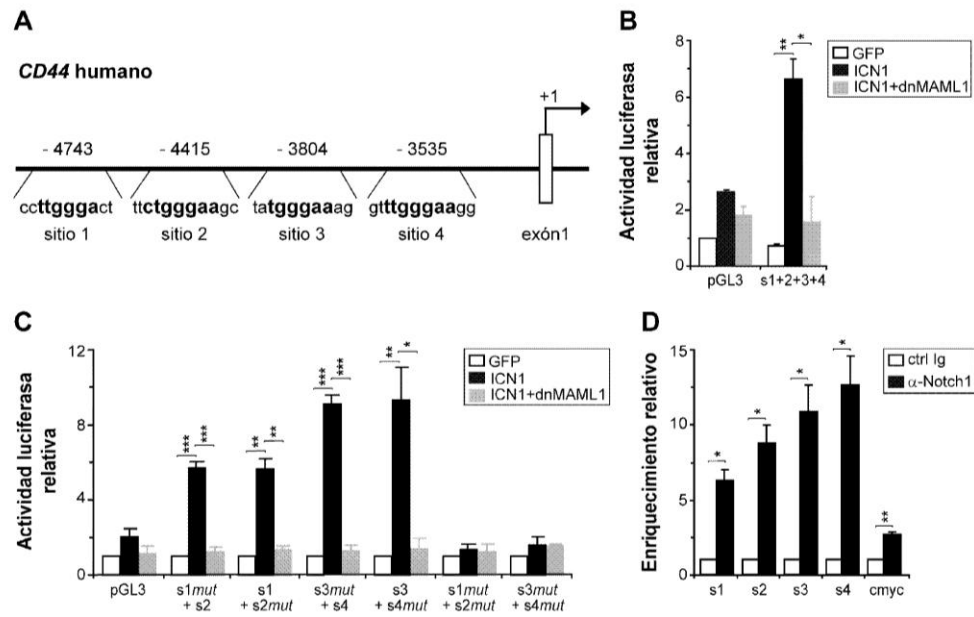


FIGURA 8

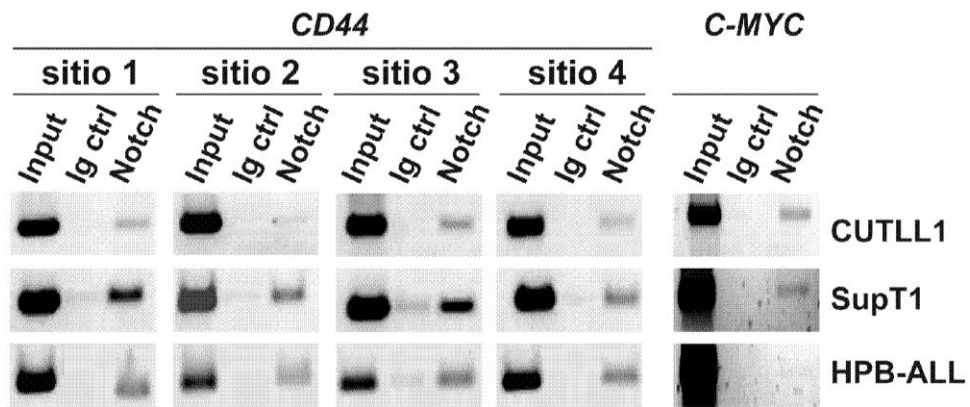


FIGURA 9

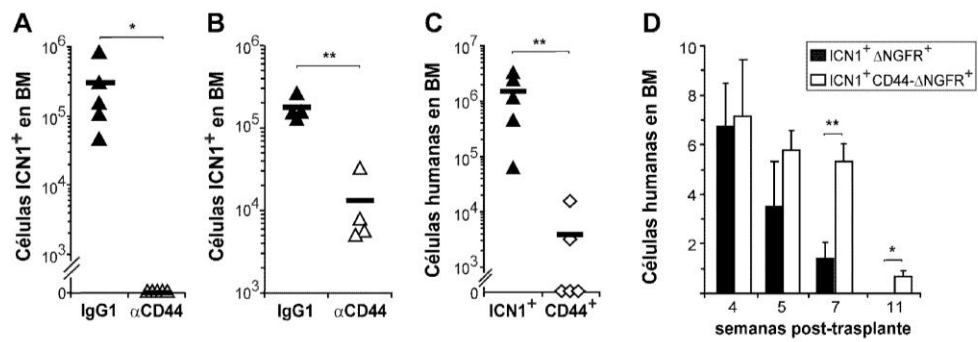


FIGURA 10

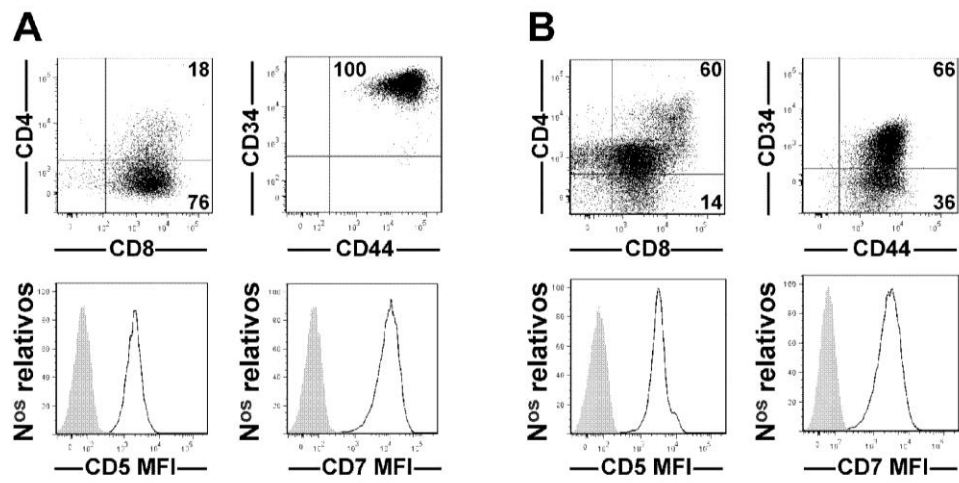


FIGURA 11

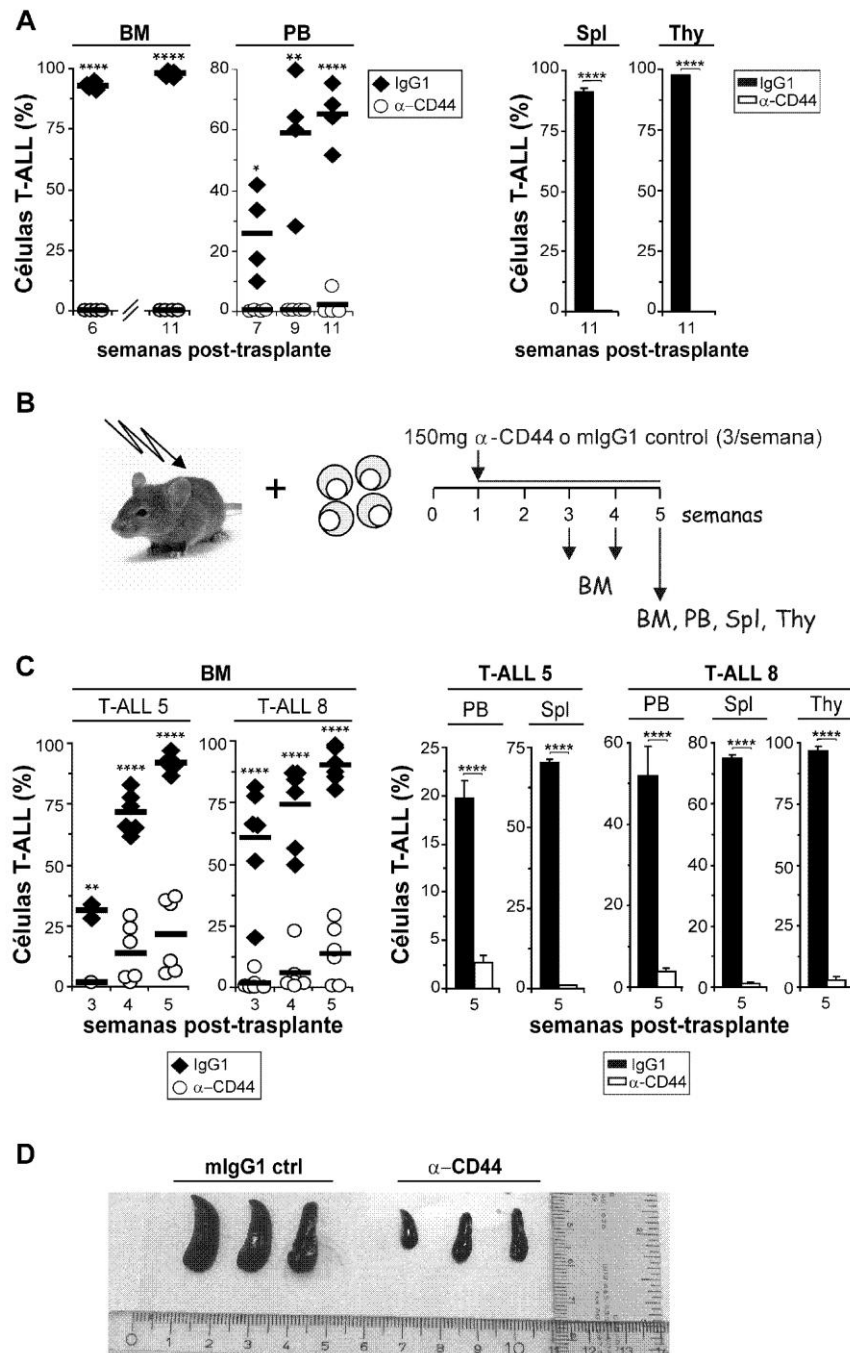


FIGURA 12

LISTADO DE SECUENCIAS

```

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

<120> APLICACION TERAPEUTICA DE AGENTES INHIBIDORES DE CD44 FRENTE A LA LEUCEMIA
LINFOBLASTICA AGUDA ALL HUMANA

<130> 5120111 MARIA LUISA TORIBIO

<160> 1

<170> BiSSAP 1.0

<210> 1
<211> 5501
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> source
