

Université de Montréal

Sensibilité des cellules leucémiques aux immunoconjugués anti-CD33

Par

Isabelle Savoie Rondeau

Département de Sciences biomédicales

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en Sciences biomédicales (M.Sc.)

Août 2012

© Isabelle Savoie Rondeau, 2012

Université de Montréal

Université de Montréal

Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé :

Sensibilité des cellules leucémiques aux immunoconjugués anti-CD33

Présenté par :

Isabelle Savoie Rondeau

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur :

Jean-Sébastien Delisle

Directeur de recherche :

Denis Claude Roy

Membre du jury :

Paul Maddox

Résumé

La leucémie myéloïde aigue (LMA), cancer du sang causé par une prolifération excessive des précurseurs myéloïdes à un stade précoce de maturation, est associée à une survie variant entre 20 et 30% à cinq ans en dépit des traitements de chimiothérapie les plus intensifs. L'antigène CD33 est exprimé chez les cellules malignes dans 90% des LMA ce qui en fait une cible de choix pour le développement d'immunoconjugué (IC). Trois IC composés d'un anticorps monoclonal anti-CD33 couplé à la maytansine, une toxine s'attaquant aux fuseaux mitotiques, ont été créés. Nous avons étudié l'effet de ces IC sur des cellules primaires et des lignées cellulaires LMA et étudier les mécanismes pouvant expliquer différents niveaux de sensibilité. Les études effectuées ont permis de déterminer que le niveau d'expression du CD33 n'explique pas la variation de sensibilité face aux IC. Il a été démontré que les IC anti-CD33 sont internalisés rapidement par la cellule et que le conjugué est retrouvé au niveau de l'endosome en premier lieu. Il a été confirmé que le lysosome est essentiel à l'effet anti-mitotique induit par le conjugué. Aussi, il est proposé que la protéine SOCS3 pourrait jouer un rôle dans la résistance aux IC anti-CD33 en dirigeant le complexe IC-CD33-SOCS3 vers le protéasome et ainsi empêcher la libération du composé toxique par le lysosome. Nous avons aussi conclu que les variations d'agent de liaison et l'augmentation du nombre de molécules toxiques entre les 3 IC n'ont pas été suffisantes pour augmenter leur efficacité à éliminer les cellules LMA. L'évaluation de ces IC ainsi que l'identification des mécanismes de résistance permettra de cibler les patients les plus susceptibles de bénéficier de ce type de traitement et potentiellement d'identifier de nouvelles voies pour améliorer l'efficacité des traitements.

Mots clés : leucémie myéloïde aigue, immunoconjugué, CD33, SOCS3, maytansine

Abstract

Acute myeloid leukemia (AML), a cancer where hematopoietic precursors are arrested in an early stage of development, is associated with a poor survival rate of 20 to 30% over five years, despite intensive chemotherapy treatments. In approximately 90% of AML cases the malignant cells express CD33 antigen, which makes it a target of choice for development of immunotoxin based therapy. Three immunoconjugates (IC) composed of anti-CD33 monoclonal antibody coupled with maytansine derivative, which prevent tubulin polymerization and thus formation of mitotic spindle, were designed. These three IC were tested for their activity against several AML cell lines and primary AML patient cells and we investigate mechanisms responsible for variation in sensitivity to IC treatment. In this report, we show that differences in number of CD33 molecules on AML cell surface does not explain the observed differences in IC sensitivity. We demonstrate that binding of huMy9-6 antibody to CD33 induces rapid internalization and that it is first process through endosome. We confirm that lysosomal processing is essential for the antimitotic effect induced by IC treatment. Also, we provide evidence that SOCS3 protein may play a role in resistance of AML cells to anti-CD33 therapy by directing IC-CD33-SOCS3 complex to the proteasome and therefore affecting lysosomal decoupling of IC-CD33 and intracellular release of maytansine derivatives. Finally, the linkers and maytansine derivative modifications were not sufficient to increase sufficiently the efficacy of conjugates to eliminate higher numbers of AML cells. The identification of mechanisms responsible for increased resistance of AML cell lines and primary AMLs may allow us to identify IC responsive AML cells and also identify strategies to improve the efficacy of IC treatment.

Key words: acute myeloid leukemia, immunoconjugate, CD33, SOCS3, maytansine

Table des matières

Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations.....	ix
Remerciements.....	xi
Introduction	1
Système hématopoïétique	3
Leucémie	5
Leucémie myéloïde aigue	6
Signes et symptômes	6
Système de classification : FAB et WHO	7
Traitements actuels	9
Nouveaux traitements	12
Immunoconjugués	17
Anticorps	18
Agent de liaison	19
Agent toxique	20
Endocytose des immunoconjugués	20
Récepteur CD33 : cible antigénique dans le traitement des LMA	22
AVE9633 : Immunoconjugué anti-CD33 contre les LMA	26
La maytansine, ses dérivés et ses mécanismes d'action	27
Résultats antérieurs - <i>In vitro</i> et <i>In vivo</i>	29
<i>In vitro</i>	29
<i>In vivo</i>	30

Similarités et différences entre le Mylotarg et l'AVE9633 : facteurs impliqués dans la réponse aux IC anti-CD33	36
La protéine SOCS3 : Importante pour la réponse aux IC?	38
Création de deux nouveaux immunoconjugués anti-CD33	42
Description du projet de recherche et hypothèses.....	44
Contributions des auteurs à l'article.....	46
Présentation de l'article	47
Introduction	49
Materials and methods.....	51
Results.....	56
Discussion	62
Conclusion.....	65
Reference List	66
Figure Legend	69
Discussion	83
Analyse des immunoconjugués	85
Mécanisme d'action des IC	86
Mécanismes de résistance potentiels.....	87
Conclusions et Perspectives	91
Références bibliographiques.....	95

Liste des tableaux

<u>Tableau I</u> : Nombre de nouveaux cas de LMA par 100 000 cas regroupé par intervalle d'âge de 5 ans, 2002 à 2006	7
<u>Tableau II</u> : Nouveaux agents pour le traitement de la LMA.....	13

Liste des figures

Mémoire

Figure 1 : Hiérarchie des cellules souches hématopoïétiques.....	4
Figure 2 : Classification des LMA selon le système de classification FAB.....	8
Figure 3 : Mécanisme d'action des immunoconjugués	21
Figure 4 : Interactions <i>cis</i> et <i>trans</i> des siglecs.....	24
Figure 5 : Schématisation des Siglecs humains.....	24
Figure 6 : Signalisation des siglecs reliés au CD33	26
Figure 7 : Structure de l'immunoconjugué AVE9633	27
Figure 8 : Efficacité de l'AVE933 contre des cellules leucémiques.....	31
Figure 9 : Effet de l'AVE9633 sur les progéniteurs normaux de la moelle osseuse	32
Figure 10 : Effet de l'AVE9633 contre cellules primaires de patients LMA	33
Figure 11 : Efficacité de l'AVE9633 contre des cellules HL60 <i>in vivo</i>	34
Figure 12 : Schématisation de l'ubiquitination du récepteur CD33 par la protéine SOCS3 suite à la liaison de l'immunoconjugué	41
Figure 13 : Schématisation des 3 immunoconjugués anti-CD33 et leurs variantes	43

Article

Figure 1 : AML cell line sensitivity to IC treatment.....	72
Figure 2 : Effect of CD33 IC on clonogenic HL60 AML cell lines.....	73
Figure 3 : Primary AML patient cell sensitivity to IC treatment.....	74
Figure 4 : Correlation between CD33 expression and immunoconjugate sensitivity.....	75-76
Figure 5 : Internalization of antibody-bound CD33 in AML cell lines.....	77
Figure 6 : Intracellular processing of huMy9-6-AF488.....	78
Figure 7 : Lysosomal inhibitors prevent G ₂ /M arrest and block expression of phosphohistone H3 induced by IC treatment.....	79-80
Figure 8 : Cell line expression of SOCS3 protein and methylation status.....	81

Liste des abréviations

Note: Dû à la dominance de l'anglais dans le domaine des sciences, une majorité d'abréviations proviennent de termes anglophones. La signification anglophone est inscrite en italique et sa traduction francophone suit, lorsque pertinente.

ASB	<i>Ankyrine-repeat protein with a SOCS box</i> ► Protéine contenant des répétitions ankyrine avec une boîte SOCS
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CSH	Cellules souches hématopoïétiques
CSL	Cellules souches leucémiques
CT	Court terme
ECS	ElonginC - Cullin1 – SOCSbox
EGF	<i>Endothelial Growth Factor</i> ► Facteur de croissance endothélial
FAB	<i>French-American-British</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FLT3	<i>FMS-like tyrosine kinase 3</i> ► Tyrosine kinase 3 similaire à FMS
G-CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i> ► Facteur de croissance granulocytaire
HDAC	Histone déacétylase
HDARA	Forte dose de cytarabine
Ig	Immunoglobuline
ITIM	<i>Immunoreceptor Tyrosine based Inhibitory Motif</i> ► Immunorécepteur à motif inhibiteur à base de tyrosine
IV	Intra-veineuse
LMA	Leucémie myéloïde aigue
LLC	Leucémie lymphoïde chronique
LLA	Leucémie lymphoïde aigue
LMC	Leucémie myéloïde chronique

LT	Long terme
MAG	<i>Myelin Associated Glycoprotein</i> ► Glycoprotéine associée à la myéline
MDR	<i>Multidrug resistance</i> ► résistance à de multiples médicaments
MPP	<i>Multipotent Progenitors</i> ► Progéniteurs multipotents
MRP1	<i>Multidrug resistance protein 1</i> ► protéine de résistance à de multiples médicaments
PLC	Progéniteur lymphoïde commun
PMC	Progéniteur myéloïde commun
Pgp	<i>Permeability Glycoprotein</i> ► Glycoprotéine de perméabilité
RC	Rémission complète
SCF	Skip1 - Cullin1 – Fbox
SCF	<i>Stem Cell Factor</i> ► Facteur de cellules souches
SDAraC	Dose standard de cytarabine
SH2	<i>Src-homology 2</i>
SHP1/2	<i>SH2 domain-containing phosphatase 1 / 2</i> ► Protéine phosphatase 1 / 2 contenant un domaine SH2
SOCS	<i>Suppressor of Cytokine Signaling</i> ► Suppresseur du Signal cytokine
SSB	<i>SPRY-domain protein with a SOCS box</i>
CT	Court terme
UFC	Unité formatrice de colonie
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> ► Facteur de croissance endothélial vasculaire
WHO	<i>World Health Organization</i>
WSB	<i>WD40-repeat protein with a SOCS box</i>

Remerciements

Premièrement, j'aimerais remercier Dr Denis Claude Roy, mon directeur de recherche. J'étais assistante de recherche dans son laboratoire lorsque j'ai eu le désir de poursuivre mes études à la maîtrise. Il m'a encouragé dans mes démarches et a accepté que je poursuive mon apprentissage dans son laboratoire. Nous avons décidé ensemble du projet le plus constructif pour moi en tant qu'étudiante. Je me dois aussi de remercier Dr Gorazd Krosi qui a été mon superviseur pour la première année. Il a su me diriger sur de bonnes pistes, autant expérimentales que de réflexion.

Évidemment, je dois remercier mes collègues de travail pour le support moral, expérimental et toutes les anecdotes de ces dernières années. Particulièrement, Fannie Larochelle, Radia Sidi Boumédine, Pascale Dubé, Marie-Pier Giard et Cynthia Thérien qui sont non seulement des collègues de travail mais de très bonnes amies.

Pour leur écoute et leur conseil, merci à mon comité de parrainage composé de Paul Maddox et de Stéphane Lefrançois. Pour leur lecture et évaluation de mon mémoire, merci à Jean-Sébastien Delisle et Paul Maddox.

Il est important de mentionner le support financier et les immunoconjugués d'Immunogen Inc. Aussi, le Centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont (CRHMR) a été très accueillant. Les chercheurs et leurs étudiants, le personnel de l'animalerie, de la plateforme de cytométrie, du centre de thérapie cellulaire et tous ceux qui touchent de près ou de loin à l'organisation des activités scientifiques.

Finalement, merci à mon copain de croire en moi et de m'avoir convaincu de retourner aux études afin d'obtenir ma maîtrise. Aussi à ma famille pour le soutien sous tous ces aspects. MERCI!

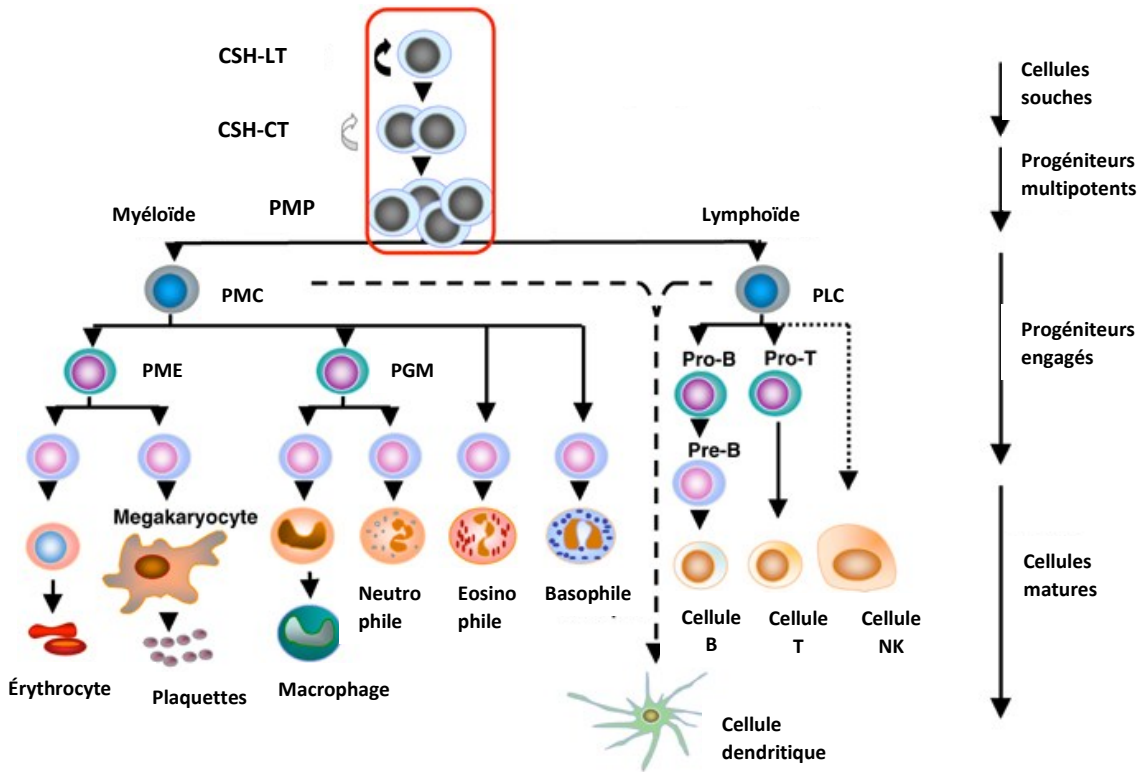
Introduction

Système hématopoïétique

Le système sanguin possède une panoplie de rôles importants tel l'échange de nutriments entre les cellules, le maintien de la température du corps et du pH sanguin et de divers processus comme la coagulation et l'immunité. Les différents types cellulaires constituant le système sanguin dérivent d'une seule et même cellule. Pluripotente, non-différenciée et possédant un potentiel d'auto-renouvellement, la cellule souche hématopoïétique (CSH) est à l'origine de toutes les cellules matures composant le système sanguin. La CSH peut s'auto-renouveler afin de maintenir le pool de cellules souches constant ou se diviser en cellules progénitrices possédant un potentiel de différenciation de plus en plus restreint pour finalement engendrer les cellules matures fonctionnelles. Par son microenvironnement complexe, la moelle osseuse facilite la maintenance des CSH et supporte la différenciation et la maturation de ses progéniteurs. Ce processus extrêmement bien régulé est nommé « hématopoïèse ». (Figure 1, page 4)

Les CSH et leurs progéniteurs plus matures expriment l'antigène CD34 et représentent de 0.2 à 3% des cellules nucléées de la moelle osseuse, du sang de cordon ombilical et du sang périphérique après mobilisation par facteur de croissance (par exemple le G-CSF) ^{1, 2}. Seulement 1 à 10% de ces cellules CD34+, n'exprimant ni le marqueur CD38 ni les marqueurs spécifiques de lignées (Lin-), possèdent un potentiel de différenciation vers la lignée myéloïde ou lymphoïde ³⁻⁵. Par contre, de récentes observations proposent l'existence d'une population de cellule hiérarchiquement plus primitive que les cellules CD34+CD38-Lin-. Il a été montré qu'une population de cellules CD34- provenant de la moelle osseuse de souris possède les caractéristiques de reconstitution hématopoïétique des CSH CD34+ ⁶. La présence et le potentiel clonogénique de cette population a aussi été démontré chez l'humain ^{7, 8} et plusieurs observations suggèrent que les CSH CD34- peuvent se différencier en CD34+ *in vivo* ⁸.

Figure 1 : Hiérarchie des cellules souches hématopoïétiques



CSH-LT, cellule souche hématopoïétique à long terme; CSH-ST, cellule souche hématopoïétique à court terme; PMP, progéniteur multipotent; PMC, progéniteur myéloïde commun; PLC, progéniteur lymphoïde commun; PME, progéniteur mégakaryocyte/érythroïde; PGM, progéniteur granulocyte/macrophage.

Modifié de : **The role of Smad signaling in hematopoiesis**,
Jonas Larsson and Stefan Karlsson, Oncogene, 2005

Selon le modèle classique de différenciation hématopoïétique, les CSH se regroupent en 2 grandes catégories : les « long terme » (LT) et les « court terme » (CT). Les LT-CSH possèdent la capacité d'auto-renouvellement, reconstituent complètement l'hôte irradié à long terme et se différencient en CT-CSH⁹. En parallèle, les CT-CSH ont une capacité d'auto-renouvellement temporaire d'environ 8 semaines³ et se différencient en progéniteurs multipotents (PMP)^{9, 10}. La différenciation des CSH en cellules plus matures implique une perte progressive du potentiel d'auto-renouvellement, de la capacité de prolifération ainsi qu'une restriction de la pluripotence¹¹. Les PMP ont une capacité d'auto-renouvellement

limitée et par conséquent ne supportent l'hématopoïèse que transitoirement^{9,12}. Ils peuvent générer toutes les cellules matures du sang via leur différenciation en progéniteurs myéloïdes communs (PMC) ou en progéniteurs lymphoïdes communs (PLC). De la différenciation des PMC émergent les progéniteurs myélo-monocytes, qui matureront en monocytes/macrophages et granulocytes, et les progéniteurs mégakaryo-érythroïdes, qui produiront les mégakaryocytes/plaquettes et les érythrocytes¹³. Les lymphocytes B, T et les cellules « natural killer » résultent de la différenciation du PLC¹⁴. Étrangement, les différents types de cellules dendritiques peuvent provenir soit des PMC soit des PLC^{13,15}.

La transformation en cellules malignes des CSH ou d'un de ses progéniteurs entraîne un déséquilibre des composantes du système hématopoïétique et un diagnostic de leucémie. Des évidences suggèrent que dans les cas de leucémie, il y a présence de cellules souches dites leucémiques qui sont de rares cellules au potentiel de prolifération infini conduisant à la formation des cellules malignes¹⁶. Il a été démontré que la majorité des cellules leucémiques ne peuvent proliférer indéfiniment et que seulement une population spécifique, les cellules souches leucémiques (CSL), démontre un potentiel clonogénique^{17,18}. Les CSL sont majoritairement en phase G₀ du cycle cellulaire ce qui rend les traitements de chimiothérapie moins efficaces que sur une population de cellule active telles les cellules blastiques leucémiques¹⁹. On considère la CSL résistante au traitement de chimiothérapie comme responsable des rechutes dans les cas de leucémie myéloblastique aigüe et par le fait même, elle contribue à la pathologie et aux résultats cliniques²⁰.

Leucémie

La leucémie est un cancer de la moelle osseuse et est caractérisée par l'accumulation des leucocytes (granulocytes, monocytes et lymphocytes) bloqués à un stade de différenciation précoce. Une dérégulation de la prolifération cellulaire, des mécanismes de survie et d'apoptose résultent en une quantité excessive de cellules leucémiques. Ces cellules immatures envahissent la moelle osseuse ainsi que le sang de la personne atteinte et

engendrent un dysfonctionnement du système hématopoïétique entraînant la mort si laissé sans traitement. La leucémie peut apparaître sous forme chronique, caractérisée par une évolution lente s'échelonnant sur des mois ou des années et présentant des cellules cancéreuses relativement matures bien qu'anormales, ou sous forme aigue, caractérisée par l'accumulation rapide de cellules immatures non fonctionnelles et nécessitant souvent un traitement rapide. En considérant la forme chronique ou aigue ainsi que le type de cellules à l'origine de la leucémie, on peut distinguer 4 grandes catégories : la leucémie lymphoïde chronique (LLC), la leucémie myéloïde chronique (LMC), la leucémie lymphoblastique aigue (LLA) et la leucémie myéloblastique aigue (LMA).

Leucémie myéloïde aigue

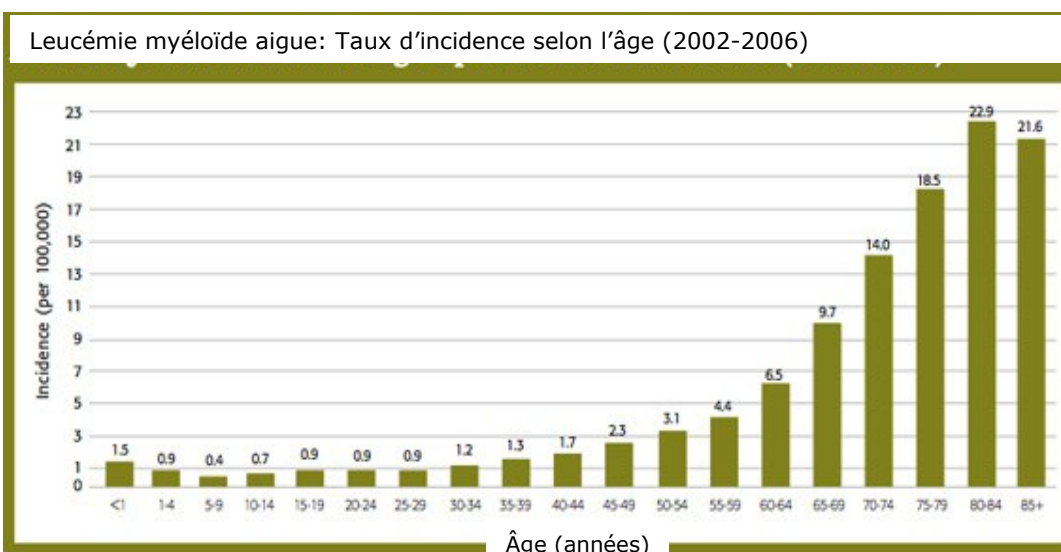
La LMA est la plus couramment diagnostiquée chez l'adulte mais est le type de leucémie présentant les plus faibles taux de survie^{21, 22}. Elle représente environ 25% de tous les cas de leucémies chez les adultes mais seulement 15 à 20% des cas chez les moins de 15 ans^{21, 23}. La probabilité de développer une LMA augmente avec l'âge et la moyenne d'âge au diagnostic est d'environ 70 ans²⁴ (Tableau I, page 6). En 2011 aux États-Unis, on estime à 12 950 le nombre de nouveaux cas de LMA et à 9 050 le nombre de décès annuels²⁵.

Signes et symptômes

Les signes et symptômes menant au diagnostic d'une LMA sont souvent non-spécifiques et similaires à ceux de maladies plus communes comme la grippe. Les patients présentent des symptômes généralisés comme de la fatigue, de la fièvre, une perte d'appétit et de poids²⁶. Dû à un défaut de coagulation, des ecchymoses et pétéchies peuvent être présentes et on observe une fréquence plus élevée ainsi qu'une persistance des infections²⁶. Parfois les patients sont asymptomatiques et le diagnostic est posé suite aux résultats de tests sanguins de routine. Une suspicion entraîne alors un processus d'analyse des composantes cellulaires du système hématopoïétique par prélèvement et analyse du sang et de la moelle osseuse. Une formule sanguine complète et un étalement sur lame du sang sont exécutés afin de

déterminer le nombre de chacune des populations cellulaires constituant le sang ainsi que pour vérifier la présence de cellules leucémiques blastiques. Le diagnostic d'une LMA est posé sur les données de morphologie cellulaire ainsi que les caractéristiques immunologiques, cytogénétiques et moléculaires.