<222> 1..5501
<223> /mol_type="genomic DNA"
      /note="gen CD44 desde 5kb upstream hasta 1er exon codificante"
      /organism="Homo sapiens"

<220>
<221> misc_feature
<222> 881..887
<223> /note="Sitio CSL 2"

<220>
<221> misc_feature
<222> 554..558
<223> /note="Sitio CSL 1"

<220>
<221> misc_feature
<222> 1492..1497
<223> /note="Sitio CSL 3"

<220>
<221> misc_feature
<222> 1761..1766
<223> /note="Sitio CSL 4"

<220>
<221> misc_feature
<222> 5435..5437
<223> /note="Inicio secuencia codificante ATG"

<220>
<221> misc_feature
<222> 5298..5299
<223> /note="Sitio de inicio de la transcripcion"

<400> 1
ggtgatgatt aattatgaca gaaccaagaa tgtataaatt gttctcagca catagtagtc      60
acatagtaaa tgagtgacaga gaacaagcaa ttttagata attacaaggc tcttagttac      120
catttacata ccaacatgg atatgtccaa aacaaatcat gcttaaattgt tcatcaaaac      180
agattcctaa agccttccaa tagatgttta accactttgt atgaagtgga gagaagagga      240
ataaatatga attttagtta ctacatgaac ataaaataaa tataattaaa aataaatata      300
attacattcc cttaagtaat agtgcataaa atatagactg ttttgcttgt gttccttcca      360
gtagcttgc tacataaagc cacataccat taattcaaat ttcatcgtca aaaattcaca      420

```

ES 2 446 215 A2

tttctaagtt tgttatcatc caagtctagg aattgtccta tctgcatact attttaacct	480
ccaaagggtct gcgtaaaacc ctttttgtgg ctaacatgga tctatctaaa aaatccagtt	540
gcatctctcc ctttgggact tccaggggtgc agcagccaca ccaatttctt tattttaccat	600
aatttgaaag ccttattaat cctaaagggt cagctctata atcacatttg gttagcttga	660
gactaatcct tagagggtat ttatttttca tgaagattgc ttcccagcta ctgggtttatt	720
tagactttac taataattat ttcgcaagag cttttttcac cactgctcat ttatatgtgt	780
agaattcaca ctgtgaatat gaactaagga tgaatttttt taagagttaa ggtttaactg	840
gaatgtcatt ttttctttac tgtgccagat cattcctttt ctgggaagct gtcccgtgaa	900
ataattaaat attgtccctt taaaagagtc tgtgacctgc tgcatttgta atccttgaat	960
tccatgattc agcccaagat ctcccagctt tccatttcac actcctgctc acatttggtt	1020
tagatttggc ttttctttgc tcgagaggaa caggatttat tactaccagt cagaagccat	1080
cagtcccca tatttcagca aagaacccta gtctgccaga gtgagtaatg ctctgtttgc	1140
actcaagtct ccctgaacca gtcaccccaa ataggatgtc actgcttgca tttattttaga	1200
aactgtcaag ttgtctatgt gtttcctccc accagttcat gtgattcctg aaacaccct	1260
atgcgctttg atgggagggg aaaaaataa cagtccctca tacatttatg taatgcttat	1320
ttatggagca cagtgtatat gttagggact gagagctgag tatgtgctgg caccacagaa	1380
ggacatgtcc ctgttctcag gtagcttaga ggtcattgag tcccaccatg aggcaggcac	1440
accaggaaat ggtcttgatg tcttctttca ctgactactc ataataaact atgggaaagg	1500
tctgattacc cttgttttgt ggctgggatt accgaaactc ccagagggtta agtcacctc	1560
tgataagggg gaaagccaat gctcagacct ggactttctc ggtccaaggc tgctgattga	1620
attctggatt cttcccaa atgtgtaact cgtgtcaact caaatcaatt caagtttctt	1680
ttccagtttc ccacatccca tggtttggct tagaaagaaa gatggtgcaa cacacaacag	1740
atatcaagca tctaagagtt tgggaagggt ttgtgtgacc agtggtgtgg gcagggtgtc	1800
tttagaatgg aaagtggatg agaggggagc tcaaagaggt gatccaggaa ttcccaaagg	1860
tggaccttga ctcagtaagt caccaggtct gttatttgaa atgagtcatt tgtggtatgg	1920
gggcaaatga cctcagtccc tcaccaaact atcggaagc aagcaaaca aataatcccc	1980
gcttctgggg agaataatcc taattacagc ccctagaatt tgcattgcct tctacagttt	2040
gcaaagcact ttcacaccta tattttcctt ggtggaattg tttactgcac taatggagaa	2100
gggaccagga cttgatattg cctagtttgt tggtttttat atatttttta agaataatca	2160
tctgtcaaaa tgtaatttca tgcaatagtc tggtatataa aactgatgca agtggaactt	2220
ctgtggttgg gatggggcct ggggagggag aggcacagct tactcctcag cttttactct	2280
gaccactagg tctgcttctg aggggtctct aaggaacctc caggttccat gaaacacagt	2340
aagacagaca ttgttcctag tgactcccca cgctacttca ctttcttgct ccaagaaaag	2400
gaagctgaaa tccctggagg ttgcatgagg tgaaaaaagc tgctccttgt cctgtattct	2460
tgtgcatgga acctaccagg gctggtttcc tcacatgagt agggactgaa gccttatctg	2520