Tableau I : Nombre de nouveaux cas de LMA par 100 000 cas regroupé par intervalle d'âge de 5 ans, 2002 à 2006



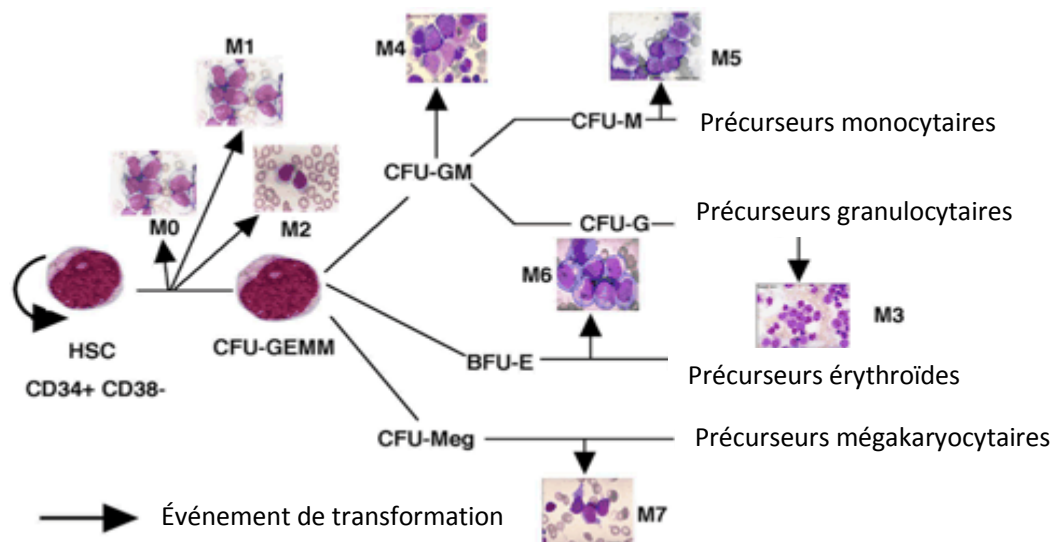
Modifié de : **SEER** (Surveillance, Epidemiology and End Results)
Cancer Statistics Review, 1975-2007, National Cancer Institute,
 2010

Système de classification : FAB et WHO

À partir des informations récoltées lors des analyses, les LMA sont divisées en sous types classifiés selon 2 systèmes : le système « French, American, British » (FAB) ou le système « World Health Organization » (WHO). Le système de classification FAB est en vigueur depuis 1976 et attribue un code de M0 à M7 selon le type de cellules d'origine des cellules leucémiques ainsi que sur leur niveau de maturation ²⁷ (Figure 2, page 8). Le chiffre assigné

ne représente pas la sévérité ou l'avancement de la maladie mais plutôt le type de cellule d'origine de la cellule leucémique.

Figure 2 : Classification des LMA selon le système de classification FAB



Modifié de : **American Society of Hematology Education Program Book, 2001**

La génétique permet de mieux prédire le pronostic de la leucémie que ses caractéristiques morphologiques. Le système de classification WHO est basé non seulement sur les caractéristiques morphologiques mais aussi la génétique, l'immunophénotype et les données cliniques. L'ensemble de ces données permet de mieux caractériser la maladie et est plus représentatif du pronostic. Le système de classification WHO est en constante évolution vu l'apport de nouvelles données par la communauté scientifique. Dans le but d'intégrer ces nouvelles informations, la 4^e édition du système de classification WHO comprend 2 catégories provisoires pour le diagnostic des LMA²⁸.

Même s'il a été soulevé que l'impossibilité d'obtenir les informations génétiques rapidement est un obstacle à l'utilisation de la classification WHO²⁹, les 2 systèmes de classification sont

couramment utilisés et chacun apporte son lot d'informations pertinentes permettant de mieux caractériser la leucémie.

Traitements actuels

Bien que la LMA soit la leucémie la plus diagnostiquée chez l'adulte, son taux de survie est le plus faible face aux autres types de leucémies. Le taux de rémission suite aux traitements standards de chimiothérapie varie entre 50 et 85%^{30,31}. Par contre, dans les 2 ans suivant la rémission, une majorité de patients succomberont à une rechute²¹.

Le traitement standard de la LMA débute par une phase myélosuppressive via une induction par la chimiothérapie intensive. La thérapie d'induction standard comprend une infusion intra-veineuse (IV) durant 7 jours d'une dose standard de cytarabine (SDAraC) 100-200 mg/m² combiné à une infusion intra-veineuse de 3 jours de daunorubicine à 45-60 mg/m². La cytarabine est un agent anti-métabolique rapidement converti en cytosine arabinoside triphosphate. Sous cette forme active, la cytarabine interfère avec l'élongation de la chaîne d'ADN en s'y incorporant et en entrant en compétition avec l'ADN polymérase. Ceci induit un blocage du cycle cellulaire en phase de réplication. La daunorubicine fait partie de la famille des anthracyclines. Les anthracyclines pénètrent dans la cellule par diffusion passive³², sont transportées au noyau via le protéasome, s'intercalent dans l'ADN et par conséquent, bloquent la réplication de l'ADN et induisent l'agrégation de la chromatine. De plus, les anthracyclines agissent comme inhibiteur de l'enzyme Topoisomérase II en bloquant le complexe enzyme-ADN³³. L'enzyme ne peut donc pas réparer les coupures dans la structure de l'ADN ce qui mène à l'accumulation de dommages, arrêt du cycle cellulaire et mort programmée de la cellule. Ce régime d'induction 7+3 induit une rémission complète (RC) chez 65 à 75% des patients âgés entre 18 et 60 ans et une survie à long terme de 30%^{34,35}. Plusieurs variantes ont été évaluées dans le but d'améliorer le taux de RC suite au traitement d'induction standard comme l'utilisation d'anthracyclines alternatives, l'incorporation de

fortes doses de cytarabine (HDaraC) ou l'ajout d'autres agents tels l'etoposide, la fludarabine ou la cladribine. Aucun d'entre eux n'a toutefois montré d'amélioration convaincante du taux de survie par rapport au régime 7+3 ^{21,30}.

En prévention d'une rechute et dans le but de maintenir la phase de rémission suite au traitement d'induction, plusieurs stratégies sont utilisées telle une thérapie de consolidation, une greffe de cellules souches de la moelle osseuse de type autologue ou de type allogénique. L'intensité de la thérapie post-rémission dépend de plusieurs facteurs tels l'âge du patient, les comorbidités, la valeur pronostique suite aux résultats de la cytogénétique et la disponibilité d'un donneur de moelle compatible au niveau du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) ²¹.

La thérapie de consolidation consiste en une phase additionnelle de chimiothérapie intensive, habituellement avec des doses plus élevées du médicament qu'en phase d'induction ³⁶. HDaraC est le traitement standard de consolidation : 3000 mg/m², 2 fois par jour, aux jours 1, 3 et 5 et de 3 à 4 cycles sont donnés. Des taux de survie de 2 à 3 ans chez 35 à 50% des patients de 60 ans et moins sont atteints ^{37, 38}. Le traitement de consolidation HDaraC n'est pas offert aux patients de 60 ans et plus vu l'incidence plus élevée de toxicité à cet âge. Des formes moins intensives de traitement de consolidation sont utilisées mais aucune ne s'est montrée supérieure. Deux cycles comprenant 5 jours continus d'injection IV de cytarabine à 100 mg/m² et 2 jours de daunorubicine à 45 mg/m² est une approche souvent utilisée chez les 60 ans et plus ²¹.

Suite au traitement d'induction et de consolidation, une thérapie de maintenance moins myélosuppressive peut être entreprise dans l'espoir de réduire le nombre de cellules souches leucémiques résiduelles, si tel est le cas, et de prévenir une rechute. Par contre, les bénéfices d'un tel maintien sont controversés et semblent dépendre majoritairement de l'intensité des thérapies d'induction et de consolidation ^{39,40}.

La greffe de cellules souches provenant de la moelle osseuse peut être de type autologue c'est-à-dire que les cellules proviennent du patient lui-même ou de type allogénique, les cellules proviennent alors d'un donneur sain compatible avec le patient. Plusieurs études randomisées ont comparé la greffe autologue versus la chimiothérapie de consolidation et ont montré un bénéfice au niveau de la survie sans maladie mais pas du taux de survie global ⁴¹⁻⁴³.

Des études ont montré que la greffe de cellule souche allogénique améliore non seulement la survie sans maladie mais aussi le taux de survie chez les patients atteints de LMA ⁴⁴⁻⁴⁶. Une méta-analyse a rapporté une amélioration du taux de survie global de 12% pour tous les groupes de patients excluant ceux à cytogénétique favorable ⁴⁷. Comme la réponse aux traitements de consolidation standards des patients à cytogénétique non-favorable n'est pas encourageante, la greffe de moelle osseuse est devenue le traitement standard suite à une première rémission ²¹.

Malgré les progrès remarquables dans le traitement des LMA, 20 à 40% des patients n'atteignent pas le stade de rémission suite au traitement d'induction standard ^{40, 48}. Le pronostic de ces patients réfractaires à la première ligne de traitement et qui ne peuvent tolérer une transplantation de moelle osseuse est presque toujours fatal ²¹. Pour les patients qui atteignent une première RC, le taux de rechute sur 3 ans est de 50 à 70% ^{40, 48}. La durée de la première rémission semble être un facteur déterminant corrélant avec la probabilité d'une deuxième rémission et du taux de survie globale. Lorsque la première rémission a une durée inférieure à 12 mois, on rapporte des taux de 10 à 20% de seconde rémission alors qu'une première rémission de plus de 12 mois hausse à 40 à 50% la probabilité d'obtenir une seconde rémission ⁴⁹⁻⁵¹. Dans le but d'induire une seconde rémission chez les patients en première rechute, des traitements de chimiothérapie additionnels peuvent être utilisés. De plus, les patients ayant un donneur compatible, apparenté ou non, ou ceux aptes à tolérer une greffe autologue ont une option de traitement supplémentaire. La greffe de moelle osseuse autologue peut être proposée pour les patients qui ne peuvent tolérer une greffe allogénique ou n'ayant pas de donneur compatible. Une étude de suivi à long terme chez des

patients avec une leucémie qualifiée d'intermédiaire à bon facteur de risque rapporte un taux de survie de 10 ans dans 32% des cas ⁵². Pour la greffe de moelle osseuse provenant d'un donneur compatible apparenté, les patients présentent un taux de survie sur 5 ans de 20 à 35% ²¹. Ces résultats varient selon la durée de la première rémission et aussi du fait que le patient était en seconde rémission ou non au moment de la greffe de moelle osseuse ⁵³. La greffe de moelle osseuse allogénique non-apparentée est une option chez les patients qui peuvent tolérer ce type de traitement. Par contre, le taux de mortalité atteint les 30% suite à la greffe et il y a une forte incidence de la maladie du greffon contre l'hôte ⁵⁴.

Nouveaux traitements

Des efforts considérables ont été mis au fil des ans dans l'amélioration des traitements contre la LMA par l'ajustement des combinaisons de médicaments existants ainsi que par la modulation des doses. Les résultats obtenus suite à l'intensification des thérapies disponibles semblent plafonner. De plus, les traitements actuels sont limités à une minorité de patients car la LMA survient surtout chez des patients âgés qui sont fréquemment inéligibles à la chimiothérapie d'induction. Ceci soulève la nécessité de traitement moins toxique qui pourrait être offert aux patients plus âgés et ainsi, à la majorité des patients atteints de LMA. L'identification de mutations spécifiques de certains gènes et de leur protéine ainsi que l'identification d'altérations lors de la transcription génique ont mené à la création de nouveaux types de médicaments potentiels pour le traitement des LMA. (Tableau II, page 13)

De nouveaux analogues des nucléosides sont apparus tels la clofarabine, qui inhibe la ribonucléotide reductase et l'ADN polymérase en plus d'induire l'apoptose ^{55, 56}, la troxacitabine, qui a une structure L-enantiomer à l'opposé de la forme D-enantiomer des autres nucléosides et par le fait même, des mécanismes d'action et de résistance différents ⁵⁷ et la sapacitabine, qui a montré son effet anti-prolifératif dans une grande variété de lignées cellulaires incluant celles connues pour être résistantes aux autres médicaments ⁵⁸.

Tableau II : Nouveaux agents pour le traitement de la LMA

Type	Composés	Mécanismes d'action
Immunotoxines	Gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg®[Wyeth Pharmaceuticals, Madison, New Jersey])	Liaison au CD33, internalisation de la toxine et cassure de l'ADN double brin
Anticorps monoclonaux	Lintuzumab (HuM195 [Seattle Genetics Inc., Bothell, Washington])	Liaison au CD33, cytotoxicité dépendante du complément et cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps
Nouveaux analogues des nucléosides	Clofarabine (Evoltra®[Genzyme Corporation, Cambridge, Massachusetts]); troxacitabine (Troxytyl®[SGX Pharmaceuticals, San Diego, California]); sapacitabine (CY682, CS-682 [Cyclacel Ltd., Dundee, United Kingdom])	Inhibition de la ribonucléotide réductase et l'ADN polymérase; induction de l'apoptose
Agents hypométhylants	Azacitidine (Vidaza®[Celgene Corporation, Summit, New Jersey]); Decitabine (Dacogen®[Eisai Inc., Woodcliff Lake, New Jersey])	Inhibition de la méthylation de l'ADN
Inhibiteurs de la farnésyltransférase	Tipifarnib (Zarnestra™[Johnson & Johnson Pharmaceutical Research & Development, L.L.C., Raritan, New Jersey]); lonafarnib (Sarasar®[Schering-Plough Corporation, Kenilworth, New Jersey])	Inhibition de la farnésyltransférase, inhibition de l'angiogénèse et induction de l'adhésion cellulaire
Agents alkylants	Laromustine (Onrigin®[Vion Pharmaceuticals, Inc., New Haven, Connecticut])	Alkylation et cross-link de l'ADN
Inhibiteurs de la tyrosine kinase FLT3	Lestaurtinib (CEP701 [Cephalon, Inc., Fazer, Pennsylvania]); tandutinib (MLN518 [Millennium Pharmaceuticals, Cambridge, Massachusetts]); PKC412 (Novartis Oncology, East Hanover, New Jersey)	Inhibition de la phosphorylation de FLT3 et induction de l'apoptose
Modulateurs des protéines de multirésistances aux médicaments	Valspodar (PSC-833 [Novartis Pharmaceuticals, East Hanover, New Jersey]); zosuquidar (LY335979 [Kanisa Pharmaceuticals, Inc./Lilly, San Diego, California])	Liaison à la P-glycoprotéine et inactivation de sa fonction d'efflux

Modifié de : **Current and Emerging Therapies for Acute Myeloid Leukemia**, Tadeus Robak and Agnieszka Wierzbowska, Clinical Therapeutics, 2009

La troisième génération de modulateurs de la « multidrug resistance » est aussi en essai clinique. Les gènes de la « multidrug resistance » (MDR₁) codent pour la protéine « permeability glycoprotein » (Pgp), une protéine transmembranaire qui agit comme pompe ATPase expulsant hors de la cellule des substrats spécifiques tels des agents chimiothérapeutiques⁵⁹. L'expression de la Pgp dans les cellules de la LMA augmente avec l'âge et fait partie des variables de mauvais pronostic^{21, 59, 60}.

Une autre cible thérapeutique est la farnesyltransférase. Cette enzyme catalyse le transfert d'un groupement farnesyl sur le résidu cystéine terminale de la protéine Ras⁶¹, oncogène régulant la croissance et la différenciation de divers types cellulaires et muté dans 3 à 40% des cas de syndrome myélodysplasique et de LMA²¹. Cette modification post-traductionnelle de Ras permet son transport au cytoplasme⁶² et par conséquent l'activation de multiples voies de signalisation. Les inhibiteurs de la farnesyltransférase ciblent spécifiquement les enzymes intracellulaires et affectent aussi l'angiogénèse, l'adhésion cellulaire, la survie et la mitose⁶¹. Deux inhibiteurs sont présentement à l'étude, tipifarnib (ZarnestraTM) et lonafarnib (Sarasar[®]).

Des variations épigénétiques peuvent interférer dans le processus de transcription génétique tel la méthylation de l'ADN et la désacétylation des histones. La méthylation de l'ADN est l'addition de groupement méthyl sur une séquence spécifique d'ADN généralement localisé près ou dans le promoteur du gène causant une perte de fonction dû au « silencing » du gène. Les histones déacétylases sont responsables de la désacétylation des histones et engendrent la répression de la transcription. Ces modifications épigénétiques altèrent le remodelage de la chromatine et ainsi la transcription génique. Elles sont associées aux mécanismes de carcinogénèse par leur effet sur la répression de la transcription de gènes suppresseurs de tumeurs⁶³. Deux inhibiteurs d'ADN méthyltransférase, l'azacitidine (Vidaza[®]) et la décitabine (Dacogen[®]) ont été utilisés dans les années 1980 mais les traitements à fortes doses ont montré de la toxicité reliée au traitement telle une suppression considérable des constituants de la moelle osseuse^{64, 65}. Des analyses rétrospectives ont montré une

augmentation des taux de rémission complète et des taux de survie ⁶⁵. Des doses moins élevées ont été démontrées comme étant actives contre les LMA et des études cliniques sont en cours pour évaluer leur potentiel ^{66, 67}. En parallèle, plusieurs inhibiteurs des histones déacétylase (HDAC) sont aussi en essai clinique. Plusieurs études ont évalué la combinaison d'inhibiteurs d'ADN méthyltransférase et des HDAC et les résultats montrent que l'association est sécuritaire et peut induire une rémission partielle ou complète ^{68, 69}.

Une autre cible potentielle pour le traitement des LMA est la « FMS-like tyrosine kinase 3 » (FLT3), une enzyme transmembranaire qui promouvoit la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire suite à son activation par la liaison d'un ligand. La FLT3 est normalement exprimée sur les cellules souches hématopoïétiques et ses progéniteurs mais une mutation du FLT3 entraînant une activation constitutive a été identifiée dans 30 à 35% des cas de LMA ^{70, 71}, en faisant une des plus fréquentes anomalies génétiques. La plupart des études ont seulement démontré une réduction transitoire du nombre de cellules blastiques dans le sang et la moelle osseuse ²¹ mais un effet de synergie a été observé lorsqu'utilisé en combinaison avec de la chimiothérapie conventionnelle ⁷². Plusieurs études combinant différents médicaments sont en cours afin de déterminer le potentiel des inhibiteurs de la tyrosine kinase FLT3 pour le traitement des LMA.

L'augmentation de l'expression de la protéine oncogène BCL-2 dans des cellules tumorales mène à une résistance à l'apoptose et est associée à un mauvais pronostic chez les patients LMA ⁵⁶. Un oligonucléotide antisens contre BCL-2, oblimersen, a été généré et testé en études cliniques de phase I ^{73, 74}. Les résultats encourageants ont permis l'initiation d'une étude randomisée de phase III par le « Cancer and Leukemia Group B ». L'oblimersen sera étudié en combinaison avec de la cytarabine et de la daunorubicine dans un contexte d'induction et avec de fortes doses d'AraC en consolidation chez les patients âgés de 60 ans et plus sans traitement préalable.

Des études ont aussi été réalisées avec des agents anti-angiogéniques dû au fait que la moelle osseuse des patients LMA présente une forte densité de microvaisseaux et qu'une augmentation des niveaux de facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF) corrèle avec un mauvais pronostic ^{34, 73, 74}. Les résultats ont par contre été décevants, qu'il soit utilisé seul ou en combinaison avec de la chimiothérapie.

La dernière catégorie de médicaments proposés pour traiter les LMA est celle des anticorps monoclonaux et des immunoconjugués. L'utilisation d'un anticorps monoclonal permet de diriger la molécule spécifiquement vers les cellules tumorales ce qui en fait une thérapie ciblée. Le lintuzumab, un anticorps monoclonal humanisé, agit par l'induction d'une réponse immunitaire par la lyse du complément ou par cytotoxicité dépendante des anticorps ⁷⁵. Plusieurs études suggèrent que l'addition du lintuzumab à un traitement de chimiothérapie d'induction est bien tolérée mais n'apporte aucun bénéfice clinique ³⁰.

En parallèle, les immunoconjugués sont aussi composés d'anticorps monoclonaux mais ceux-ci sont couplés à un composé toxique pour la cellule. Le gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg[®]) est le seul immunoconjugué à avoir été approuvé par la « US Food and Drug Administration » (FDA) pour le traitement des leucémies myéloïdes aiguës, plus précisément chez les patients de 60 ans et plus en première rechute ou non admissibles à un traitement de chimiothérapie conventionnel ⁷⁶. Il est composé d'un anticorps humanisé ciblant l'antigène CD33 lié au *N*-acétyl-calicheamicine, un agent antibiotique cytotoxique ciblant l'ADN. Les études de phase I et II rapportent de multiples effets secondaires suite à l'injection du Mylotarg. Des symptômes de fièvre, frissons, nausées et d'hypotension sont rapportés malgré une prémédication à l'acétaminophène et anti-histaminique ^{77, 78}. Ces effets suite à l'injection sont généralement bien contrôlés mais des réactions d'hypersensibilité et d'événements pulmonaires ont été fatales ⁷⁹. De la toxicité hématologique telle de la neutropénie sévère et non hématologique comme le syndrome de lyse tumorale, de la dyspnée et de la toxicité hépatique ont été observée ⁷⁷. Suite à l'analyse des taux de survie de 3 études cliniques indépendantes, le Mylotarg a été approuvé par la FDA sous un processus d'approbation

accéléralé comme agent seul. Toutefois, ce processus d'approbation de la FDA nécessite des données supplémentaires permettant la confirmation des bénéfices cliniques d'où l'étude de phase III dans laquelle le Mylotarg a été évalué en combinaison avec un traitement de chimiothérapie (daunorubicine et cytosine arabinoside) en comparaison avec la chimiothérapie seulement. Un total de 627 patients a été enrôlé dans cette étude et les résultats n'ont pas permis de confirmer les bénéfices cliniques apportés par l'addition du Mylotarg au traitement de chimiothérapie⁸⁰. L'évaluation de la toxicité suite au traitement a montré un taux de mortalité significativement plus élevé chez les patients recevant une combinaison d'un traitement d'induction par chimiothérapie standard et de Mylotarg comparativement à ceux recevant seulement la chimiothérapie (16/283=5.7% vs 4/281=10.4%, P=0.01)⁸⁰. De la toxicité hépatique, incluant la maladie veino-occlusive hépatique (VOD) sévère, a été signalé suite à l'utilisation du Mylotarg comme agent seul ou en combinaison avec un traitement de chimiothérapie, chez des patients avec ou sans historique de problème hépatique ou de greffe de cellules souches de la moelle osseuse⁸⁰. Une étude rapporte toutefois que lorsqu'administré selon la cédule et les doses recommandées, le Mylotarg comme agent seul est rarement associé avec la maladie VOD⁸¹. La compagnie pharmaceutique Pfizer, suite aux discussions avec la FDA, a retiré le Mylotarg du marché le 15 octobre 2010, due à la toxicité importante identifiée au niveau hépatique.

Immunoconjugués

Le premier anticorps chimérique a été généré à la fin des années 1980^{82, 83} et c'est en 1997 que le premier anticorps thérapeutique, le rituximab (Rituxan), a été approuvé par la FDA pour le traitement des lymphomes non-Hodgkinien⁸⁴. L'entrée dans l'ère post-génomique dans les années 2000 a permis d'identifier, grâce au criblage à grande échelle du transcriptome et du protéome humains, plus de un million de protéines différentes, incluant leurs modifications post-traductionnelles⁸⁵. Cette banque d'épitopes, l'immunome, permet l'étude des profils antigéniques des cellules, en particulier des cellules tumorales. Résultant de ces analyses, la création de nouveaux immunoconjugués occupe une place prépondérante

dans le marché des nouveaux traitements contre le cancer. Le traitement contre le cancer doit être agressif afin de détruire les cellules cancéreuses mais cette agressivité cause souvent des effets secondaires non négligeables. Amener un agent thérapeutique spécifiquement à la cellule tumorale est la caractéristique principale des immunoconjugués. Des travaux ont montré que les immunoconjugués sont en effet dirigés spécifiquement contre les cellules qui expriment l'antigène cible, démontrant ainsi que les anticorps monoclonaux peuvent être utilisés comme véhicules de transport pour des agents cytotoxiques dans le contexte de thérapies ciblées. De plus, l'évolution de la technologie des anticorps monoclonaux murins vers des anticorps chimériques (en partie murin et en partie humain) vers des anticorps humanisés et vers des anticorps entièrement humains ont mené à la réduction de la clairance immunitaire et de l'hypersensibilité, à l'amélioration de la sécurité et à la possibilité d'administration répétitive ⁸⁶. Malgré des résultats pré-cliniques prometteurs, l'échec de plusieurs immunoconjugués en essai clinique souligne la complexité du processus de création. Les immunoconjugués sont composés de 3 éléments essentiels : un anticorps monoclonal spécifique à l'antigène cible, un composé toxique pour la cellule et un agent de liaison qui joint les deux et chacune de ces composantes a un impact critique sur la toxicologie, la pharmacologie et l'efficacité de la thérapie.

Anticorps

L'anticorps est responsable de la remise de l'agent toxique à la cellule tumorale. Le nombre de sites antigéniques sur la cellule cible ainsi que la prévalence de ces sites dans les tissus normaux auront un impact sur l'efficacité mais aussi la toxicité de l'immunoconjugué ⁷⁷. La composante anticorps de l'immunoconjugué est sélectionnée en tenant compte, entre autre, de son affinité/avidité. Il doit préférentiellement lier les cellules tumorales, avec une forte avidité soit K_D d'environ 0.1 nM, et reconnaître faiblement les cellules saines ⁸⁷. Par conséquent, le choix de l'antigène lui-même est d'importance capitale. Il devrait être exprimé préférentiellement sur les cellules tumorales par rapport aux cellules saines. Ceci permet non seulement d'épargner les cellules saines mais aussi d'empêcher la séquestration

du conjugué par celles-ci ⁷⁷. Malgré le fait que plusieurs études pré-cliniques ont démontré qu'une forte expression de l'antigène par des cellules cancéreuses de lignées corrèle avec une augmentation de l'activité anti-tumorale ⁸⁸, le nombre optimal d'antigènes à la surface cellulaire reste inconnu.

Agent de liaison

L'agent de liaison qui fait le pont entre l'anticorps et le composé toxique est aussi critique au succès de la thérapie. L'agent de liaison est nécessaire à la stabilité de l'immunoconjugué dans le plasma mais doit permettre la relâche de l'agent toxique à l'intérieur du cytoplasme de la cellule. Les propriétés différentielles entre le cytoplasme et le plasma tel la différence de pH, le potentiel de réduction thiol et la capacité de protéolyse enzymatique doivent être pris en compte ⁷⁷. L'évaluation pharmacocinétique dans le plasma de l'immunoconjugué intact, de l'anticorps seul (résultant de la dégradation de l'agent de liaison) et de l'agent toxique circulant (reflétant l'exposition à l'agent toxique et son élimination) informe sur l'efficacité de l'agent de liaison ⁷⁷. Toute détection dans le plasma de l'agent toxique est inquiétante vu la non spécificité des agents utilisés. Les liaisons les plus utilisées sont les liens hydrazones acides labiles, les liens disulfures réductibles par des thiols et les liens peptidiques clivables par protéolyse enzymatique. Chacun d'entre eux possède différentes caractéristiques mais l'instabilité des liens hydrazones acides labiles et les propriétés intéressantes des liens disulfures réductibles par des thiols semblent favoriser l'utilisation de ces derniers. Plusieurs facteurs importants favorisent ce type d'agent de liaison: ils sont stables à pH physiologique et plus sélectifs vu la variation de la concentration des thiols entre les cellules et le sérum ⁸⁹. Le groupement thiol du glutathion est responsable de la cassure des ponts disulfures de l'agent de liaison et ainsi du relâchement de l'agent toxique. Le niveau de glutathion réduit a été montré comme étant élevé dans les cellules cancéreuses (de l'ordre du mM) ⁹⁰ alors qu'il est faible (de l'ordre du μ M) dans la circulation sanguine. Les agents de liaison clivables par protéolyse ont été créés dans façon à augmenter la stabilité dans le sérum en parallèle à une hydrolyse enzymatique rapide suite à l'internalisation de

l'immunoconjugué. Cette approche semble réalisable car les protéases sont majoritairement retrouvées à l'intérieur de la cellule et ne sont pas aussi actives à l'extérieur dû au pH non optimal ainsi qu'à leur inhibition par les inhibiteurs de protéases retrouvés dans le sérum⁹¹. Une étude utilisant l'anticorps BR96 couplé à la doxorubicine a montré une meilleure spécificité immunologique lorsqu'utilisé avec un agent de liaison peptidique comparativement à l'agent hydrazone⁹².

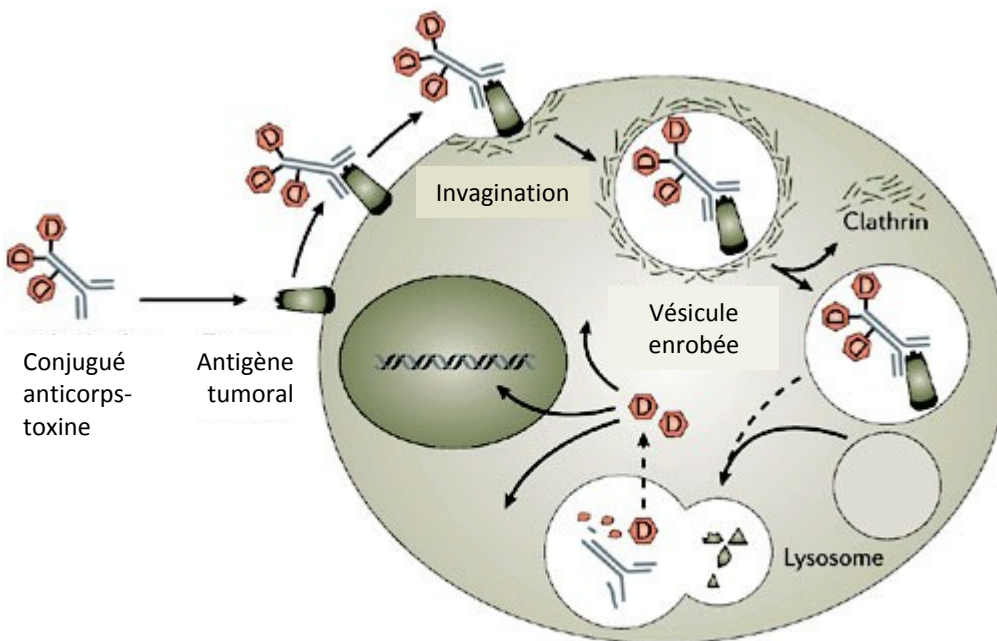
Agent toxique

Idéalement, l'agent toxique devrait être suffisamment efficace pour minimiser le nombre de molécules d'immunoconjugué nécessaire à l'élimination de la cellule cancéreuse. La valeur IC_{50} *in vitro* se situe normalement dans l'ordre des nanomolaires ou picomolaires^{77, 87} permettant son efficacité avec une concentration d'anticorps liant la cellule tumorale. Évidemment, le composé toxique doit être soluble dans l'eau pour permettre sa liaison à l'anticorps et être stable en solution aqueuse pour l'entreposage de l'immunoconjugué⁸⁷. Les agents toxiques les plus utilisés dans la construction d'immunoconjugués sont les radionucléotides, les agents chimiothérapeutiques cytotoxiques et les toxines protéiques.

Endocytose des immunoconjugués

La première étape du mécanisme d'élimination de la cellule cancéreuse par l'immunoconjugué est la reconnaissance de l'antigène cible à la surface cellulaire. La formation d'un complexe entre l'immunoconjugué et l'épitope spécifique exprimé sur la cellule tumorale induit l'endocytose de ce complexe. (Figure 3, page 21) L'endocytose via des vésicules de clathrine est le mécanisme prédominant lors de l'internalisation des récepteurs de surface liés à un cargo⁹³. La liaison du récepteur à l'immunoconjugué induit le recrutement de la protéine adaptatrice de la clathrine (AP2) et la clathrine à la membrane plasmique⁹⁴. L'invagination de cette région nécessite l'action de multiples protéines accessoires tels l'epsine, l'endophiline, la dynamine et l'amphiphysine⁹⁴.

Figure 3 : Mécanisme d'action des immunoconjugués



Modifié de : **Antibody targeted drugs as cancer therapeutics**, Schrama D, Reisfeld RA, Becker JC, Nature Reviews - Drug Discovery, 2006

Une fois internalisées, ces protéines se dissocient de la vésicule par un mécanisme consommateur d'énergie permettant à la clathrine et aux autres protéines impliquées d'être recyclées⁹⁵. La nouvelle vésicule formée, contenant le complexe immunoconjugué/antigène, peut alors fusionner avec les endosomes de triage présents dans le cytoplasme de la cellule. Cette étape engendre l'implication des protéines SNARE et Rab⁹⁶. L'endosome de triage accepte le transfert de matériel durant 5 à 10 minutes seulement⁹⁴. Son pH légèrement acide (5.9-6.0), dû à la présence de pompes vésiculaires H⁺ ATPases, permet la dissociation de l'immunoconjugué de son récepteur. Suite au transfert de matériel, l'endosome de triage se dirige le long des microtubules vers le centre de la cellule, devient plus acide (pH 5.0-6.0) et acquiert des hydrolases acides⁹⁴. Ces étapes de maturation font que l'endosome de triage devient un endosome tardif. La fusion de l'endosome tardif avec le lysosome amène le pH à 5.0-5.5 et entraîne ainsi la dégradation de l'agent de liaison de l'immunoconjugué^{94, 97, 98}. Le lysosome est un composant important de la voie endosomale et est le principal

compartiment d'hydrolyse de la cellule. L'agent toxique libéré de l'anticorps par la dégradation de l'agent de liaison peut s'évader du lysosome et interférer de différentes façons au niveau de l'intégrité cellulaire^{97, 98}. La résultante étant la mort de la cellule tumorale selon un processus relatif au type d'agent toxique utilisé lors de la construction de l'immunoconjugué.

L'immunothérapie offre une alternative intéressante au traitement de chimiothérapie conventionnel. Par contre, leur conception reste un défi majeur. Dans le cadre d'un traitement contre la LMA, le récepteur membranaire CD33 est une cible de choix.

Récepteur CD33 : cible antigénique dans le traitement des LMA

Le récepteur CD33 est considéré comme un récepteur de la lignée myéloïde malgré l'expression d'isoformes par un sous-groupe de cellules T et de cellules NK⁹⁹. L'expression du CD33 est exclusive au système hématopoïétique. Il est absent des cellules souches pluripotentes mais fortement exprimé par les cellules engagées dans la lignée myéloïde¹⁰⁰. Son expression diminue au cours de la maturation et la différenciation¹⁰¹. Il est exprimé en périphérie majoritairement par les cellules du système immunitaire tels les neutrophiles, les éosinophiles, les monocytes, les macrophages, les cellules NK, les cellules dendritiques et les mastocytes¹⁰². Résultant de son expression par les progéniteurs myéloïdes, le CD33 est exprimé et associé à la LMA ; environ 85-90% des cas de LMA sont qualifiés de CD33+, défini par la présence du CD33 sur plus de 20-25% des blastes¹⁰³. Cette caractéristique en fait une cible thérapeutique intéressante pour le traitement des leucémies myéloïdes. De plus, une étude avance que les CSL responsables de la LMA surexpriment les récepteurs CD123 et CD33 sur la population immature CD34⁺CD38⁻^{104, 105}. Une thérapie ciblant le CD33 aurait comme avantage considérable d'attaquer les cellules leucémiques exprimant l'antigène CD33 alors que les cellules souches pluripotentes n'exprimant pas l'antigène permettraient la reconstitution du système hématopoïétique suite au traitement.

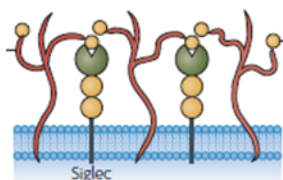
La récepteur CD33 est une protéine de 67 KDa membre de la famille des récepteurs inhibiteurs « Sialic Acid Binding Immunoglobuline-like lectin » (Siglec). La famille des Siglecs comprend les sialoadhésines, le CD22 (siglec 2), le CD33 (siglec 3), la glycoprotéine associée à la myéline (MAG ou siglec 4) et les siglecs 5 à 11, 14 et 15¹⁰². À l'exception de MAG qui est exclusif au système nerveux, les siglecs sont exprimés au niveau des cellules du système hématopoïétiques et sont impliqués dans la régulation positive ou négative de la réponse inflammatoire et immunitaire¹⁰⁶.

Trois domaines composent les Siglecs : un domaine amino-terminal de type immunoglobuline (Ig) variable, un nombre variable de domaines de type Ig - C2 et un domaine transmembranaire suivi d'une queue cytoplasmique^{102, 106}. Ces récepteurs de surface ont la capacité de lier des structures d'oligosaccharides contenant de l'acide sialique retrouvé en grande quantité à la surface cellulaire^{102, 107}. L'acide sialique fait partie d'une famille de sucres composés de 9 carbones majoritairement dérivée de l'acide N-acetylneuraminique. Une conséquence de leur forte présence à la surface cellulaire est que les oligosaccharides masquent les sites de liaison des siglecs par des interactions *cis*. Les interactions *cis* sont importantes mais n'empêchent pas les interactions *trans* comme la liaison de ligand de plus forte affinité se trouvant sur une autre cellule ou la liaison à un pathogène¹⁰² (Figure 4, Page 234). Plusieurs siglecs peuvent interagir avec les acides sialiques à la surface de *N.meningitidis*, *C.jejuni*, les streptocoques du groupe B et *Trypasonoma cruzi* et ce phénomène de reconnaissance pourrait être bénéfique dans la destruction du pathogène et la présentation d'antigène¹⁰².

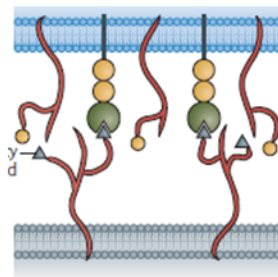
On divise les Siglecs en 2 grandes catégories basées sur la similitude de leur structure ainsi que leur évolution. La plus grande catégorie, les Siglecs reliés au CD33, présente une séquence similaire au récepteur CD33 dans leur région extra et intracellulaire^{102, 106} (Figure 5, page 24).

Figure 4 : Interactions *cis* et *trans* des siglecs

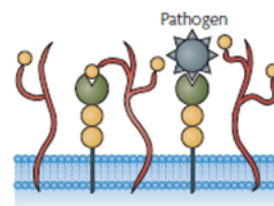
Site masqué par des interaction *cis*



Interaction cellule-cellule



Interaction avec un pathogène



Modifié de : **Siglecs and their role in the immune system**, Crocker PR, Paulson JC, Varki A, Nature Reviews – Immunology, 2007

Figure 5 : Schématisation des Siglecs humains

	Siglecs communs aux mammifères				Siglecs reliés au CD33									
	Humain													
Structure														
Nom commun	Sialo adhésine	CD22	GAM	Siglec 15	CD33	Siglec-5	Siglec-6	Siglec-7	Siglec-8	Siglec-9	Siglec-10	Siglec-11	Siglec-14	
Nom alternatif	Siglec-1 CD169	Siglec-2	Siglec-4	-	Siglec-3	CD170	CD327	CD328	-	CD329	-	-	-	
Expression	Mac	B	OligoD Schw	ND	MyP Mo	N,Mo (B)	Troph (B)	NK (Mo)	Eo (Ba)	Mo,N, cDC,(NK)	B (Mo, Eo)	Mac	ND	

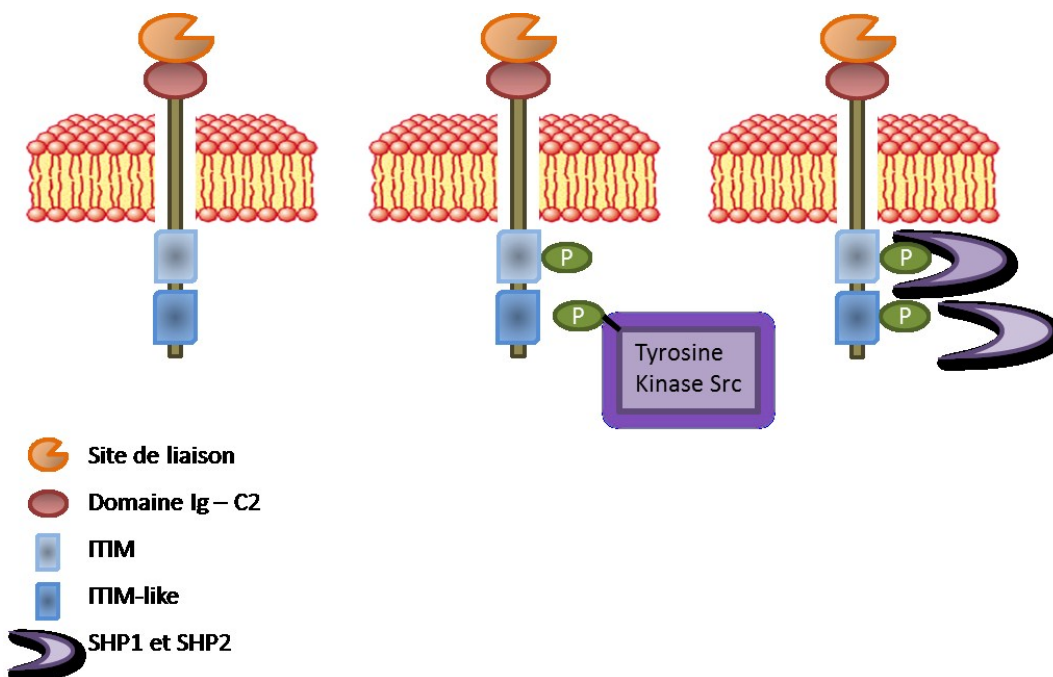
- Domaine immunoglobuline V, liaison acide sialique
- Domaine immunoglobuline C2
- ITIM
- ITIM-like
- Motif GRB2
- Site de phosphorylation des kinases FYN

Modifié de : **Siglecs and their role in the immune system**, Crocker PR, Paulson JC, Varki A, Nature Reviews – Immunology, 2007

L'étude des fonctions des siglecs reliés au CD33 n'est pas simple dû au fait que leur expression se chevauchent dans plusieurs types de cellules du sang et cellules immunitaires¹⁰⁸. De plus, un domaine ITIM est absent du CD33 murin comparativement à celui de l'homme et son profil d'expression cellulaire est différent^{108, 109}. Les siglecs reliés au CD33 ont tout de même été démontrés comme étant importants pour la régulation de la fonction des leucocytes lors de l'inflammation et de la réponse immunitaire incluant la prolifération cellulaire, la différenciation, l'apoptose, l'activation, la survie et l'endocytose^{106, 108}. De plus, Vitale et al. ont démontré que dans des cas de leucémie myéloïde aigue ou chronique, l'engagement du récepteur CD33 inhibe la prolifération des cellules et active un processus menant à la mort par apoptose dans les cellules LMA^{110, 111}.

La plupart des Siglecs reliés au CD33 possèdent deux domaines tyrosines cytoplasmiques comprenant, dans la région proximale à la membrane, un « immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif » (ITIM) et dans la région distale, un domaine ITIM-like (Figure 6, Page 26). Les motifs ITIM ou ITIM-like sont importants pour la fonction du récepteur et il semble que le degré de phosphorylation des tyrosines influence la réponse engendrée¹⁰². L'activation du récepteur induit une phosphorylation rapide des motifs tyrosines par les tyrosines kinases de la famille Src créant ainsi des sites de haute affinité pour les molécules contenant un domaine « Src homology-2 » (SH2)¹⁰⁶. La transmission du signal d'inhibition se fait par le recrutement et l'activation de protéines phosphatases contenant un domaine SH2 (SHP1 et SHP2)^{106, 112}. En parallèle, il a été démontré que l'absence des protéines SHP1 et SHP2 augmente l'endocytose du CD33 dans certaines lignées cellulaires¹¹².

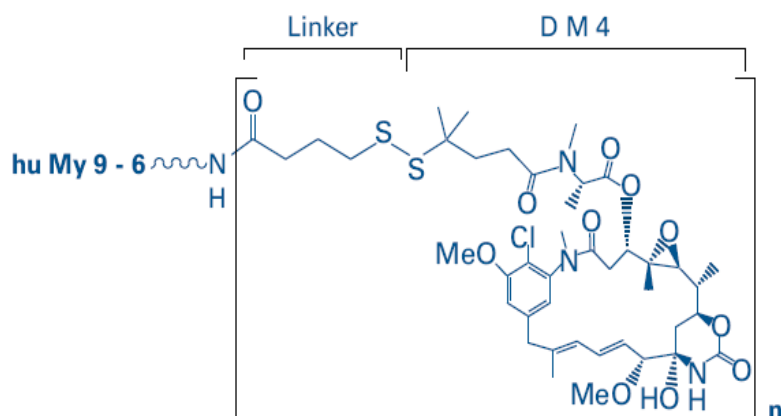
Figure 6 : Signalisation des siglecs reliés au CD33



AVE9633 : Immunoconjugué anti-CD33 contre les LMA

Ciblant l'antigène CD33 pour l'élimination des LMA, un immunoconjugué prometteur a été créé par ImmunoGen Inc et licencié à Sanofi-Aventis. L'AVE9633 (huMy9-6-SPDB-DM4) est composé d'un anticorps IgG1 monoclonal humanisé spécifique au CD33 et lié par l'agent de liaison SPDB (N-succinimidyl-4-(2-pyridyldithio) butyrate) au composé cytotoxique dérivé de la maytansine, le DM4 (N²-deacetyl-N²-(4-methyl-4(oxobutyldithio)-1-oxopentyl)-maytansine). (Figure 7, page 27) Environ 3.5 molécules de DM4 sont présentes par molécule d'anticorps, ce qui est représentatif de la moyenne des immunoconjugués en général. Des études ont démontré que l'immunoconjugaison était nécessaire car ni l'anticorps huMy9-6 seul ni le DM4 seul n'ont montré d'activité significative dans les modèles précliniques¹¹³.

Figure 7 : Structure de l'immunoconjugué AVE9633



La maytansine, ses dérivés et ses mécanismes d'action

La maytansine est un macrolide de type ansamycine qui a été originalement isolé de l'arbuste *Maytenus ovatus*¹¹⁴. Sa capacité de liaison à la tubuline (K_D d'environ 1 $\mu\text{mol/L}$)^{115, 116} entraîne la dépolymérisation des microtubules et inhibe ainsi leur dynamique d'assemblage. Les microtubules sont des polymères dynamiques du cytosquelette qui alternent constamment entre des phases de croissance et de décroissance que l'on nomme l'instabilité dynamique¹¹⁷. Ils participent à la ségrégation des chromosomes durant la division cellulaire, au transport de cargo intracellulaire et au positionnement et mouvement des organelles¹¹⁸. L'inhibition des fonctions des microtubules entraîne un arrêt du cycle cellulaire et la mort de la cellule¹¹⁹. La suppression de l'instabilité dynamique joue un rôle majeur dans l'effet anti-mitotique des composés maytansinoïdes¹¹⁹⁻¹²¹ et cette caractéristique s'est révélée intéressante comme agent thérapeutique dans la lutte contre le cancer. Malgré des résultats excitants *in vitro* et *in vivo*, la maytansine comme agent simple n'a pas montré d'effets bénéfiques significatifs chez les patients atteints de différents types de cancer¹²². Des effets secondaires majeurs ont été reportés tels de la neurotoxicité et des dommages au niveau du tractus gastro-intestinal¹²³.

Le développement d'analogues de la maytansine ainsi que la possibilité d'augmenter leur spécificité par liaison à des anticorps spécifiques a fait renaître l'intérêt pour son potentiel thérapeutique. Les dérivés de la maytansine DM1 et DM4 contiennent un résidu thiol permettant la création d'un pont disulfure nécessaire à leur couplage avec l'anticorps anti-CD33 par l'intermédiaire de l'agent de liaison. L'analogue DM4 d'immunogène est 1000 fois plus puissant que les agents chimiothérapeutiques traditionnels et ne peut être administré de façon systémique ¹²⁴.