ES 2 446 215 A2

ggagccagtt	tgccccagtt	tgtttcaaga	aataaagtgt	cctcttggtc	acagacagca	2580
gcagtaacaa	ctttttcctg	cggactggca	gcattttcca	agcacctgct	cttcaggtgg	2640
gagttacggg	tcactgtctt	cattccagac	gggaggctct	ttgagtcatt	gcatgccagc	2700
ttctgagtg	ctgaggacta	gatccagaca	aggatttttc	agtcccaaac	actcttcctg	2760
aaaatgcaag	aggagtagtc	tttagtcaaa	cagaatctcc	acaactgaaa	aattttatacc	2820
ggactagaca	gtggtagtgg	ttgcacaata	ttgttaaagt	actacacgtc	actgctataa	2880
acacttttaa	atgggtgaaa	tggtaaat	tatgttatgc	atattttaac	ataacaatga	2940
taataat	aactaagtac	gttgccctct	tatttcctac	agggtcaagt	tcaaactccc	3000
tggcatagct	tacaccttgt	agtcccata	cctgtaacct	catgtctgct	atcttcccc	3060
agccccctca	tctgatctat	gttcagatca	gctcacattg	ctctctattc	tctggacaag	3120
ccatgttctt	tcacttttct	atgctcaaac	acaattttgc	ttttagtaat	gatagcaaac	3180
acttatttaa	agtgttact	gcatgcatat	gtagacataa	atctacggct	taatacatgc	3240
agggtctttg	agtcatttaa	tcctcaccaa	ttctatgaag	taatagaatt	gtaatagtaa	3300
taatagatac	tattattaag	cccat	acttgagcaa	attgagctaa	ttgccttagg	3360
caaggtcaca	caactaagaa	gcagccataa	taggggttgg	atctaggtgt	tctagctcct	3420
gaatccatgc	tggtcgtcac	tacactgtac	tgctgtgga	tgacttactt	gtccctgtag	3480
tttcatctga	agaattcctc	ctccttttcc	tttgaggcct	gcctcaaata	tcacttcccc	3540
tgtgaagact	gcctgggtgt	ctccaggaga	gagtgtgact	cccttctcta	ggaatggtag	3600
caccccaaac	acacacattt	tgcagcatat	ttcaccttgc	atggtaatgg	cctgcttgtg	3660
agttttattc	cgtaccagag	ggtgagggtc	ctgaagatag	cgccagggtc	tatttacctc	3720
gatacccccac	aacactcatt	acatgtctga	tgaatgaatg	cataggggga	tggctgggtg	3780
catttctctc	aacttttcaa	tttcttgaaa	taaataacaa	aatctttacct	tccttcagaa	3840
gtcctggcat	ggttcctttc	atcttgccac	agccactgat	aatcactttc	attttctgtg	3900
taactcacca	ggcaagaagt	ccatgcagat	ttacttttag	tagttcacat	gacaaataaa	3960
tactgcgttt	gatttccaaa	cattaaacca	tagtatatta	tagatagata	tagagttatc	4020
attcaaagta	tgatatttca	atctcaaaag	gcttcccctg	aagaatatta	caaactcttc	4080
ctctctttaa	gatctgctgg	gtaggaaaga	tgggagaaaa	tgaattaatg	tttacacaga	4140
aaggaggata	atgggggcaa	aaataataga	tgaacgtatg	ggtggatgag	agaatggata	4200
aatgatagg	tggatatgtt	gatcttggac	agatgggaaa	tgagtggata	tatcaataaa	4260
cagatatgtg	ggtggatggg	tggagaagag	gatggtggat	ggttgtggtt	ttatgaagag	4320
atgtgaaaaa	ggaagtgtgg	aatgatggat	gagaagttgt	atgggaagat	gaatagaaga	4380
ataggtggtt	gaataaatta	aaagggtgtg	ggttggatga	atgaatgagt	gggatgatag	4440
atggacctaa	gtggtttagt	gatggacagg	aggatggatg	gatgtgagag	cccagaagg	4500
acataaggaa	agatgggtgg	atagatggat	gggcggatgg	aaggatattt	aggaggatga	4560
atgagcatgt	gtgtggagag	aggtgccccat	tcacactggc	ttgaacacat	gggttagctg	4620

ES 2 446 215 A2

agccaaatgc cagccctatg acaggccatc agtagctttc cctgagctgt tctgccaaga	4680
agctaaaatt cattcaagcc atgtggactt gttattgagg ggaaaaagaa tgagctctcc	4740
ctctttccac ttggaagatt caccaactcc ccacccctca ctccccactg tgggcacgga	4800
ggcactgcg caccagggc aagacctcgc cctctctcca gtcctctcc caggatatcc	4860
aacatcctgt gaaaccaga gatcttgctc cagccggatt cagagaaatt tagcgggaaa	4920
ggagaggcca aaggctgaac ccaatggtgc aaggttttac ggttcggtca tcctctgtcc	4980
tgacgccgcg gggccagcgg gagaagaaag ccagtgcgtc tctgggcgca ggggccagt	5040
gggctcggag gcacaggcac cccgcgacac tccaggttcc ccgaccacg tccttggcag	5100
ccccgattat ttacagcctc agcagagcac ggggcggggg cagagggggc cgcccgagg	5160
ggctgctact tcttaaaacc tctgcgggct gcttagtcac agccccctt gcttgggtgt	5220
gtccttcgct cgctccctcc ctccgtctta ggtcactgtt ttcaacctcg aataaaaact	5280
gcagccaact tccgaggcag cctcattgcc cagcggacct cagcctctgc caggttcggt	5340
ccgccatcct cgtcccgtcc tccgccggcc cctgccccgc gccagggat cctccagctc	5400
ctttcgcccg cgccctccgt tcgctccgga caccatggac aagttttggt ggcacgcagc	5460
ctggggactc tgcctcgtgc cgctgagcct ggcgcagatc g	5501