Les conjugués anticorps et dérivés maytansinoïdes sont activés suite à une dégradation lysosomale par un processus intracellulaire dépendant de l'agent de liaison ¹²⁵. Le premier dérivé à être produit est le lysine-N^ε-SPDB-DM4. Ce dérivé peut se lier à la tubuline et engendrer de la toxicité cellulaire mais il subit généralement 2 étapes de transformation supplémentaires : une réduction des liens disulfures qui forme le métabolite DM4 suivi d'une rapide méthylation le transformant en S-méthyl-DM4. Le S-méthyl-DM4 est le dérivé le plus puissant du DM4 avec une IC₅₀ de 2 pmol/L ¹²⁵. Il est le métabolite le plus abondant et semble être catalysé par l'enzyme méthyltransférase retrouvée en abondance dans la cellule ^{125, 126}. Les métabolites cellulaires dérivés du DM4 ou du DM1 suppriment fortement la dynamique d'assemblage des microtubules en se liant aux microtubules ¹²⁷. Il a été suggéré qu'une diminution du taux d'association de la tubuline suite à la liaison des dérivés maytansinoïdes aux extrémités du microtubule pourrait être responsable de la suppression de la croissance des microtubules ¹²⁷. De plus, il est possible que les dérivés de la maytansine stabilisent la coiffe GTP qui se trouve à l'extrémité du microtubule ¹²⁷. La stabilisation de la coiffe GTP affecte aussi la dynamique d'assemblage en provoquant la suppression du taux de raccourcissement et de la fréquence catastrophe. La suppression de l'instabilité dynamique des microtubules par les dérivés de la maytansine engendre l'arrêt du cycle cellulaire en phase G₂/M ¹¹⁷.

Résultats antérieurs - *In vitro* et *In vivo*

Des résultats *in vitro* et *in vivo* obtenus dans notre laboratoire au cours des dernières années avec l'AVE9633 se sont montrés encourageants.

In vitro

Par essai clonogénique, on a observé l'effet d'un traitement à l'AVE9633 sur la croissance des unités formatrices de colonies (UFC) par la lignée cellulaire HL60, lignée leucémique promyélocytaire. (Figure 8A, page 31) Il a été démontré que l'AVE9633 exerce son effet cytotoxique de façon dose-dépendante et on observe une inhibition totale de la formation de colonie à 10^{-8} M. Un traitement avec l'anticorps monoclonal huMy9-6 non-conjugué n'affecte pas la croissance des UFC confirmant la nécessité de la conjugaison de l'anticorps avec un agent toxique. Pour confirmer la sélectivité de l'AVE9633, une lignée cellulaire LLA n'exprimant pas l'antigène CD33 (NALM-6) a été traitée avec l'AVE9633 et son dérivé toxique. (Figure 8B, page 3130) Effectivement, l'AVE9633 n'a aucun impact sur la croissance de la lignée CD33⁻ contrairement au dérivé toxique qui inhibe de façon non-spécifique la croissance des UFC.

La toxicité de l'AVE9633 contre 3 échantillons provenant de moelle osseuse normale a aussi été évaluée (Figure 9, page 3231). Comparativement à la réponse des cellules de lignées de LMA, l'élimination des cellules de moelle osseuse normale est dose-dépendante. Par contre, alors qu'une concentration de 10^{-7} M inhibe 100% des cellules de lignées, 10% de progéniteurs normaux sont conservés à cette même dose. Même si cette élimination est non-négligeable, une proportion significative de cellules progénitrices aptes à régénérer les différents constituants hématopoïétiques est conservée.

Afin de mieux jauger l'efficacité de l'AVE9633, il était important d'évaluer son activité cytotoxique face à des cellules leucémiques provenant de patients atteints de LMA. Des

échantillons de 15 patients ont été traités durant 5 jours à différentes doses d'AVE9633 et la croissance des UFC a été évaluée par essai clonogénique (Figure 10, page 33). L'exposition à 10^{-10} M d'AVE9633 est suffisante pour induire une réduction de plus de 50% des UFC dans tous les échantillons. Chez 13 des 15 patients testés, une dose de 10^{-8} M d'AVE9633 a provoqué une inhibition de la croissance des UFC de plus de 80% et une dose de 10^{-7} M a permis l'élimination complète de la croissance des UFC pour la totalité des échantillons. Ces observations confirment le potentiel de l'AVE9633 dans l'élimination des cellules LMA. Par contre, des doses aussi prononcées que 10^{-7} M risquent de ne pas être atteintes en clinique vu le risque élevé de toxicité.

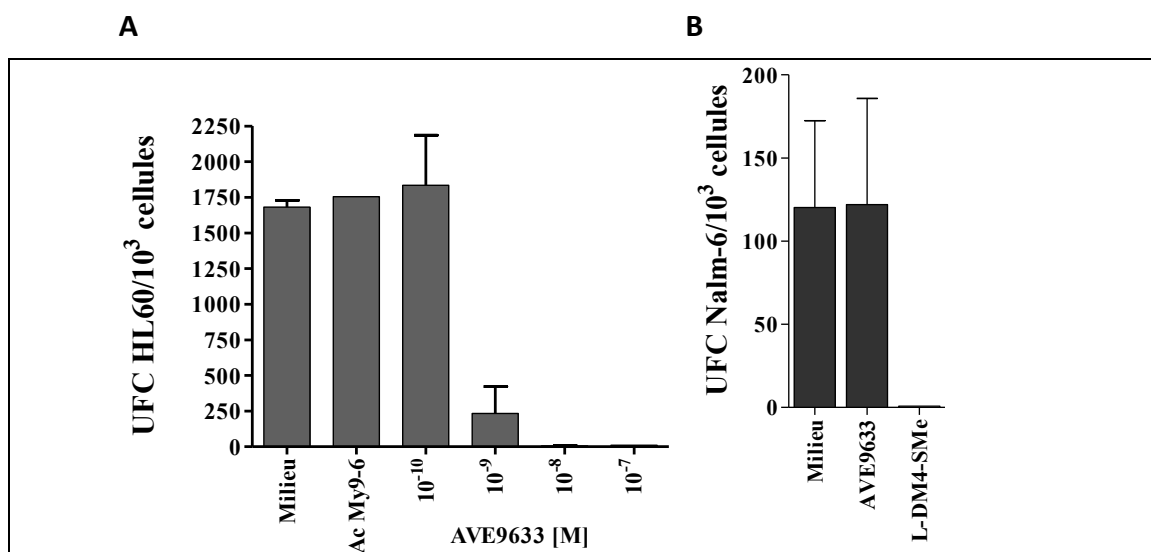
In vivo

Afin de déterminer l'efficacité *in vivo* de l'AVE9633, des souris NOD/SCID irradiées ont reçu par I.V. 10^7 cellules HL60. Divisé en 3 groupes, les souris ont été traitées à partir du 7^e jour après l'injection de cellules, 1 fois par semaine pour 4 semaines avec du PBS (cercle vide), l'anticorps huMy9-6 (triangle noir) ou l'AVE9633 (cercle noir). (Figure 11, page 34) Dans ces conditions, la dose maximale d'AVE9633 tolérée et utilisée pour cette expérience est de 10mg/kg. Le groupe de souris traité avec l'AVE9633 a une survie significativement prolongée comparativement au groupe PBS ou huMy9-6 où la totalité des souris sont mortes dans un délai de 25 jours.

Figure 8 : Efficacité de l'AVE933 contre des cellules leucémiques

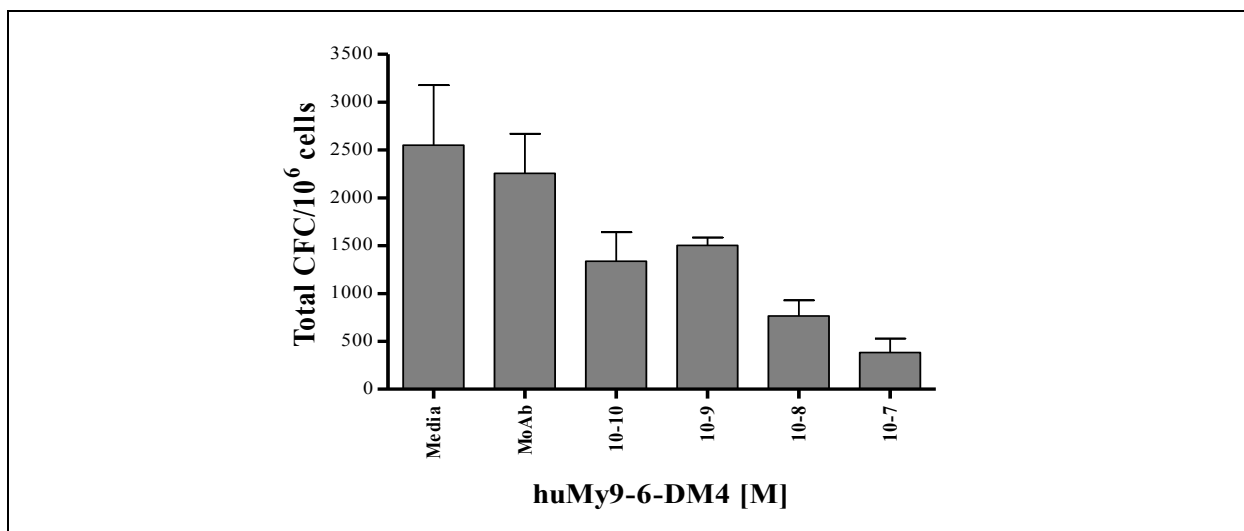
A) Inhibition dose-dépendante de la croissance des UFC de la lignée HL60 suite à un traitement à l'AVE9633

B) Élimination des cellules CD33⁻ Nalm-6 par le dérivé toxique; aucun effet de l'AVE9633



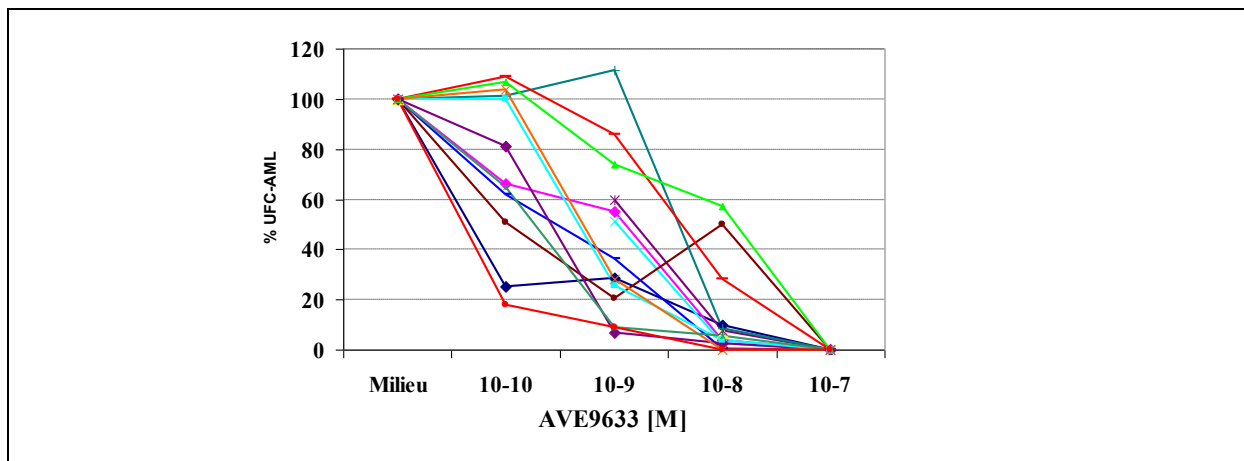
Légende: A) La lignée cellulaire HL60 a été incubée en présence d'AVE9633 à des doses de 10⁻¹⁰M à 10⁻⁷M, avec l'anticorps seul à 10⁻⁸M ou sans traitement pour 3 jours etensemencée en méthylcellulose. Le décompte des UFC a été fait 14 jours plus tard. B) La lignée cellulaire Nalm-6 CD33⁻ a été incubée avec l'AVE9633 à 10⁻⁹M, à une dose équivalente de toxine, ou sans traitement pour 3 jours etensemencée en méthylcellulose. Le décompte des UFC a été fait 14 jours plus tard

Figure 9 : Effet de l'AVE9633 sur les progéniteurs normaux de la moelle osseuse



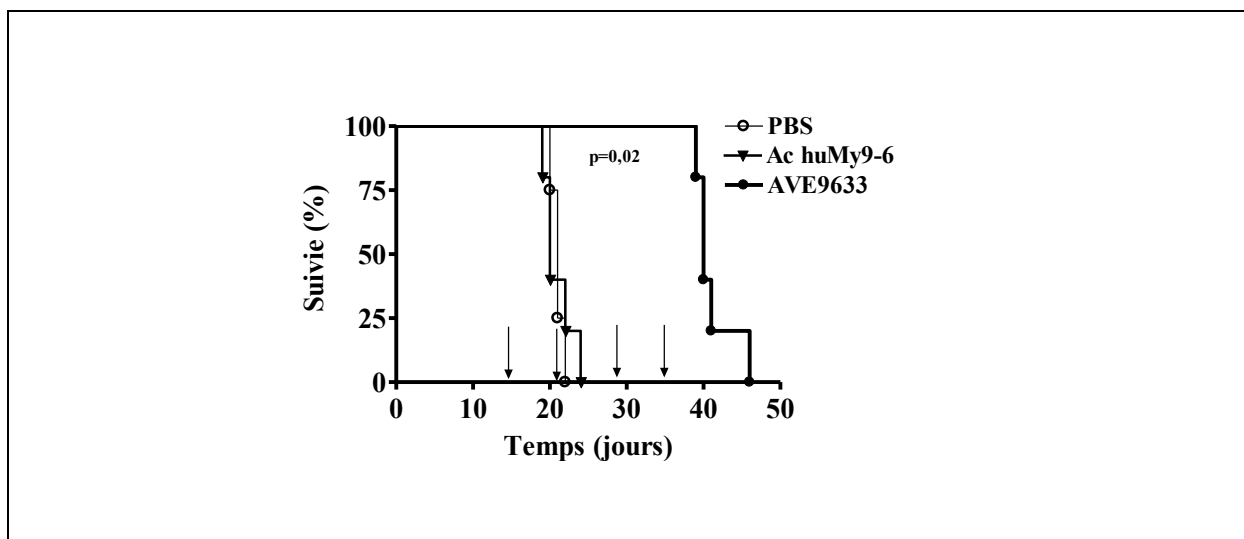
Légende: Des cellules mononuclées provenant de moelle osseuse normale ont été traitées avec l'AVE9633 à des doses de 10^{-10} M à 10^{-7} M, avec l'anticorps seul à 10^{-8} M ou sans traitement pour 5 jours. La viabilité a été évaluée et, pour chaque condition, un nombre égal de cellules vivantes a été ensemencées en méthylcellulose pour décompte des UFC 14 jours plus tard. Les résultats sont présentés comme le nombre total d'UFC par 10^6 cellules mises en culture.

Figure 10 : Effet de l'AVE9633 contre cellules primaires de patients LMA



Légende : Des cellules mononuclées provenant du sang ou de la moelle osseuse de patients LMA ont été traitées avec l'AVE9633 à des doses de 10⁻¹⁰M à 10⁻⁷M pour 5 jours. La viabilité a été évaluée et, pour chaque condition, un nombre égal de cellules vivantes a été ensemencées en méthylcellulose pour décompte des UFC 14 jours plus tard. Les résultats sont présentés comme le pourcentage d'UFC par rapport à la condition sans traitement normalisée à 100%.

Figure 11 : Efficacité de l'AVE9633 contre des cellules HL60 *in vivo*



Légende : Des souris NOD/SCID irradiées à une dose non-léthale ont été injecté I.V. avec 10^7 cellules HL60. 7 jours plus tard, les souris ont été traitées à 10mg/kg d'AVE9633, d'anticorps seul ou de PBS à raison d'une fois par semaine, pour 4 semaines. Quotidiennement, l'apparition de symptômes de maladie a été surveillée et si présent, les souris euthanasiées. Les résultats sont présentés en pourcentage de survie en fonction du nombre de jours écoulés depuis l'irradiation des souris, selon les groupes.

Résultats des études cliniques

Trois études de phase I ont été initiées en utilisant l'AVE9633 comme agent simple chez des patients atteints de LMA exprimant l'antigène CD33, en rechute ou réfractaire au traitement. Ces études avaient comme objectifs de déterminer la dose maximale tolérée, d'évaluer la sécurité du produit, d'établir le profil pharmacocinétique et pharmacodynamique ainsi que de récolter des données préliminaires sur l'activité anti-leucémique de l'AVE9633¹¹³. La première étude comprenait 22 patients et consistait en l'administration de 15 à 260 mg/m² au jour 1 d'un cycle de 21 jours; l'étude « Jour 1 ». 20 patients ont reçu l'AVE9633 selon l'étude « Jour 1/8 » soit 30 à 150 mg/m² au jour 1 et au jour 8 d'un cycle de 28 jours et 12 patients ont fait partie de l'étude « Jour 1/4/7 » soit 30 à 90 mg/m² au jour 1, 4 et 7 d'un cycle de 28 jours.

En relation avec l'administration du médicament, certains effets secondaires, d'intensité faible à modéré, ont été reportés tels des frissons, de la rigidité, de la fièvre, de l'hypotension et des vomissements. Trois patients ont souffert de bronchospasmes réversibles de stade 3-4, un patient de kératite réversible de stade 3 et 2 patients d'hépatotoxicité réversible de stade 3-4. Dans l'étude jour 1/8, 2 des 3 patients traités à 150 mg/m² par jour ont présenté des signes de toxicité de stade 3-4 alors qu'aucun signe de toxicité de ce stade n'a été détecté à la dose précédente de 130 mg/m². Cette dose a été établie comme étant la dose maximale tolérée dans ce contexte d'administration. Les 2 autres études ont été discontinuées avant la détermination de la dose maximale vu l'absence d'activité à des doses beaucoup plus élevées que la dose de saturation du CD33.

Deux patients participant à l'étude Jour 1/8 ont montré une réponse suite au traitement à l'AVE9633. Le premier patient avait préalablement reçu 2 traitements de chimiothérapie et a reçu l'AVE9633 à 105 mg/m² à raison de 2 doses par cycle durant 4 cycles. En rémission complète malgré le nombre de plaquette sous la normale, le patient a reçu 7 doses supplémentaires au jour 1 de chaque cycle suivant mais la progression de la leucémie à

entraîner l'arrêt de traitement. Le second patient a présenté une réponse au traitement a reçu 2 cycles à 130 mg/m² pour 2 doses et a atteint une rémission partielle d'une durée de 2.5 mois.

Les résultats cliniques recueillis par cette étude de phase I sont plutôt décevants étant donné la réponse de seulement 2 patients. Par contre, les résultats pharmacocinétiques et pharmacologiques obtenus permettront d'optimiser les caractéristiques optimales pour la prochaine génération d'immunoconjugués.

Similarités et différences entre le Mylotarg et l'AVE9633 : facteurs impliqués dans la réponse aux IC anti-CD33

Le Mylotarg et l'AVE9633 présentent deux différences majeures au niveau de leur structure : l'épitope ciblé par l'anticorps ainsi que l'agent toxique utilisé. L'IgG4 du Mylotarg cible l'épitope hP67.6 du récepteur CD33 alors que l'IgG1 de l'AVE9633 cible l'épitope My9-6. De plus, l'agent toxique du Mylotarg est la calicheamicine, molécule qui est réduite en 1,4-dehydrobenzene-diradical¹²⁸. En s'intercalant dans les petits sillons de l'ADN, le dérivé actif du Mylotarg entraîne une séquence d'événements menant à la cassure de l'ADN simple ou double brins¹²⁸. Tel que mentionné ci-haut, l'agent toxique de l'AVE9633 est dérivé de la maytansine et agit via l'inhibition des microtubules.

Malgré leurs différences, le Mylotarg et l'AVE9633 sont vus comme des compétiteurs directs par le fait qu'ils sont 2 immunoconjugués ciblant l'antigène CD33 dans un contexte de leucémie myéloïde aigue. Plusieurs hypothèses ont été suggérées dans le but d'expliquer la sensibilité/résistance des cellules leucémiques au Mylotarg et certaines d'entre elles pourraient aussi expliquer les résultats obtenus avec l'AVE9633.

À première vue, le niveau d'expression de l'antigène CD33 à la surface des cellules leucémiques semble être un facteur pertinent mais aucune corrélation n'a été rapportée

jusqu'à maintenant. Par contre, l'expression de l'antigène CD33 par des cellules retrouvées dans la circulation sanguine semble être un facteur de résistance associé à une moins bonne réponse au traitement par le Mylotarg¹²⁹. Le médicament serait séquestré au niveau sanguin et sa disponibilité diminuée au niveau de la moelle osseuse. On rapporte que la saturation des cellules blastiques de la moelle osseuse est significativement diminuée (40-90%) comparativement à la saturation des cellules sanguine en périphérie (>90%)¹²⁹.

La Pgp (MDR1 ou ABCB1) et la « multidrug resistance protein 1 » (MRP1) sont deux protéines caractérisées par leur capacité à expulser des médicaments hors de la cellule. La Pgp est exprimée sur 19 à 75% des cellules blastiques des patients LMA *de novo*¹³⁰. Plusieurs études ont démontré que les lignées cellulaires ou les cellules blastiques de patients LMA exprimant la Pgp sont résistantes à un traitement au Mylotarg. Une étude clinique de phase II avec le Mylotarg a rapporté que les cellules blastiques exprimant la Pgp corrèlent avec l'échec du traitement¹³¹. En parallèle, la MRP1 est surexprimée dans 7 à 30% des cas de LMA *de novo*¹³² et l'expression conjointe de la MRP1 et de la Pgp a été identifiée comme facteur de mauvais pronostic^{133, 134}. Malgré ces évidences, il semble que d'autres mécanismes importants sont impliqués car une combinaison d'inhibiteurs de la MRP1 et de la Pgp n'affecte pas la cytotoxicité de certains patients AML MRP1⁺ / Pgp⁺¹³⁰. De plus, l'activité de la Pgp est un facteur de résistance important pour la cytotoxicité de l'AVE9633 et du DM4 contre des cellules leucémiques, mais ne semble pas un mécanisme majeur de résistance pour les cellules leucémiques de patients atteints de LMA¹³⁵.

Les protéines de la famille anti-apoptotique Bcl-2 semblent aussi importantes dans la résistance au Mylotarg. La lignée cellulaire HL60 exprimant Bcl-2 ou Bcl-X_L sont relativement résistantes au Mylotarg et le PK11195, un ligand des récepteurs aux benzodiazépines qui promouvoit l'apoptose mitochondriale, augmente leur susceptibilité¹³⁶. Aussi, une activation déficiente des protéines Bak et Bax, protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, confère de la résistance à l'apoptose induite par le Mylotarg¹³⁷.

L'effet inhibiteur des anticorps monoclonaux anti-CD33 corrèle avec l'expression de Syk et/ou ZAP-70¹³⁸. De plus, il a été rapporté que l'activité cytotoxique du Mylotarg contre la LMA corrèle avec l'expression de la protéine kinase Syk¹³⁹. La protéine Syk semble impliquée dans la voie de signalisation du récepteur CD33 dans les cellules myéloïdes normales et dans les lignées cellulaires LMA¹⁴⁰. Syk est un suppresseur de tumeur et son expression a été montrée comme déficiente dans des cas de leucémie lymphoblastique aigue^{141, 142}, de lymphome de Hodgkin¹⁴³ et de cancer du sein^{144, 145}.

Le cycle cellulaire est aussi un facteur important de la sensibilité des cellules LMA. Les cellules non prolifératives retrouvées en G₀ sont moins affectées par la cytotoxicité induite par le Mylotarg alors que la sensibilité des cellules au repos est augmentée lors de leur entrée dans le cycle cellulaire¹⁴⁶. Il a été suggéré qu'une combinaison de traitements avec une cytokine ou autres facteurs capables de stimuler la prolifération des cellules blastiques pourrait augmenter la réponse au traitement¹²⁸. Utilisant un agent toxique ciblant les microtubules, l'activité au niveau du cycle cellulaire est particulièrement importante dans la sensibilité des cellules LMA traitées avec l'AVE9633.

Orr et al ont proposé que la réponse au CD33 est bloquée par la protéine « suppressor of cytokine signaling 3 » (SOCS3) via une dégradation du récepteur CD33 et de SOCS3 par le protéasome¹⁴⁷. Comme mentionné ci-haut, il est important que l'agent toxique soit libéré de l'anticorps afin de modifier l'intégrité cellulaire. Ce processus est pH dépendant et semble se produire au niveau du lysosome. La protéine SOCS3 pourrait donc jouer un rôle important dans la réponse aux immunoconjugués anti-CD33 en modifiant le transport du complexe CD33-IC vers le lysosome.

La protéine SOCS3 : Importante pour la réponse aux IC?

La famille des SOCS comprend 8 membres (CIS, SOCS1 à 7) qui sont composés d'un domaine N-terminal de taille variable, d'un domaine central SH2 et d'un domaine C-terminal

contenant la boîte SOCS. La boîte SOCS est présente dans plus de 40 protéines provenant de 9 familles différentes soit la « ankyrine-repeat proteins with a SOCS box » (ASB), la « SPRY-domain proteins with a SOCS box » (SSB), la « WD40-repeat proteins with a SOCS box » (WSB), la « tubby-domain proteins with a SOCS box », la famille Rar faisant parties des petites protéines de types GTPases, la famille de protéines « Neuralized » ainsi que d'autres protéines diverses ¹⁴⁸. Contrairement aux protéines SOCS standard, ces familles de protéines ne contiennent pas de domaine SH2 en aval de la boîte SOCS mais d'autres domaines aussi impliqués dans les interactions protéines-protéines suggérant des rôles biochimiques variés ¹⁴⁹.

La fonction proposée pour la boîte SOCS a été comparée à celle de la boîte F. La boîte F fait partie du complexe ubiquitine ligase SCF (Skip1 - Cullin-1 - F-box), membre de la famille des E3 ubiquitine ligase, celle-ci étant la plus étudiée ¹⁵⁰. En référence au complexe SCF, le complexe contenant la boîte SOCS a été nommé ECS pour « Elongin-C – Cullin - SOCS box » et chaque composante du complexe ECS retrouve un analogue dans le complexe SCF. Dans ce contexte, la liaison de la boîte F à son substrat nécessite une reconnaissance de la protéine cible suite à une modification post-translationnelle, généralement la phosphorylation d'une sérine ou d'une thréonine ¹⁴⁹. Suite à cette phosphorylation, le domaine d'interaction protéine-protéine en aval de la boîte F reconnaît la protéine cible et permet ainsi à la boîte F de lier Skip1 et indirectement la protéine Roc1 contenant un doigt RING via la Culline-1 ¹⁴⁹. L'ubiquitination de la protéine cible est médiée par 3 unités enzymatiques : E1, E2, E3. E1 active l'ubiquitine et la transfère sur la E2 via une liaison thiol-ester d'un résidu cystéine ¹⁵⁰, ¹⁵¹. L'ubiquitine est ensuite transférée sur un ou plusieurs groupements lysine de la protéine cible par une réaction catalytique via la E3 ¹⁵⁰, ¹⁵¹. En parallèle, la boîte SOCS interagit avec les élongines B et C suite à la reconnaissance de résidus tyrosines phosphorylés au niveau d'un récepteur. Il semble que l'interaction entre les élongines B et C et la boîte SOCS est importante pour la stabilisation de la protéine SOCS ¹⁵². L'élongine C interagit ensuite avec Roc1 via un membre de la famille Cullin (Cul-2 ou Cul-5) ¹⁴⁹. Jouant un rôle analogue au complexe SCF, la formation de ce complexe ECS permet l'ubiquitination de la protéine cible.

Les protéines SOCS sont généralement induites en réponse à différentes cytokines et hormones dont l'activation des récepteurs induit la voie JAK/STAT^{148, 153} mais aussi par d'autres facteurs tels les lipopolysaccharides, l'insuline, les facteurs de croissance endothéliale (EGF) et les facteurs de cellules souches (SCF)¹⁵⁴⁻¹⁵⁶. Les protéines SOCS sont des inhibiteurs de ces voies de signalisation et exercent leur effet par différents mécanismes. Les SOCS peuvent se lier aux résidus tyrosines phosphorylés des récepteurs ou à ceux des JAK activées et ainsi bloquer par compétition le recrutement des facteurs STAT^{157, 158}. Elles peuvent bloquer l'activité catalytique des tyrosines kinases JAK elles-mêmes en bloquant les tyrosines d'auto-activation de ces enzymes^{157, 158}. Finalement, via la boîte SOCS, elles peuvent entraîner la dégradation de leur cible par la voie dépendante du protéasome suite à l'ubiquitination de la protéine cible par le complexe ECS ligase^{157, 158}. Les différentes protéines contenant la boîte SOCS participent au complexe ubiquitine E3 ligase avec une spécificité dictée par le domaine d'interaction protéine-protéine en aval de la boîte SOCS.

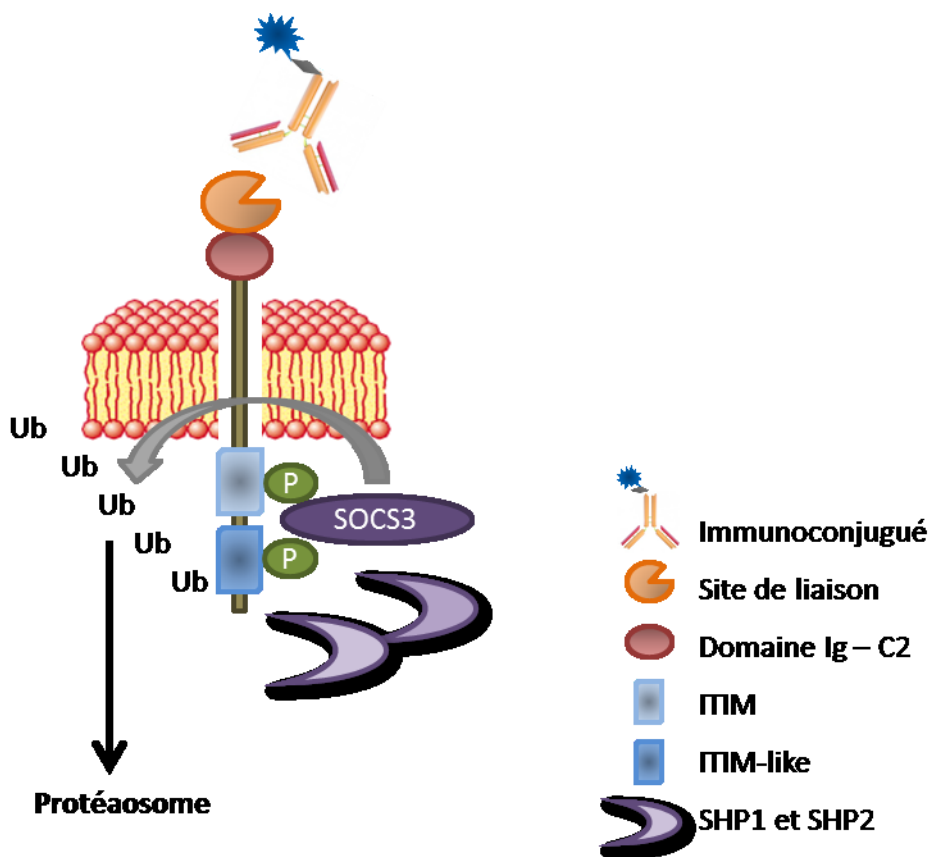
La protéine SOCS3 est très homologue à SOCS1 et est préférentiellement exprimée dans les cellules du système immunitaire¹⁵⁷. Il a été montré qu'une thérapie intracellulaire utilisant la protéine SOCS3 inhibe l'inflammation et l'apoptose¹⁵⁹. Aussi, les souris déficientes en SOCS3 meurent au stade embryonnaire d'anomalies du développement placentaire¹⁶⁰ et on a reporté une érythrocytose massive confirmant que SOCS3 joue un rôle critique dans la régulation négative de l'hématopoïèse fétale¹⁶¹. L'expression constitutive de SOCS3 confère de la résistance aux cellules leucémiques face à un traitement à l'IFN¹⁶² mais agit en suppresseur de tumeur dans les cellules de cancer du sein¹⁶³.

En 2009, Orr et al. ont associé SOCS3 à la régulation de récepteurs inhibiteurs tels le CD33. Ils ont démontré que la protéine SOCS3 pouvait se lier aux motifs ITIM phosphorylés du CD33 et accroître la dégradation du CD33 et de SOCS3 via la sous-unité 26S du protéasome. D'une façon similaire, SOCS3 bloque la réponse du Siglec 7 en le dirigeant vers une dégradation par le protéasome¹⁶⁴. De plus, une étude a suggéré que la séquence d'administration et la méthylation des îlots CpG du promoteur associé au gène SOCS3 pourraient diriger la réponse

au Mylotarg en combinaison avec de la chimiothérapie standard chez les patients avec une LMA réfractaire en rechute ¹⁶⁵.

Avec ces informations, nous avons postulé que la protéine SOCS3 pourrait jouer un rôle dans la réponse des patients LMA face aux immunoconjugués anti-CD33 (Figure 12, page 41).

Figure 12 : Schématisation de l'ubiquitination du récepteur CD33 par la protéine SOCS3 suite à la liaison de l'immunoconjugué



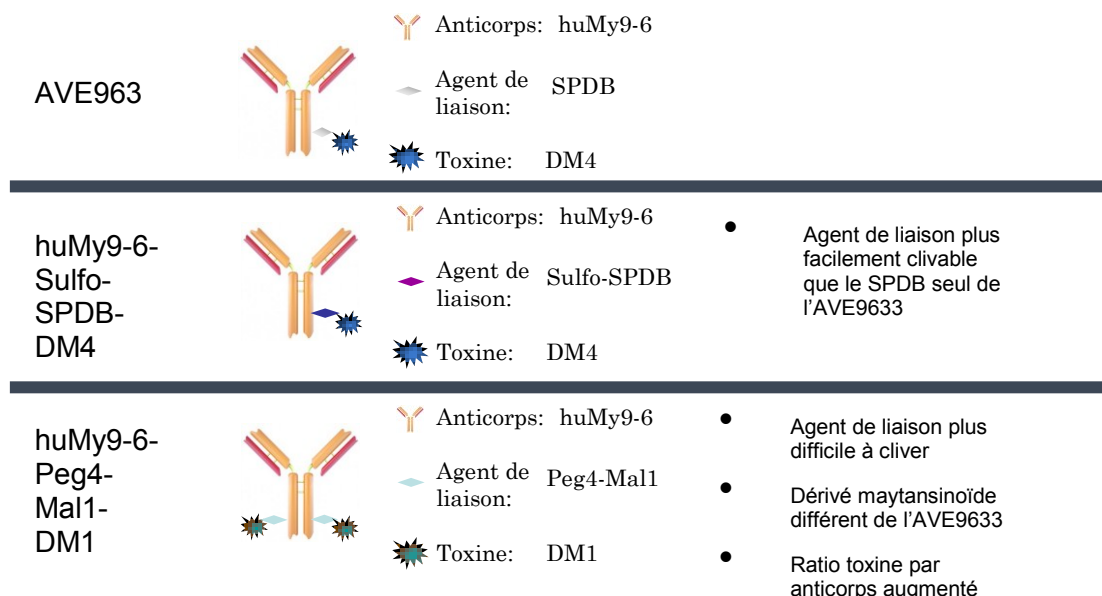
Création de deux nouveaux immunoconjugués anti-CD33

Suite à l'analyse des éléments de pharmacocinétique et de pharmacodynamique obtenus avec les études cliniques de l'AVE9633, Immunogen a développé deux nouveaux immunoconjugués (IC) anti-CD33 (Figure 13, page 43). Leur structure est similaire à celle de l'AVE9633 (huMy9-6-SPDB-DM4), utilisant le même anticorps monoclonal humanisé. Par contre, des variantes ont été apportées au niveau de l'agent de liaison et du dérivé maytansinoïde.

Le premier IC, huMy9-6-Sulfo-SPDB-DM4, possède un groupement sulfo supplémentaire au niveau de l'agent de liaison. Ce groupement supplémentaire devrait faciliter le clivage de l'agent de liaison par la cellule et ainsi favoriser la relâche de la toxine.

Le deuxième IC, huMy9-6-Peg4-Mal1-DM1, est composé d'un agent de liaison différent ainsi qu'une variante DM1 comme agent toxique. Le Peg4-Mal1 est un agent de liaison hydrophile sur une base maléimide et le métabolite actif résultant sera alors plus hydrophile¹⁶⁶. Cette stratégie a été adoptée dans l'optique de contrer l'effet de la pompe MDR1, connue pour reconnaître et transporter hors de la cellule une grande variété de composantes, majoritairement des substrats hydrophobes¹⁶⁷. De plus, l'agent toxique utilisé, le DM1, est retrouvé à un ratio toxine / anticorps environ 2 fois plus élevé que sur les immunoconjugués standards, soit environ 7-8 molécules de DM1 sont présentes par molécule d'anticorps.

Figure 13 : Schématisation des 3 immunoconjugués anti-CD33 et leurs variantes



Description du projet de recherche et hypothèses

Mon projet de maîtrise consiste à déterminer l'efficacité des 2 nouveaux immunoconjugués anti-CD33 par rapport à celle de l'AVE9633. L'objectif est de prévoir quel immunoconjugué présente le plus de potentiel d'élimination des cellules de LMA. Les évaluations biologiques à réaliser devraient aussi permettre d'évaluer les hypothèses qui sous-tendent les 2 différentes stratégies de modification des immunoconjugués proposées plus haut. En effet, le premier IC, huMy9-6-Sulfo-SPDB-DM4, possède un agent de liaison plus facilement clivable ce qui laisse suggérer que l'élimination des cellules leucémiques devraient être supérieure. Par contre, est-ce qu'il y a un risque pour un découplage prématuré de la toxine et ainsi une toxicité non spécifique? Le deuxième IC, l'huMy9-6-Peg4-Mal1-DM1, possède un agent de liaison complètement différent résultant en un dérivé toxique plus hydrophile. De plus, la quantité d'agent toxique est doublée par rapport aux 2 autres IC. Nous croyons que ces caractéristiques se traduiront par une efficacité supérieure de huMy9-6-Peg4-Mal1-DM1. S'il s'avère que les 2 nouveaux IC se montrent supérieurs à l'AVE9633, il serait intéressant de confirmer ces résultats dans une étude clinique.

De plus, j'ai étudié les différents mécanismes cellulaires qui pourraient expliquer l'hétérogénéité de la réponse au traitement et par le fait même la résistance de certains patients LMA au traitement. Mieux comprendre le processus intracellulaire des IC et les protéines impliquées est nécessaire. L'élucidation de ces mécanismes pourrait permettre d'identifier des caractéristiques importantes lors de la création de nouveaux immunoconjugués. Aussi, ces informations pourraient être utiles afin de sélectionner les patients les plus susceptibles de répondre à un traitement avec un IC anti-CD33.

De multiples mécanismes de résistance ont été proposés pour expliquer l'hétérogénéité/résistance des cellules LMA aux IC anti-CD33. Nous nous sommes penchés

plus précisément sur la quantité de sites antigéniques retrouvés à la surface des cellules leucémiques ainsi que la rapidité de ces cellules à internaliser l'anticorps huMy9-6. Nous avons postulé qu'une quantité élevée de sites antigéniques ainsi qu'une plus grande rapidité d'internalisation devrait permettre une meilleure élimination des cellules leucémiques.

Aussi, afin de mieux comprendre les mécanismes intracellulaires, nous avons déterminé si la contribution du lysosome est essentielle à l'efficacité des IC à bloquer la division cellulaire en G₂/M et ainsi provoquer la mort cellulaire.

Dans cet ordre d'idées, nous avons vérifié l'impact de la présence/absence de la protéine SOCS3. Selon Orr et al, cette protéine se lie au CD33 phosphorylé et bloque la réponse en entraînant le CD33 vers le protéasome, ce qui conduit à sa dégradation. Nous nous sommes donc demandés si la présence de la protéine SOCS3 pourrait jouer un rôle dans la résistance des LMA. Ainsi l'expression de la protéine SOCS3 pourrait interférer dans le transport intracellulaire de l'IC vers le lysosome et par conséquent, nuire au relâchement de la toxine.

Finalement, nous avons évalué par microscopie le cheminement du conjugué au cours du temps. La visualisation intracellulaire nous a permis de confirmer quelles sont les composantes de la voie endosomale impliquées dans le transport du conjugué.

Toutes ces informations devraient nous permettre de mieux comprendre les différents mécanismes impliqués dans l'élimination des cellules leucémiques LMA face à un traitement avec un immunoconjugué contre le récepteur CD33.

Contributions des auteurs à l'article

L'article suivant a été entièrement rédigé par Isabelle Savoie Rondeau, sous supervision du directeur de recherche Denis Claude Roy. Les résultats présentés ont été générés majoritairement par Isabelle Savoie Rondeau. Radia Sidi Boumédine a produit les résultats concernant l'internalisation de l'anticorps anti-CD33 par les lignées cellulaires LMA et participé aux expériences sur la sensibilité des cellules de patients et de lignées aux immunoconjugués.

Présentation de l'article

Sensitivity of leukemia cells to anti-CD33 immunoconjugate

État: En préparation

Revue: Leukemia

Introduction

Acute myeloid leukemia (AML) is characterized by an increase in the proliferation of myeloid precursors with arrested differentiation and accumulation of myeloid blasts in the bone marrow. Although conventional chemotherapy induces complete remission in 70 to 80% of adult patients with AML, most of the patients relapse and ultimately die of treatment-refractory disease within 2 years¹⁶⁸. Novel drugs and strategies are required, especially for the elderly who respond poorly to standard treatment. Immunoconjugates (IC) represent an interesting therapeutic strategy, since it affords direct targeting of the cytotoxic drug to leukemia cells through specific binding to an antibody. This targeted approach is therefore likely to prevent the systemic toxicity associated with conventional chemotherapy.

The CD33 antigen is expressed on 85-90% of AML patients blast cells including leukemic clonogenic precursors, whereas hematopoietic stem cells, lymphoid and non-hematopoietic cells do not express this molecule¹⁰³. This is probably the reason why neither naked anti-CD33 antibodies nor antibody conjugates ablate hematopoiesis, rendering CD33 an appropriate target for the treatment of AML¹²⁸. CD33 is a transmembrane glycoprotein of 67KDa member of the immunoglobulin superfamily subset of sialic acid binding immunoglobuline-related lectins (Siglecs; CD33 is also referred to Siglec-3). The cytoplasmic tail of the inhibitory receptor CD33 contains immune tyrosine-based inhibitory motifs (ITIM) and ITIM-like¹⁰². Ligand induced tyrosine phosphorylation of these motifs and generates an inhibitory signal by recruitment and activation of Src homology 2 (SH2) containing phosphatases (SHP-1/2)^{106, 112}. Engagement of CD33 on chronic and acute myeloid leukemia cells results in inhibition of proliferation and activates a process leading to apoptosis of these cells^{110, 111}. Although it has been shown that the CD33 is a sialic acid-binding receptor, its natural ligand and biologic function are not elucidated.

Sanofi Aventis and ImmunoGen Inc developed three novel immunoconjugates targeting the CD33 antigen, huMy9-6-SPDB-DM4 (AVE9633), huMy9-6-Sulfo-SPDB-DM4, huMy9-6-Peg4-Mal1-DM1. All three IC are composed of the anti-CD33 monoclonal antibody huMy9-6 linked to cytotoxic derivatives of maytansine, DM1 or DM4 molecules. Immunoconjugates binding to CD33 induce endocytosis of the antibody-bound conjugate and processing through the lysosome results in the release of the potent antitumor maytansinoid derivative¹²⁵. Cellular metabolites of maytansine-antibody conjugates induce a mitotic arrest by suppressing microtubule dynamic instability by binding to microtubules^{117, 127}.

Interestingly, Orr and al. suggested that CD33 responses are blocked by suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) through accelerated proteasomal-mediated turnover and that tumor expressing SOCS3 may be refractory to an anti-CD33 therapy¹⁴⁷. SOCS3 is part of the SOCS proteins (CIS, SOCS1-7) known to inhibit the JAK/STAT pathway, ensuring that cytokine responses are regulated. SOCS3 binds via its SH2 domains to ITIM-like motifs on cytokine receptors^{169, 170}. Its SOCS box, which also binds to elongin and cullin, can act as an E3 ligase and degrades associated proteins via the 26S proteasome. SOCS3 is thought to compete with SHP-1/2 for binding since the SOCS3 SH2 domain exhibits ~ 40% homology to the SH2 domain of SHP-1/2.

In this report, we present data on the efficacy of anti-CD33 immunoconjugates to eliminate various AML cell lines and primary AML patient cells. We show that binding of huMy9-6 antibody to CD33 induces rapid internalization and that it is first processed through the endosome. Also, we confirm that lysosomal processing is essential for the IC induced antimitotic effect. Finally, we provide evidence that SOCS3 protein may play a role in the resistance of AML cells to anti-CD33 therapy.

Materials and methods

Cell lines

The 3 variant HL60 cell lines and the NB4 cell line are human acute promyelocytic leukemia cells and were maintained in RPMI-1640 medium (Life Technologies, Burlington, Canada) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Hyclone Laboratories, Logan, Utah, USA), 100 U/ml penicillin, 100 ug/ml streptomycin and 2 mM L-Glutamine (all from Life Technologies). The erythroleukemia cell line TF-1 was maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 100 U/ml penicillin, 100 ug/ml streptomycin and 2 ng/ml GM-CSF (Peprotech, Montreal, Canada). Myeloblast KG1a cell line was maintained in IMDM medium (Life Technologies) 10% heat-inactivated FBS, 100 U/ml penicillin and 100 ug/ml streptomycin.

AML patient cells samples

Thawed aliquots of frozen samples of density-gradient isolated mononuclear cells from blood of AML patients were used. Aliquots were obtained from the «Banque de Cellules Leucémiques du Québec» (BCLQ) and all patients signed informed consent.

Antibody and Immunoconjugates

Anti-CD33 antibody (huMy9-6) and all three immunoconjugates (huMy9-6-SPDB-DM4 (AVE9633), huMy9-6-Sulfo-SPDB-DM4, huMy9-6-Peg4-Mal1-DM1) were provided by Immunogen, Inc., Cambridge, Massachusetts.

Cytotoxicity of immunoconjugates on cell lines

Cells were taken during the log phase of growth and cultures were either treated with huMy9-6-SPDB-DM4, huMy9-6-Sulfo-SPDB-DM4, huMy9-6-Peg4-Mal1-DM1 at concentrations varying from 10^{-12} M to 10^{-7} M. Drug induced cytotoxicity was determined using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) cell proliferation assay (ATCC™, Manassas, VA, USA). Briefly, cells were plated in triplicate in 96-well flat-bottom plate and incubated for 3 days at 37°C. 10 ul of MTT reagent was added to each well and incubated at 37°C from 2 to 4 hours, until formation of intracellular punctate purple precipitate. 100 ul of detergent was added and, after overnight incubation at room temperature, absorbance at 570 nm was measured. Cytotoxicity against clonogenic cells was evaluated by enumerating leukemia colony forming cells (L-CFC) after 14 day cultures at 37°C in a methylcellulose-based medium (Methocult) (Stemcell Technologies Inc, Vancouver, Canada). Results were reported as % of untreated cells.

Elimination of primary AML patient cells by immunoconjugates

Patient cells were seeded at 2×10^6 cell/ml in RPMI-1640 medium supplemented with 20% heat-inactivated FBS (Hyclone Laboratories Inc) and 50 ng/ml G-CSF (Amgen Inc, Thousand Oaks, CA, USA). Cultures were either treated with huMy9-6-SPDB-DM4, huMy9-6-Sulfo-SPDB-DM4 or huMy9-6-Peg4-Mal1-DM1 at concentrations ranging from 10^{-10} M to 10^{-7} M, and incubated at 37°C. After a 5-day cultures, viability was measured using Trypan blue (Life Technologies) and cells harvested and plated in Methocult for 14 days.

Cell cycle studies

HL60 cells were plated at 1×10^6 cell/ml in 6-well plates and treated with 1×10^{-8} M huMy9-6-Peg4-Mal1-DM1, 30 nmol/L of Bafilomycin A1, 66 nmol/L of Nocodazole, 1 mg/ml of

Leupeptin hydrochloride, 1 ug/ml of Pepstatin or 20 ug/ml of E64 (all from Sigma Aldrich, Oakville, Canada). After 6h incubation at 37°C, cells were washed, resuspend in 300 ul PBS and fixed by adding 700 ul cold 70% EtOH and stored at 4°C for 24 to 72h. Expression of phospho-histone H3 was analyzed by intracellular staining and cell cycle distribution according to DNA content using propidium iodide (PI) staining. Briefly, cells were washed, stained 20 min at room temperature with phospho-histone H3 antibody (BD Biosciences, Mississauga, Canada), treated with 50 ug of RNaseA (Sigma Aldrich) and incubated at 37°C for 30min. 450 ul of a solution containing 5 ug of PI (Sigma Aldrich) was added and cells were analyzed by flow cytometry. The percentage of cells expressing phospho-histone H3 and cells in G₀/G₁, S and G₂/M phases of the cell cycle were calculated using the Diva software (BD Biosciences).

CD33 quantitation

CD33 expression was determined by staining 2.5×10^5 cells with anti-CD33 APC (BD Biosciences). CD33 quantitation was assessed using the Quantum™ Simply Cellular® kit (Bangs Laboratories, Inc, Fishers, IN, USA). Briefly, 5 bead populations of known antigen binding capacity (ABC) were stained in the same conditions used to label the cell samples. A standard curve was constructed by plotting the known ABC values of each bead population against the median channel. ABC values of cell samples were assessed using this standard curve.

Internalization of antibody-bound CD33

HuMy9-6 antibody was labeled with the fluorescent molecule Alexa Fluor 488 (Molecular Probes Labeling Kit, Life Technologies). Alexa Fluor 488 is insensitive to pH from 4 to 10 which is important since lysosomes could fuse with endosomes after internalization of the

antibody. AML cell lines were treated with 1×10^{-8} M huMy9-6-AF488 for 30 min on ice, and cells incubated in antibody-free medium at 4°C for controls or at 37°C for up to 24 hours to allow internalization of antibody-bound CD33. Remaining signal from the cell surface bound fluorescent anti-CD33 antibody was suppressed with anti-Alexa Fluor 488 antibody (Life Technologies). Residual fluorescence was a direct indication of internalized huMy9-6-AF488. Internalization % was calculated as $((\text{MFI huMy9-6-AF488} + \text{anti-AF488}) / (\text{MFI huMy9-6-AF488}) \times 100)$ at 37°C – $((\text{MFI huMy9-6-AF488} + \text{anti-AF488}) / (\text{MFI huMy9-6-AF488}) \times 100)$ at 4°C.

For microscopic visualisation, cells were harvested, fixed with paraformaldehyde (PFA) 4% for 20 minutes, washed with PBS 0.1% BSA and cytospun on slides. Before staining, slides were fixed for 11 min with PFA 4%, washed twice with PBS, permeabilized for 30 min with Triton X-100 0.5% and washed twice. Cells were incubated overnight at 4°C with anti-Rab7, anti-EEA1 (both from Sigma Aldrich) or anti-giantin (Covance Inc, Montreal, Canada), washed and incubated with anti-mouse AF594 or anti-rabbit AF594 for 2hrs at room temperature. Cell preparations were covered with mounting medium with dapi (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and underwent microscopic analysis.

SOCS3 and CD33 expression

Cells were lysed on ice in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% v/v Triton X-100 and protease inhibitor cocktail (Roche Applied Science, Laval, Canada)). Cell lysates were clarified by centrifugation at 4°C, and supernatants harvested. Whole-cell lysates were separated by SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes and probed with anti-SOCS3 (Cell Signaling, Danvers, MA, USA), anti-actin (BD Biosciences), anti-CD33 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) antibodies followed by anti-rabbit or anti-mouse horseradish peroxidase (HRP)-labeled secondary antibodies (Cell Signaling). Proteins were

visualized using the enhanced chemiluminescence substrate (ECL) detection (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA).

Methylation status of SOCS3

Genomic DNA was isolated from cell lines using the Dneasy Blood & Tissue Kit (Qiagen®, Ontario, Canada). Digestion of DNA by methylation-sensitive and/or methylation-dependent enzyme was measured by qPCR (EpiTect Methyl qPCR Assay, Qiagen). Remaining DNA was quantified by real-time PCR using primers flanking the region of interest. Relative fractions of methylation status (unmethylated, intermediate methylated or hypermethylated) were determined by comparing amounts in each digest with a non-digested control.

Results

Elimination of leukemia cell lines

The efficacy of the 3 conjugates was first evaluated by measuring their cytotoxic activity against 6 AML cell lines. For this purpose, leukemia cells were exposed for 72 hours to various concentrations of each conjugate. All three ICs eliminated AML cell lines in a concentration-dependent manner (Figure 1 A,B,C). HL60HMR and HL60Qc were eliminated efficiently with huMy9-6-Peg4-Mal1-DM1 being the most active IC. Indeed, treatment with the latter IC at 5×10^{-11} M only was sufficient to eliminate 50% of the cells (EC50) compared to an EC50 of 7×10^{-10} M for AVE9633 and 3×10^{-10} M for huMy9-6-Sulfo-SPDB-DM4. Although AVE9633 and huMy9-6-Sulfo-SPDB-DM4 were as efficient at eliminating HL60/S and TF1 cell lines, huMy9-6-Peg4-Mal1-DM1 treatment was not active against HL60/S cells with an EC50 near the values of the CD33⁻ KG1a control cell line. Non-specific killing of KG1a cells only occurred at very high concentration (EC50 of 1×10^{-8} M and over) confirming the selectivity of the immunoconjugates for CD33 expressing cells. These results suggest that the efficacy of huMy9-6-Sulfo-SPDB-DM4 and AVE9633 against all 5 cell lines expressing CD33 antigen is similar, although huMy9-6-Sulfo-SPDB-DM4 is slightly more efficient than AVE9633. In contrast, the elimination profile of huMy9-6-Peg4-Mal1-DM1 was different as it was particularly efficient at eliminating both HL60HMR and HL60Qc cell lines but less efficient against HL60/S.

Impact of ICs on clonogenic leukemia cells

To determine whether ICs were as efficient at eliminating AML clonogenic cells as their progeny, AML cells were treated with IC for 3 days and the presence of L-CFU measured after 14-day cultures in methylcellulose. In comparison to huMy9-6-Sulfo-SPDB-DM4 and AVE9633, huMy9-6-Peg4-Mal1-DM1 caused greater elimination of clonogenic HL60HMR and

HL60Qc cells, with 10^{-9} M of the latter IC completely eliminating L-CFU (Figure 2). However, approximately 70% of HL60/S clonogenic cells were resistant to treatment with 10^{-8} M huMy9-6-Peg4-Mal1-DM1. The same HL60/S clonogenic cells were also the most resistant to the other 2 ICs.

Taken together, these results demonstrate that huMy9-6-Peg4-Mal1-DM1 is the most active against 2 leukemia cell lines, but the least active against the most resistant cell line.

Immunoconjugate cytotoxicity against clonogenic AML patient cells

To determine whether cytotoxicity observed against AML cell lines would translate into immunoconjugate activity against patient cells, we evaluated the ability of the conjugates to eliminate primary AML cells. Peripheral blood AML cells from 11 patients were treated with the 3 ICs at concentrations ranging from 10^{-10} M to 10^{-7} M for 5 days and plated in methylcellulose. All three ICs eliminated primary AML patient cells in a concentration-dependent manner (Figure 3 A,B,C) More than 50% of CFU were eliminated in 8/11 (73%) patients treated at 10^{-9} M AVE9633 or huMy9-6-Sulfo-SPDB-DM4 compared to only 5/11 (45%) of patients treated with huMy9-6-Peg4-Mal1-DM1. Also, only 2 patients treated with AVE9633 or huMy9-6-Sulfo-SPDB-DM4 compared to 5 patients treated with huMy9-6-Peg4-Mal1-DM1 had more than 15% L-CFU after treatment at 10^{-8} M. At 10^{-7} M, huMy9-6-Sulfo-SPDB-DM4 was the most cytotoxic against L-CFU (average of 99.8% elimination) compared to AVE9633 (92.2%) and huMy9-6-Peg4-Mal1-DM4 (90.8%). Interestingly, huMy9-6-Peg4-Mal1-DM1 was the only IC to exert a significant impact on 2 AML patient cells when used at the lowest dose (10^{-10} M). Altogether, our results indicate that huMy9-6-Sulfo-SPDB-DM4 was as efficient as AVE9633 at eliminating primary AML patient cells. Also, huMy9-6-Peg4-Mal1-DM1 was the least active at intermediate concentrations, but more active than the other 2 conjugates at the lowest concentrations. These findings indicate that AML patient cells are particularly heterogeneous in terms of response to IC treatment.

Impact of CD33 expression on sensitivity to IC

We then tried to investigate cellular mechanisms underlying IC resistance. CD33 expression at cell surface being crucial for IC activity, we first hypothesized that cells expressing high levels of CD33 antigen could bind greater numbers of ICs and be more sensitive to IC treatment. To investigate this possibility, AML cell lines and AML primary patient cells were stained with anti-CD33 antibody in parallel with 5 bead populations of known antibody binding capacity (ABC). Determination of the ABC values of cell samples was assessed using a standard curve created with the ABC values of each bead population. We found that all cell lines and patient cells expressed CD33 antigen on at least 90% of the cells. TF-1 cell line was found to express high level of CD33 (478 802 ABC \pm 12 623) compared to NB4 (98 108 ABC \pm 3308) while both of them have similar response to the conjugates (data not shown). Despite their different sensitivities to ICs, all three HL60 cell lines showed similar ABC values. As mentioned earlier, KG1a cell line was used as a negative control as it does not express the CD33 antigen. Primary AML patient cells were found to have a median ABC value of 47 111 (range 16 239 – 99 088). As shown in Figure 4, the level of CD33 expression on AML cell lines (A,B,C) and on primary AML patient cells (D,E,F) did not reflect sensitivity to IC treatment.

Internalization of antibody-bound CD33 in AML cell lines

To determine if IC internalization rates affected biologic activity, antibody uptake by AML cell lines was measured using huMy9-6 antibody labelled with the fluorescent molecule Alexa Fluor 488. After 30 min incubation with 1×10^{-8} M of huMy9-6-AF488, cells were incubated in antibody-free medium at 37°C to allow internalization of antibody-bound CD33 up to 24 hours. Remaining cell surface CD33 associated with the fluorescent antibody was suppressed with anti-Alexa Fluor 488 antibody, the residual fluorescent signal providing a direct indication of internalized huMy9-6-AF488. As shown in Figure 5, internalization rates after

one hour incubation ranged from 7 to 11% for HL60 variants, 23% for NB4 and 35% for TF-1 cell line. The rapid internalization of anti-CD33 antibody by TF1 cells correlated with its high level of CD33 expression. In contrast, the lowest CD33 expressing cells, NB4, was the only one reaching 60% of antibody internalization at 24 hours. In spite of their high sensitivity to IC, HL60HMR and HL60Qc cell lines did not demonstrate increased internalization rates in comparison to the more resistant cells (HL60/S, NB4 or TF-1).

To visualize the intracellular processing of anti-CD33 antibody, HL60HMR cells were harvested at different time points after incubation with huMy9-6-AF488 and monitored for localization in organelles of the endosomal pathway. Anti-CD33 antibody accumulated at the cell membrane after 10 to 20 min of incubation (Figure 6). Internalization of huMy9-6-AF488 in the cytoplasmic region started after approximately 40 min. The accumulation of anti-CD33-AF488 inside the cells colocalized predominantly with the early endosome. No colocalization with Golgi apparatus was detected (data not shown). These results are coherent with CD33 internalization through the endosomal pathway, trafficking to the early endosome usually leading to lysosomal processing.

Lysosomal processing is essential for the antimetabolic effect induced by IC treatment

Maytansinoid-antibody conjugates have been reported to induce mitotic arrest by suppressing microtubule dynamic instability^{117, 127}. To determine whether conjugates had an effect on microtubules in AML resistant cells, we first determined whether the huMy9-6-Peg4-Mal1-DM1 immunoconjugate induced such a mitotic arrest in the 3 different AML cell lines evaluated. Asynchronously growing HL60 cells were exposed to 1×10^{-8} M huMy9-6-Peg4-Mal1-DM1 or 66 mM nocodazole, an inhibitor of microtubule polymerization used as positive control, for 6 hours and cell cycle distribution analyzed by evaluating the DNA content. An increase of cells in the G₂/M phase of the cell cycle was observed for all three HL60 cell lines

treated with nocodazole (Figure 7 A,B,C). Approximately 50% of nocodazole treated cells were arrested in G₂/M phase compared with less than 30% for untreated or DMSO treated control cells. When treated with an IC, HL60HMR and HL60Qc cells had an increase in the number of cells in G₂/M phase (35-40%), while no cell cycle arrest was induced in HL60/S cells, the cells we found to be most resistant to huMy9-6-Peg4-Mal1-DM1.

To confirm the absence of microtubule polymerization in HL60/S cells, we monitored the expression of phosphohistone H3, a marker of cells in late G₂/M phase of the cell cycle. IC treatment increased the expression of phosphohistone H3 in IC sensitive cells (HL60HMR and HL60Qc) but no effect was observed in the resistant one (HL60/S) (Figure 7 D,E,F). Phosphohistone H3 expression was under 5% in all 3 HL60 cell lines at baseline and in DMSO treated controls while its expression reached at least 20% in all cell lines after nocodazole treatment. These results show that, in contrast to IC sensitive cells, the HL60/S resistant cells are not blocked in the G₂/M phase of the cell cycle.

To determine whether the processing of the immunoconjugate through the lysosomes was necessary for their activity, we analyzed the effect of the presence of lysosomal inhibitors on IC induced-G₂/M arrest. Bafilomycine A1 (BafA1), an inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase, a proton pump present in the endosomes and lysosomes¹⁷¹, and a mixture composed of leupeptin, pepstatin and E64 (L/P/E), a cocktail of inhibitors of proteases and peptidases necessary for lysosomal function, were used as lysosomal inhibitors. In the presence of BafA1 or L/P/E cocktail, G₂/M arrest and expression of phosphohistone H3-induced by IC treatment was completely abolished in IC sensitive cell lines while no effect is observed on resistant cell lines (Figure 7) However, treatment of all 3 cell lines with BafA1 or L/P/E alone did not alter the cell cycle distribution of the cells nor their expression of phosphohistone H3. These data confirm that lysosomal processing is required for the activation and the antimitotic activity of the immunoconjugate.

Cell lines SOCS3 expression correlate with sensitivity to IC

SOCS3 protein could play an important role in CD33 degradation¹⁴⁷ and consequently impact on IC processing in AML cells. We therefore assessed SOCS3 protein expression in whole-cell lysates of AML cell lines by immunoblotting. Interestingly, we detected SOCS3 protein in the cell lines demonstrating the lowest level of IC sensitivity (HL60/S, NB4, TF-1) while low or no expression of SOCS3 protein was detected in the more sensitive cells (HL60HMR and HL60Qc) (Figure 8A). Also, CD33 protein levels by immunoblotting confirmed the results obtained by flow cytometry quantitation. SR lymphoma cell line was used as a positive control for SOCS3 expression and negative control for CD33 receptor.

The methylation status of SOCS3 promoter is known to impact the expression of SOCS3 protein. To determine if hypermethylation could be responsible for the SOCS3 absence in sensitive cell lines, AML cell genomic DNA was digested by methylation-sensitive and/or methylation-dependent enzymes. Primers flanking the region of interest were used to quantify remaining DNA and determine the level of methylation. Cells expressing SOCS3 or not demonstrated similar methylation levels (Figure 8B). Together, these data suggest that SOCS3 protein could play an important role in AML cell sensitivity to anti-CD33 immunoconjugates but that expression of SOCS3 did not depend on its promoter methylation status.

Discussion

In the present study, we investigated the ability of ICs incorporating variously cleavable linkers to modulate AML cytotoxicity. We found that in most instances, highly cleavable linker did not provide a cytotoxic advantage over less cleavable linker. However, IC with hydrophilic linker and a more cytotoxic toxin conjugate demonstrated a potential advantage in a few patients. The investigation of mechanisms of IC resistance in AML cells showed that antigen expression and internalization were not determining factors for IC cytotoxicity, but SOCS3 expression was associated with greater AML sensitivity to these ICs.

Three anti-CD33 ICs with structural variations were analyzed for their efficacy at eliminating AML cells. AVE9633 is composed of humanized monoclonal antibody huMy9-6 covalently linked to the maytansinoid derivative N²-deacetyl-N²-(4-methyl-4(oxobutyldithio)-1-oxopentyl)-maytansine (DM4), a potent cytotoxic agent, by N-succinimidyl-4-(2-pyridyldithio) butyrate (SPDB) linker. A sulfo group was added to AVE9633 to create huMy9-6-Sulfo-SPBD-DM4 giving an IC with a more cleavable linker. This modification facilitates liberation of cytotoxic molecules in the cytoplasm of the cell and was postulated to increase the activity of IC. Our results indicate that huMy9-6-Sulfo-SPBD-DM4 was as efficient as AVE9633 at eliminating primary AML patient cells, even if slightly more efficient at eliminating some AML cell lines. The highly cleavable linker created by the addition of a sulfo group was not sufficient to increase the efficacy of the conjugate.

On the other hand, huMy9-6-Peg4-Mal1-DM1 contains a maleimidyl-based ethylene glycol tetramer linker (Peg4-Mal1) and DM1 maytansine derivative as toxic agent. The cleavage of the Peg4-Mal1 linker has been shown to result in the liberation of more hydrophilic maytansine metabolites¹⁶⁶. Maytansine is known as a substrate for the MDR1 transporter and even if it is not a major mechanism of resistance for AML¹³⁵, hydrophilic properties of metabolites resulting of Peg4-Mal1 cleavage may counteract metabolites efflux by the MDR1

transporter, shown to transport a great variety of compounds, mostly hydrophobic ¹⁶⁷. Furthermore, huMy9-6-Peg4-Mal1-DM1 contains a toxin to antibody ratio 2 fold superior over the 2 other conjugates (approximately 7-8 DM1 molecules per antibody). We showed that huMy9-6-Peg4-Mal1-DM1 was the least active of the conjugates at intermediate concentrations but demonstrated a potential advantage in a few cell lines and patients at low doses. It is relevant to ask if hydrophilic properties of cytotoxic metabolites of huMy9-6-Peg4-Mal1-DM1 did not modify its capacity to bind microtubules and consequently induce mitotic arrest. Altogether, these findings indicate that AML patient cells are particularly heterogeneous in terms of response to IC treatment and that modifications of immunoconjugate structure were not sufficient to increase their efficacy against AML cells.

We also investigated cellular mechanisms underlying IC resistance. CD33 expression on cell surface being crucial for IC activity, we hypothesized that cells expressing high levels of CD33 antigen could bind greater numbers of ICs and be more sensitive to IC treatment. Also, we assessed whether IC internalization rates affect biologic activity by measuring antibody uptake by AML cell lines. We found that the rapid internalization of anti-CD33 antibody by TF1 cells correlated with its high level of CD33 expression. In contrast, the lowest CD33 expressing cells, NB4, were the only ones reaching higher antibody internalization at 24 hours. We conclude that neither the levels of CD33 expression nor internalization rates reflect sensitivity to IC treatment of AML cell lines or patient cells. By modulating CD33 expression, studies have suggested a pivotal role for the number of CD33 molecules expressed on the cell surface and the cytotoxicity of anti-CD33 conjugates ¹⁷². In the clinical context where modulation of CD33 expression is impossible, it is encouraging to know that AML cells with low level of CD33 expression could respond to anti-CD33 therapy. Also, it would be interesting to determine if those low expressing cells have faster renewal of membrane CD33 expression considering that in vitro studies showed that renewed membrane expression of CD33 antigen can significantly increase internalization rates and intracellular accumulation of the drug ¹⁷³.

Maytansinoid-antibody conjugates have been reported to induce mitotic arrest by suppressing microtubule dynamic instability by binding to microtubules via lysosomal-dependent degradation processing^{117, 125, 127}. To determine whether there is an effect on microtubules in AML resistant cells, we first determined if huMy9-6-Peg4-Mal1-DM1 induced a mitotic arrest by evaluating cells in G₂/M phase of the cell cycle by both PI and phosphohistone H3 staining. Using nocodazole as inhibitor of microtubule polymerization, we observed that sensitive cell lines had an increased percentage of cells in G₂/M phase, while no cell cycle arrest was induced in more resistant cells. We then analysed the effect of lysosomal inhibitors on IC induced-G₂/M arrest. BafA1, a proton pump inhibitor present in the endosomes and lysosomes¹⁷¹, and L/P/E mix, a cocktail of inhibitors of proteases and peptidases necessary for lysosomal function, were used as lysosomal inhibitors. G₂/M arrest and expression of phosphohistone H3-induced by IC treatment was completely abolished in IC sensitive cell lines in the presence of lysosomal inhibitors while no effect is observed on resistant cell lines. These data confirm that lysosomal processing is required for the activation and the antimitotic activity of the immunoconjugate. Inhibition of acidification results in inhibition of lysosomal processing and degradation of the endocytosed protein.

Through accelerated proteasomal-mediated turnover, SOCS3 protein could play an important role in CD33 degradation¹⁴⁷ and consequently impact on IC processing in AML cells. Interestingly, we detected SOCS3 protein in the cell lines demonstrating the lowest level of IC sensitivity while low or no expression of SOCS3 protein was detected in the more sensitive cells. This leads us to hypothesis that intracellular trafficking of anti-CD33 immunoconjugate could be disturbed in presence of SOCS3 protein. As suggested by Orr et al, SOCS3 protein, in competition with SHP-1/2 could bind and polyubiquitinate CD33 protein¹⁴⁷. This process could lead to proteasomal degradation of both CD33 and SOCS3 but also of anti-CD33 immunoconjugate. Obviously, decoupling of maytansine derivative by lysosomal cleavage of

the linker would be impossible if degradation of the conjugate occurred in the proteasome and consequently this would impact on efficacy of the conjugate.

Aberrant methylation in the promoter region of SOCS3 gene and its transcriptional silencing is associated with human malignancies such as melanomas¹⁷⁴, myeloproliferative disorders¹⁷⁵, hepatocellular carcinomas¹⁷⁶ and AML¹⁶⁵. To determine if hypermethylation could be responsible for the SOCS3 absence in sensitive cell lines, we analyzed AML cell genomic DNA and evaluated the level of methylation. No hypermethylation was detected in cells expressing or not SOCS3 protein. Together, these data suggest that SOCS3 protein could play an important role in AML cell sensitivity to anti-CD33 immunoconjugates but that expression of SOCS3 did not depend on its promoter methylation status.

Conclusion

Neither the level of CD33 expression nor the internalization rates reflect sensitivity to IC treatment of AML cell lines or patient cells. However, SOCS3 protein may play a role in resistance of AML cells to anti-CD33 therapy by directing IC-CD33-SOCS3 complex to the proteasome and therefore affecting lysosomal decoupling of IC-CD33 and intracellular release of maytansine derivatives. The linkers and maytansine derivative modifications were not sufficient to increase sufficiently the efficacy of conjugates to eliminate higher numbers of AML cells. The identification of mechanisms responsible for increased resistance of AML cell lines and primary AMLs may allow us to identify IC responsive AML cells and also identify strategies to improve the efficacy of IC treatment.

Reference List

1. Lowenberg,B., Downing,J.R., & Burnett,A. Acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 341, 1051-1062 (1999).
2. Dinndorf,P.A. *et al.* Expression of normal myeloid-associated antigens by acute leukemia cells. *Blood* 67, 1048-1053 (1986).
3. Linenberger,M.L. CD33-directed therapy with gemtuzumab ozogamicin in acute myeloid leukemia: progress in understanding cytotoxicity and potential mechanisms of drug resistance. *Leukemia* 19, 176-182 (2005).
4. Crocker,P.R., Paulson,J.C., & Varki,A. Siglecs and their roles in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 255-266 (2007).
5. Crocker,P.R. & Redelinghuys,P. Siglecs as positive and negative regulators of the immune system. *Biochem. Soc. Trans.* 36, 1467-1471 (2008).
6. Walter,R.B. *et al.* ITIM-dependent endocytosis of CD33-related Siglecs: role of intracellular domain, tyrosine phosphorylation, and the tyrosine phosphatases, Shp1 and Shp2. *J. Leukoc. Biol.* 83, 200-211 (2008).
7. Vitale,C. *et al.* Engagement of p75/AIRM1 or CD33 inhibits the proliferation of normal or leukemic myeloid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 15091-15096 (1999).
8. Vitale,C. *et al.* Surface expression and function of p75/AIRM-1 or CD33 in acute myeloid leukemias: engagement of CD33 induces apoptosis of leukemic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 5764-5769 (2001).

9. Erickson,H.K. *et al.* Antibody-maytansinoid conjugates are activated in targeted cancer cells by lysosomal degradation and linker-dependent intracellular processing. *Cancer Res.* 66, 4426-4433 (2006).
10. Lopus,M. *et al.* Maytansine and cellular metabolites of antibody-maytansinoid conjugates strongly suppress microtubule dynamics by binding to microtubules. *Mol. Cancer Ther.* 9, 2689-2699 (2010).
11. Oroudjev,E. *et al.* Maytansinoid-antibody conjugates induce mitotic arrest by suppressing microtubule dynamic instability. *Mol. Cancer Ther.* 9, 2700-2713 (2010).
12. Orr,S.J. *et al.* CD33 responses are blocked by SOCS3 through accelerated proteasomal-mediated turnover. *Blood* 109, 1061-1068 (2007).
13. Sasaki,A. *et al.* CIS3/SOCS-3 suppresses erythropoietin (EPO) signaling by binding the EPO receptor and JAK2. *J. Biol. Chem.* 275, 29338-29347 (2000).
14. Bjorbak,C. *et al.* SOCS3 mediates feedback inhibition of the leptin receptor via Tyr985. *J. Biol. Chem.* 275, 40649-40657 (2000).
15. Yoshimori,T., Yamamoto,A., Moriyama,Y., Futai,M., & Tashiro,Y. Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *J. Biol. Chem.* 266, 17707-17712 (1991).
16. Kovtun,Y.V. *et al.* Antibody-maytansinoid conjugates designed to bypass multidrug resistance. *Cancer Res.* 70, 2528-2537 (2010).
17. Legrand,O., Simonin,G., Beauchamp-Nicoud,A., Zittoun,R., & Marie,J.P. Simultaneous activity of MRP1 and Pgp is correlated with in vitro resistance to daunorubicin and with in vivo resistance in adult acute myeloid leukemia. *Blood* 94, 1046-1056 (1999).

18. Loo,T.W. & Clarke,D.M. Recent progress in understanding the mechanism of P-glycoprotein-mediated drug efflux. *J. Membr. Biol.* 206, 173-185 (2005).
19. Walter,R.B., Raden,B.W., Kamikura,D.M., Cooper,J.A., & Bernstein,I.D. Influence of CD33 expression levels and ITIM-dependent internalization on gemtuzumab ozogamicin-induced cytotoxicity. *Blood* 105, 1295-1302 (2005).
20. van der Velden,V.H. *et al.* Targeting of the CD33-calicheamicin immunoconjugate Mylotarg (CMA-676) in acute myeloid leukemia: in vivo and in vitro saturation and internalization by leukemic and normal myeloid cells. *Blood* 97, 3197-3204 (2001).
21. Tokita,T. *et al.* Methylation status of the SOCS3 gene in human malignant melanomas. *Int. J. Oncol.* 30, 689-694 (2007).
22. Fourouclas,N. *et al.* Methylation of the suppressor of cytokine signaling 3 gene (SOCS3) in myeloproliferative disorders. *Haematologica* 93, 1635-1644 (2008).
23. Niwa,Y. *et al.* Methylation silencing of SOCS-3 promotes cell growth and migration by enhancing JAK/STAT and FAK signalings in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 24, 6406-6417 (2005).
24. Middeldorf,I. *et al.* Sequence of administration and methylation of SOCS3 may govern response to gemtuzumab ozogamicin in combination with conventional chemotherapy in patients with refractory or relapsed acute myelogenous leukemia (AML). *Am. J. Hematol.* 85, 477-481 (2010).

Figure Legend

Figure 1: AML cell line sensitivity to IC treatment

AML cell line viability was measured 3 days after treatment with IC concentrations ranging from 10^{-12} M to 10^{-7} M for: A) AVE9633 B) huMy9-6-Sulfo-SPDB-DM4 C) huMy9-6-Peg4-Mal1-DM1. Viability is reported as % of untreated cells.

Figure 2: Effect of CD33 IC on clonogenic HL60 AML cell lines

HL60AML cell lines were treated for 3 days with 10^{-11} M to 10^{-7} M for: A) AVE9633 B) huMy9-6-Sulfo-SPDB-DM4 C) huMy9-6-Peg4-Mal1-DM1. L-CFU count was performed after 14 days in methylcellulose. Viability of clonogenic cells is reported as % of untreated cells.

Figure 3: Primary AML patient cell sensitivity to IC treatment

Primary AML patient cells were treated with IC from 10^{-10} M to 10^{-7} M for 5 days, harvested and plated in methylcellulose for 14 days. A) AVE9633 B) huMy9-6-Sulfo-SPDB-DM4 C) huMy9-6-Peg4-Mal1-DM1. L-CFU were enumerated and reported as % of untreated cells for individual patients.

Figure 4: Correlation between CD33 expression and immunoconjugate sensitivity

AML cell lines and AML primary patient cells were stained with anti-CD33 antibody and determination of ABC values of cell samples was assessed using a standard curve constructed with known ABC values of 5 bead populations. Data are shown as ABC values of : A,B,C) AML cell lines D,E,F) AML patient cells versus percentage of surviving cells after 1×10^{-9} M

immunoconjugate treatment for : A,D) AVE9633 B,E) huMy9-6-Sulfo-SPDB-DM4 C,F) huMy9-6-Peg4-Mal1-DM1 with a 95% confidence interval.

Figure 5: Internalization of antibody-bound CD33 in AML cell lines

AML cell lines were treated with 1×10^{-8} M huMy9-6-AF488 for 30 min on ice before the cells were incubated in antibody-free medium at 4°C as control or at 37°C to allow internalization of antibody-bound CD33 up to 24 hours. Remaining signals from cell surface fluorescent antibody were suppressed with anti-Alexa Fluor 488 antibody. Percentage of internalization was calculated as $((\text{MFI huMy9-6-AF488+anti-AF488}) / (\text{MFI huMy9-6-AF488}) \times 100)$ at 37°C – $((\text{MFI huMy9-6-AF488} + \text{anti-AF488}) / (\text{MFI huMy9-6-AF488}) \times 100)$ at 4°C

Figure 6: Intracellular processing of huMy9-6-AF488

AML HL60HMR cell line was treated with 1×10^{-8} M huMy9-6-AF488 for 30 min on ice before the cells were incubated in antibody-free medium at 37°C. Cells were fixed and centrifuge on slides at different time point. Cells were fixed, permeabilized and stained with anti-EEA1 antibody and AlexaFluor594 secondary antibody. Preparation were covered with mounting medium and visualised by fluorescent microscopy.

Figure 7: Lysosomal inhibitors prevent G₂/M arrest and block expression of phosphohistone H3 induced by IC treatment

Cells were treated with huMy9-6-Peg4-Mal1-DM1, nocodazole, BafA1, Leupeptin/Pepstatin/E64 cocktail for 6 hrs. A,B,C) Cell cycle distribution was analysed by DNA content using PI staining and reported as % of cells in G₂/M phase D,E,F) Expression of phosphohistone H3 was measured by staining cells with anti phosphohistone H3 antibody. A,D) HL60HMR B,E) HL60/S C,F) HL60Qc

Figure 8: Cell line expression of SOCS3 protein and methylation status

A) Whole-cell lysates were immunoblotted and stained with anti-SOCS3 and anti-CD33 antibodies followed by HRP-labeled secondary antibody. Anti-actin was used as loading control. B) Genomic DNA was digested using methylation-sensitive and/or methylation-dependent enzymes. Remaining DNA was quantified by real-time PCR using primers flanking the region of interest. Relative fractions of hypermethylated (HM), intermediate methylated (IM), and unmethylated (UM) DNA in various cells were compared with a non-digested control.

Figure 1: AML cell line sensitivity to IC treatment

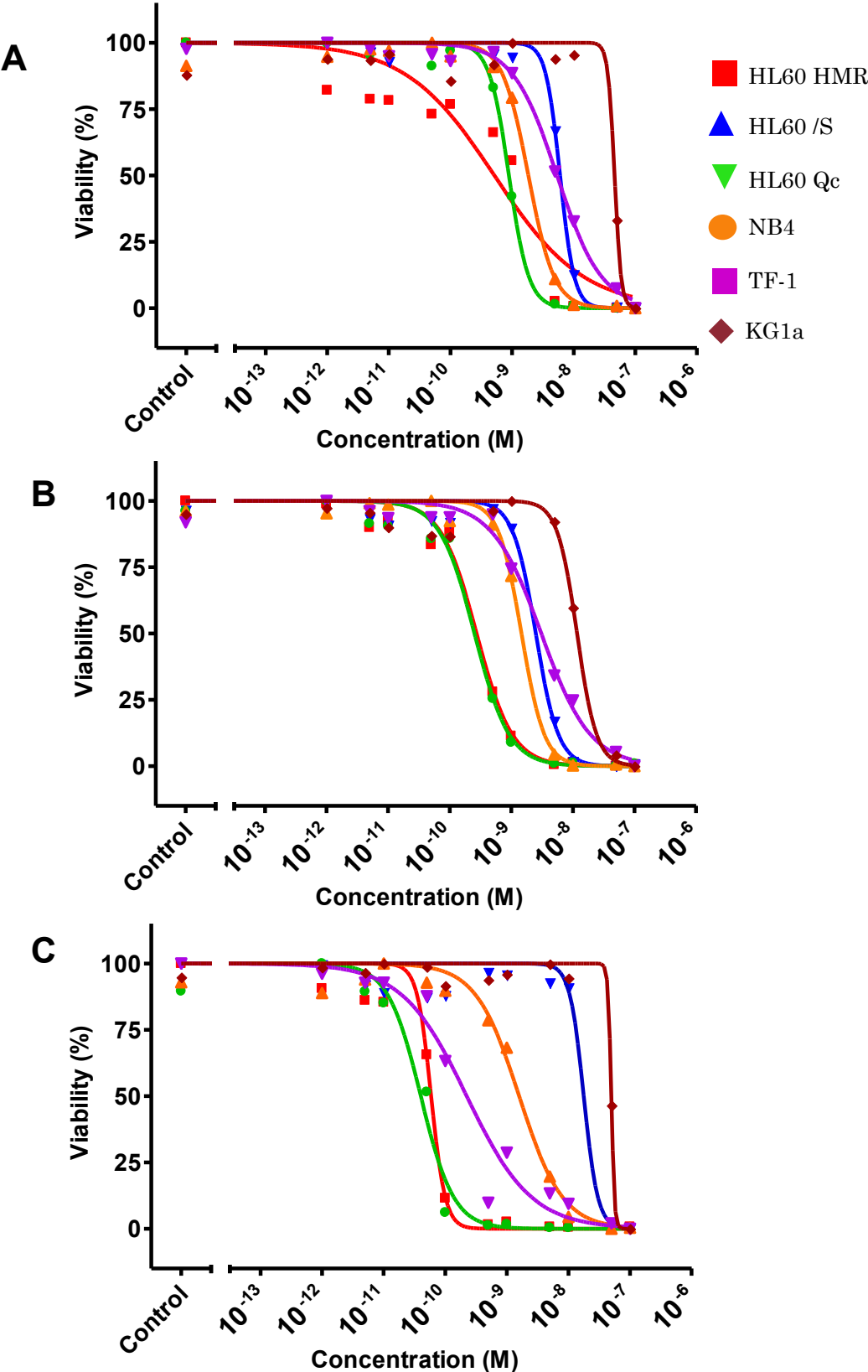


Figure 2: Effect of CD33 IC on clonogenic HL60 AML cell lines

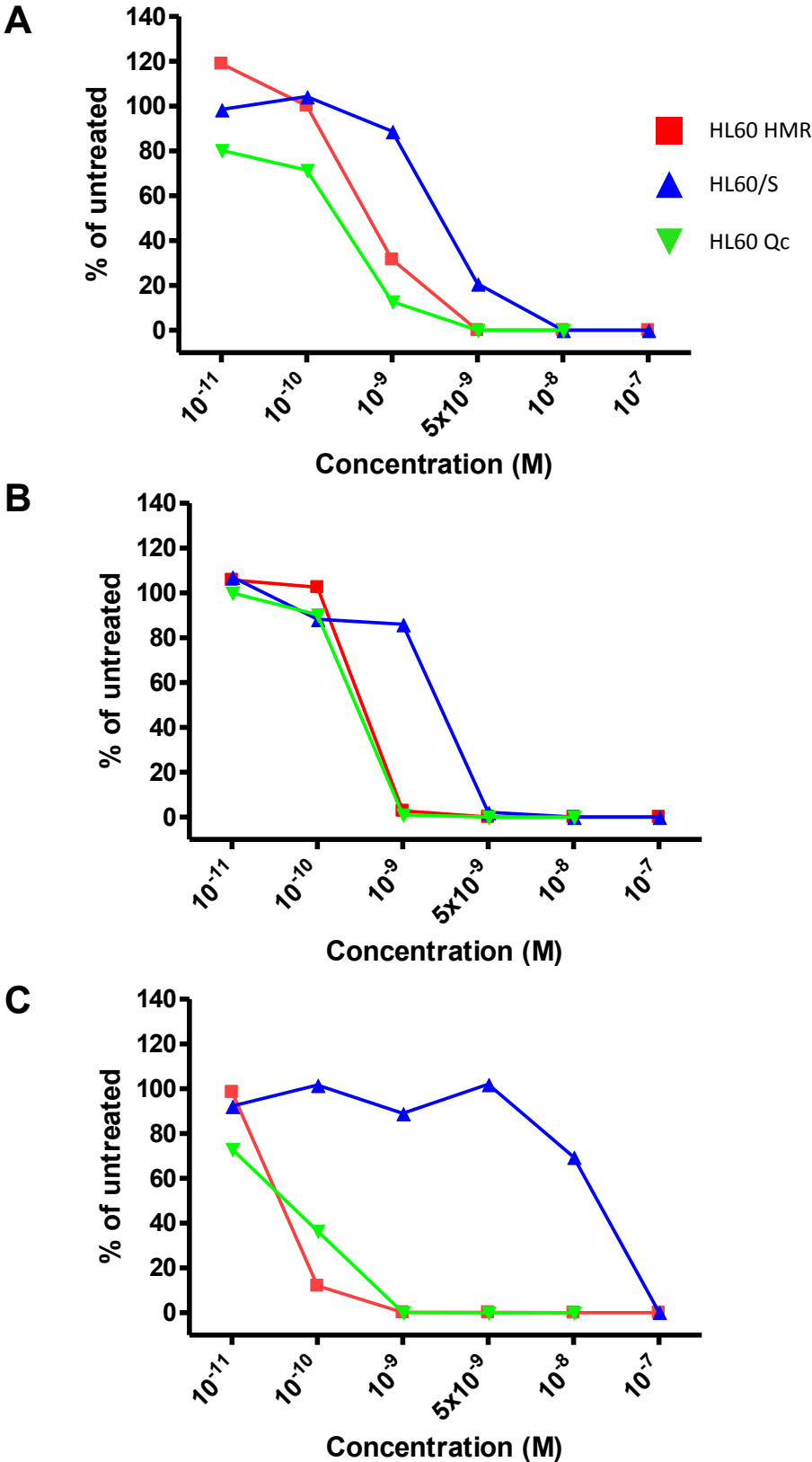


Figure 3: Primary AML patient cell sensitivity to IC treatment

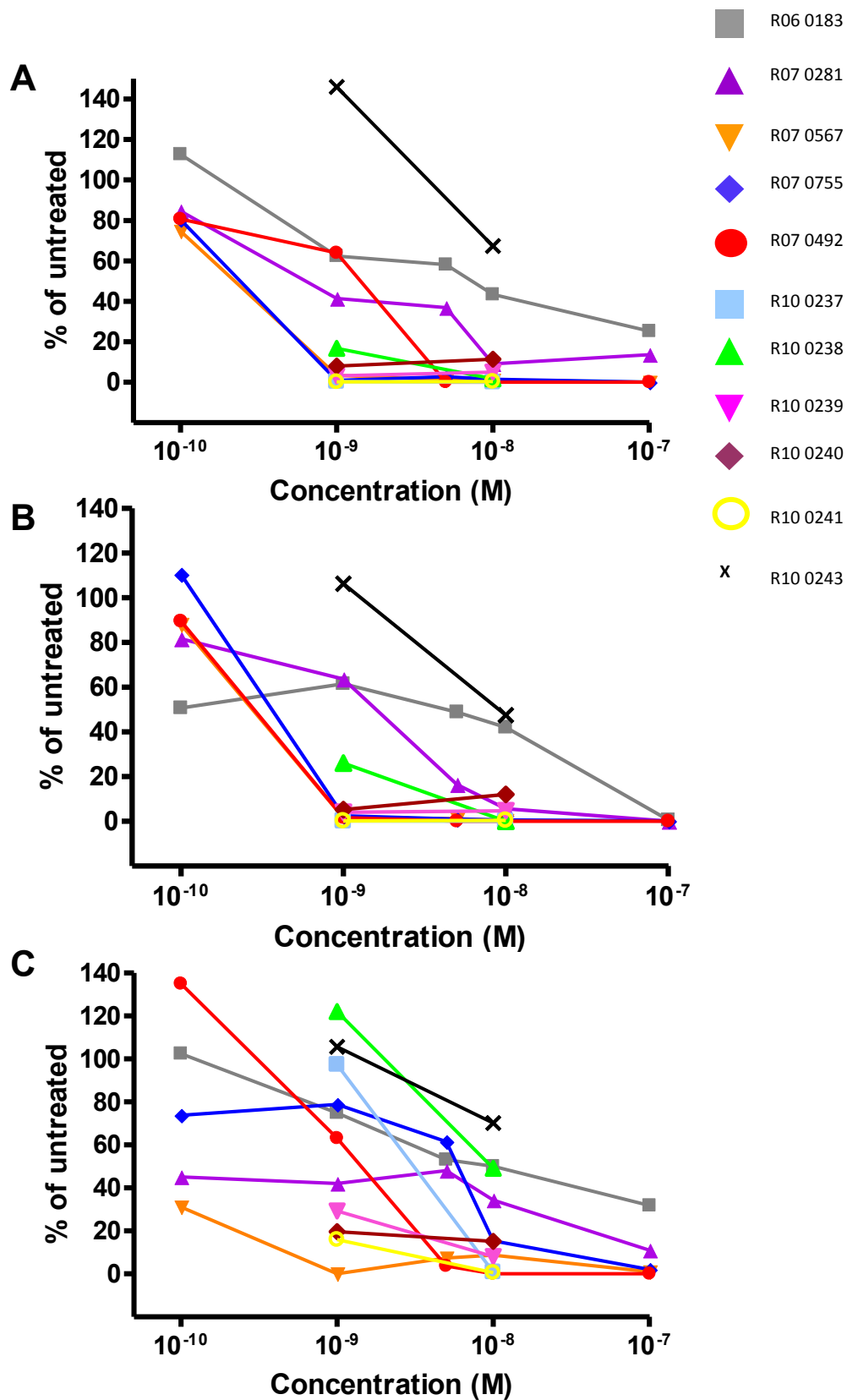


Figure 4: Correlation between CD33 expression and immunoconjugate sensitivity

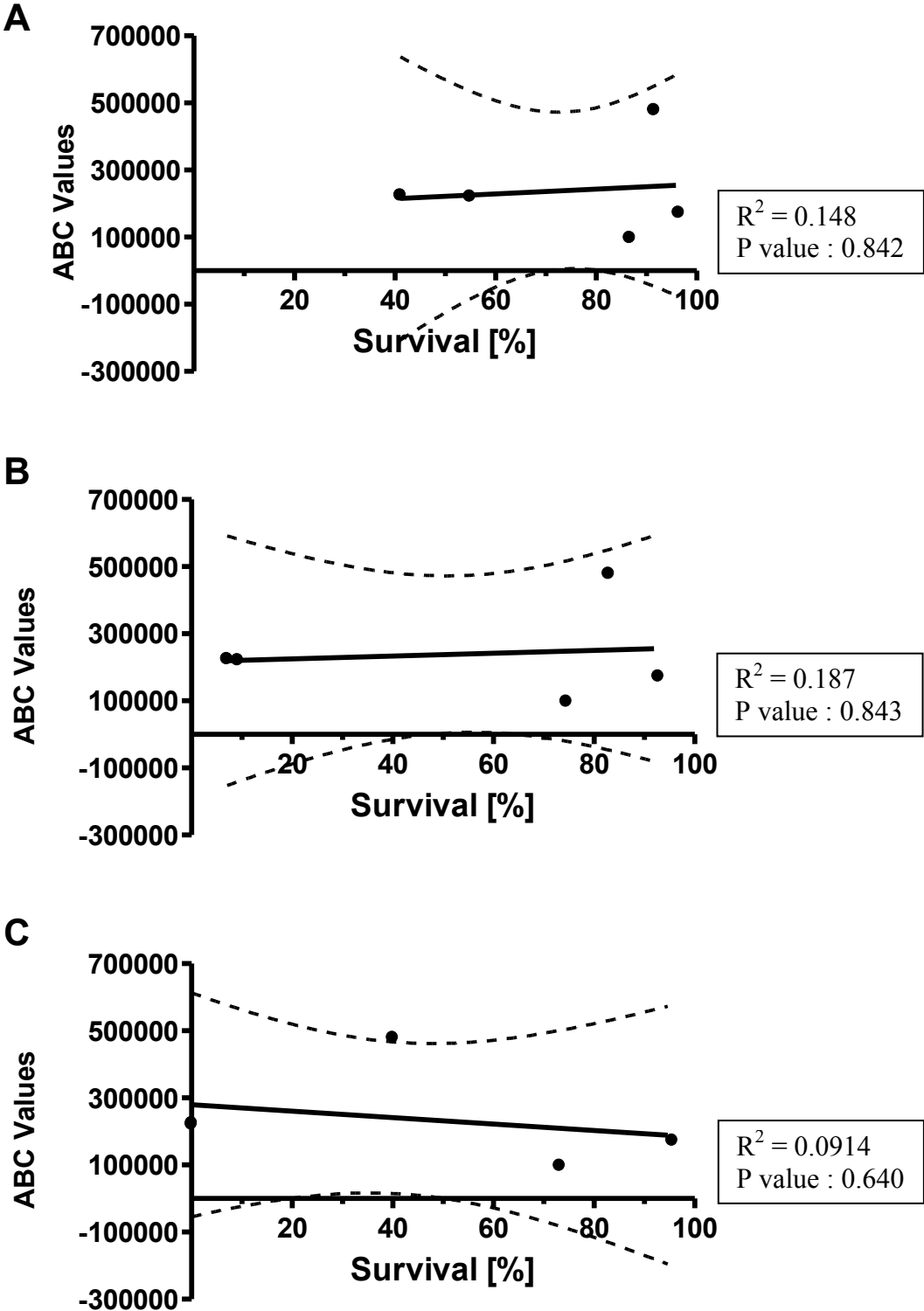


Figure 4: Correlation between CD33 expression and immunoconjugate sensitivity

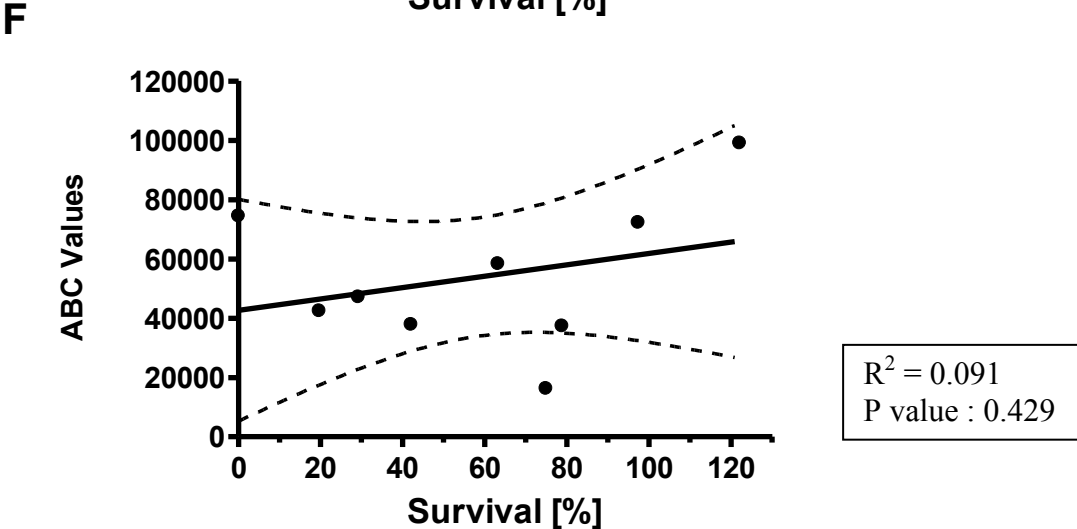
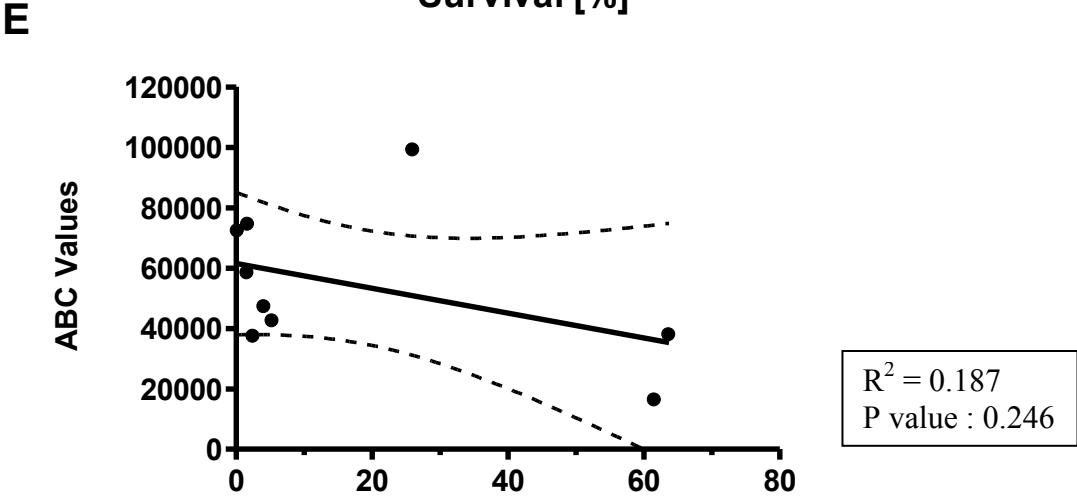
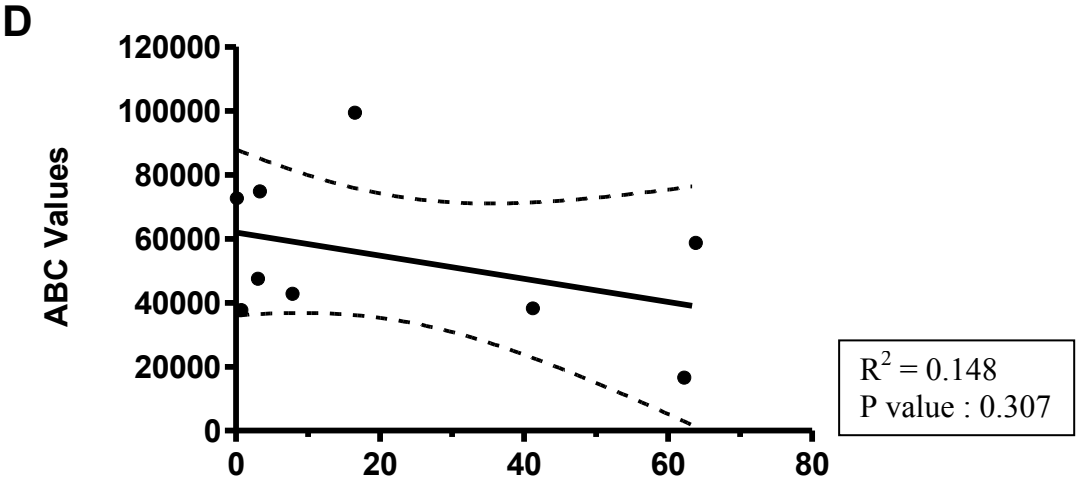


Figure 5: Internalization of antibody-bound CD33 in AML cell lines

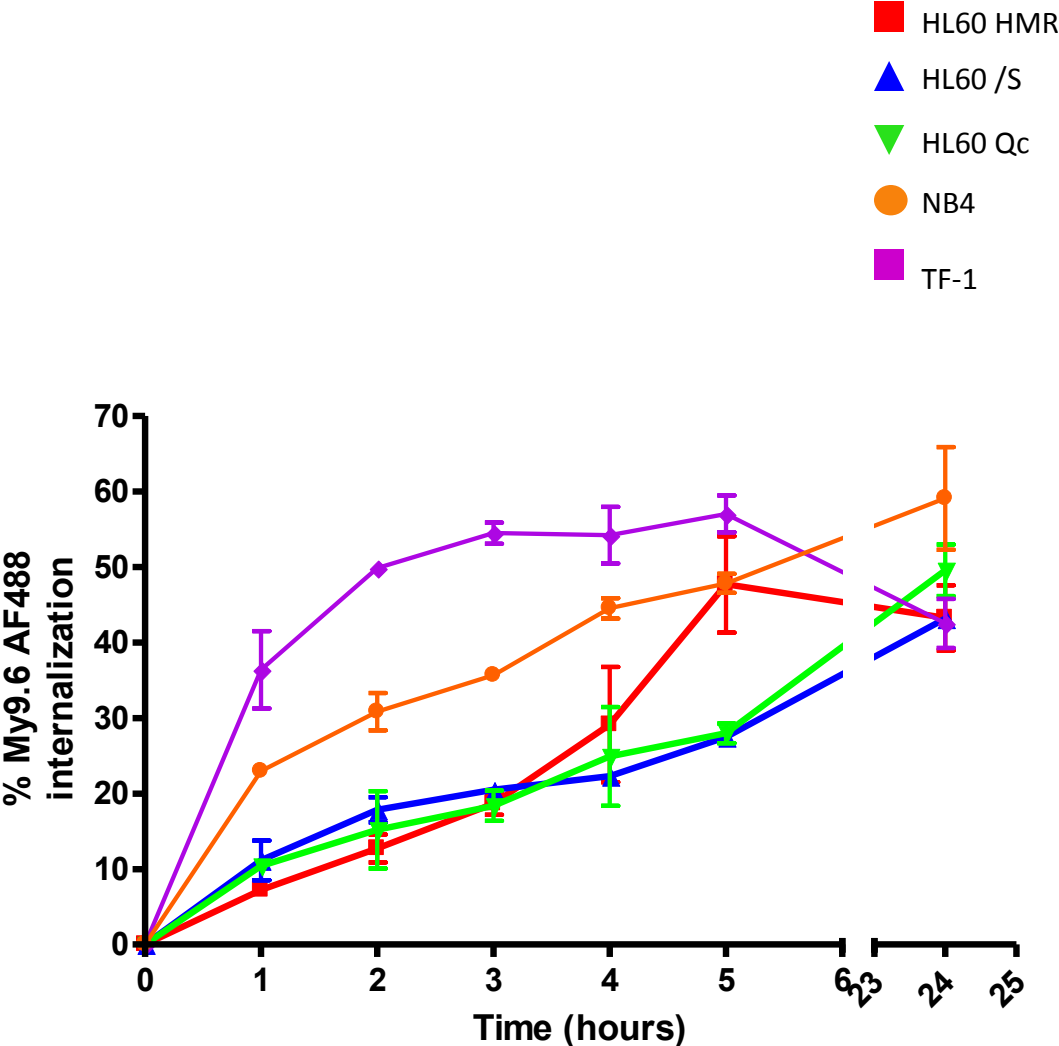


Figure 6: Intracellular processing of huMy9-6-AF488

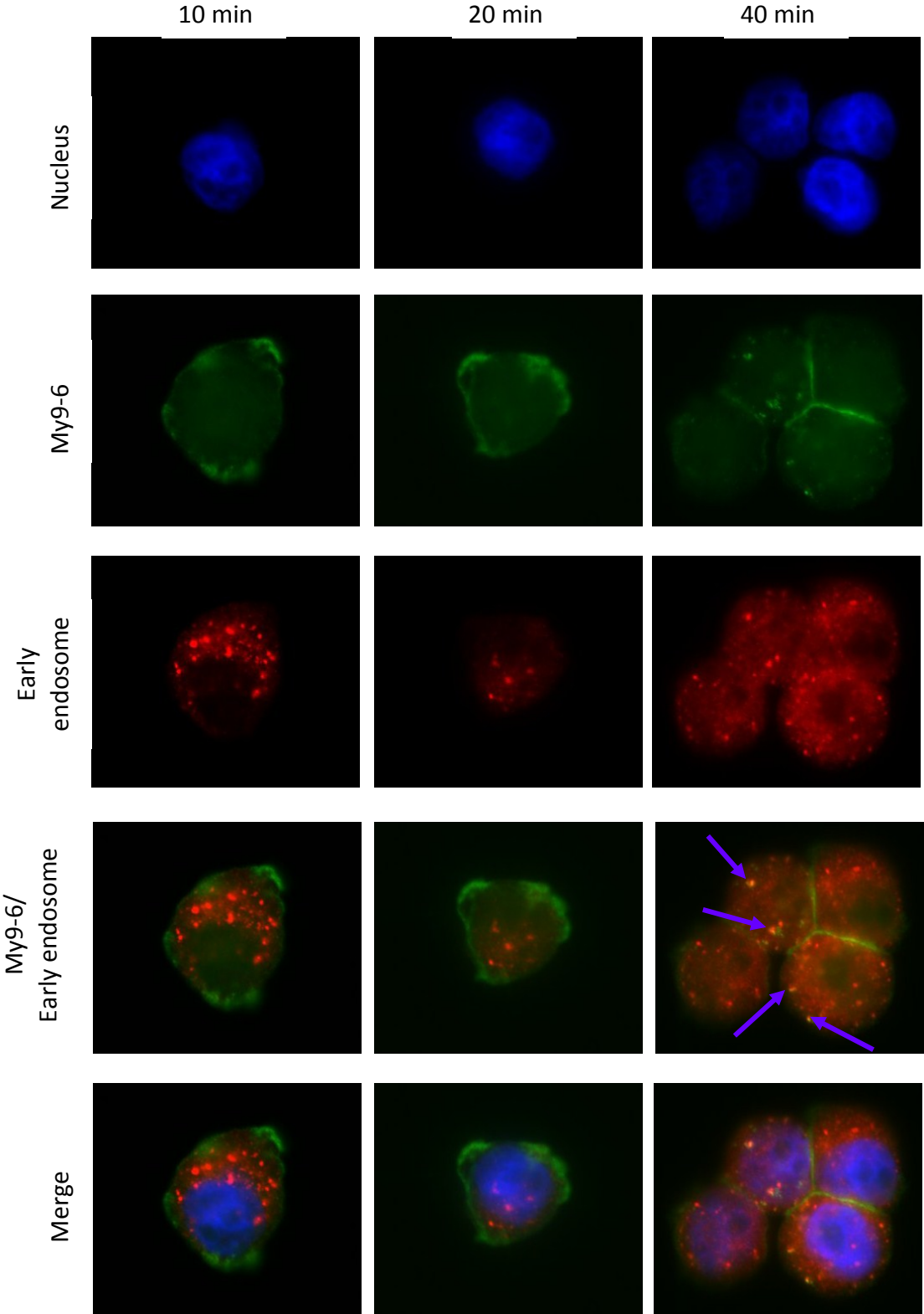


Figure 7: Lysosomal inhibitors prevent G₂/M arrest and block expression of phosphohistone H3 induced by IC treatment

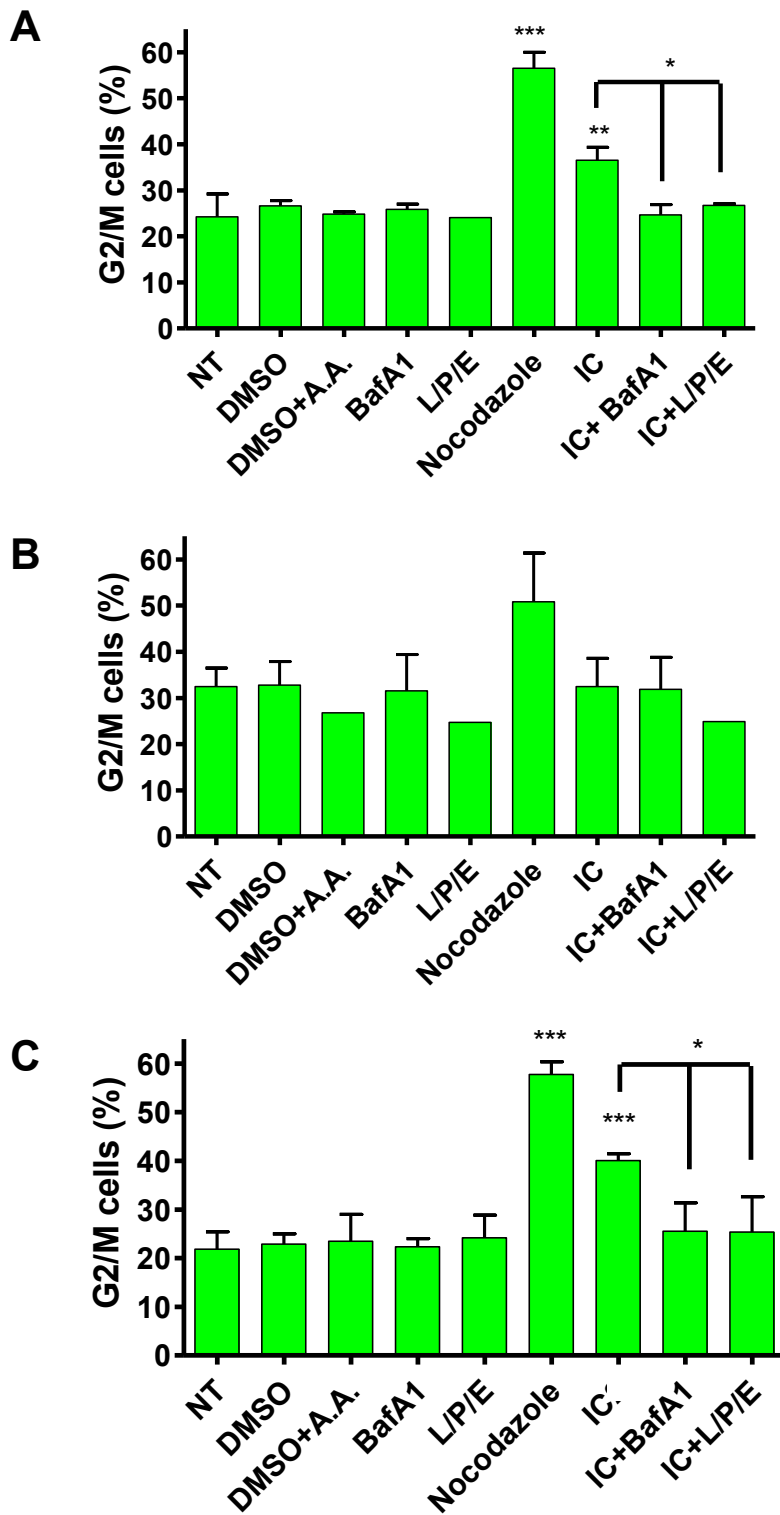


Figure 7: Lysosomal inhibitors prevent G₂/M arrest and block expression of phosphohistone H3 induced by IC treatment

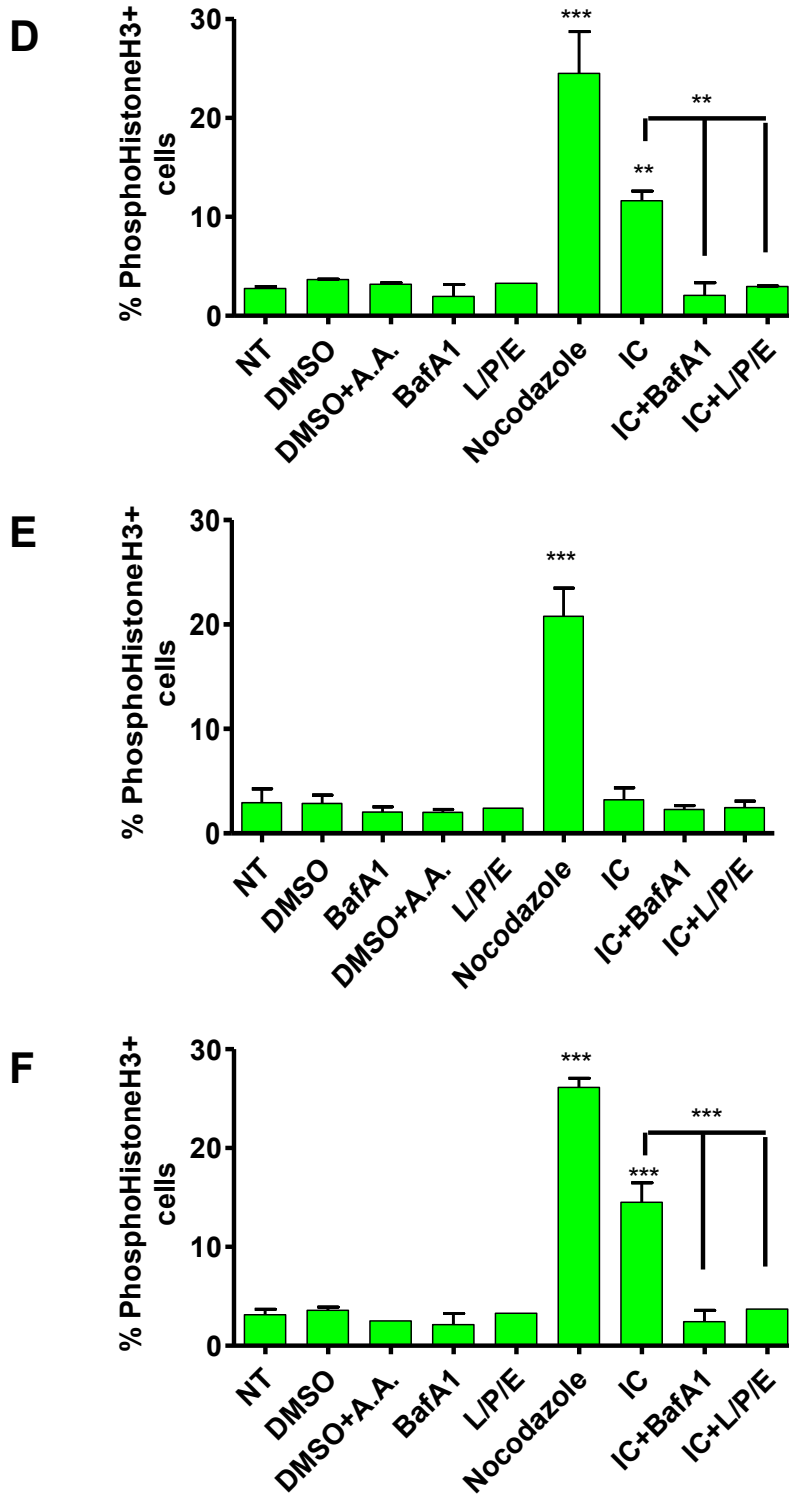
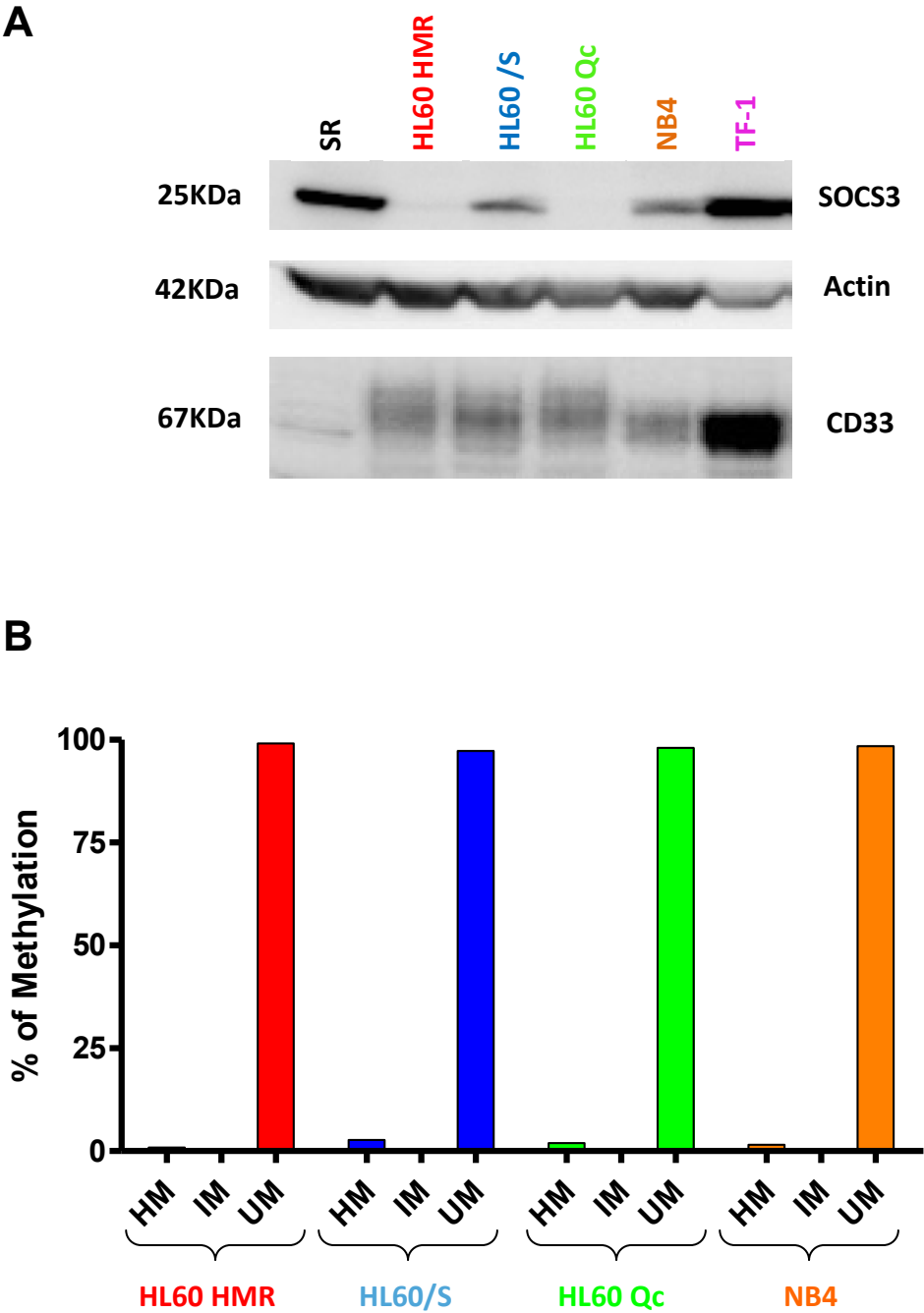


Figure 8: Cell line expression of SOCS3 protein and methylation status



Discussion

Analyse des immunoconjugués

Ayant comme objectif principal l'amélioration de l'efficacité des immunoconjugués anti-CD33 pour le traitement des patients atteints de leucémies myéloïdes aiguës, il est important d'évaluer en laboratoire la réponse des cellules leucémiques suite à un traitement potentiel. Les modifications apportées au niveau de la structure de l'agent de liaison et/ou du dérivé maytansinoïde des deux nouveaux IC avaient pour objectif d'augmenter l'efficacité de ces derniers. Il était donc important d'analyser les caractéristiques des deux nouveaux IC en comparaison à l'AVE9633.

Tout d'abord, nous avons évalué l'efficacité des immunoconjugués à éliminer différentes lignées cellulaires LMA en observant d'une part, la viabilité suite aux traitements et d'autre part, leur impact sur la croissance des cellules clonogéniques. La compétence des IC à éliminer les cellules clonogéniques est d'une importance capitale. Ces cellules sont immatures, ont la capacité de se diviser et leur présence résiduelle suite à un traitement est associée à la rechute clinique après traitement. L'efficacité *in vitro* de huMy9-6-Sulfo-SPDB-DM4 est comparable à celle de l'AVE9633, malgré des valeurs de concentration inhibitrice pour 50% des cellules (IC50) légèrement inférieures pour huMy9-6-Sulfo-SPDB-DM4. L'IC huMy9-6-Peg4-Mal1-DM1 a un profil d'élimination différent des deux autres IC. Il élimine plus agressivement deux des lignées les plus sensibles aux 2 autres IC alors qu'il est moins actif contre une des lignées plus résistantes.

Afin de s'approcher le plus possible de la réalité, nous avons aussi analysé l'impact des IC sur l'élimination des cellules clonogéniques de cellules primaires de patients atteints de LMA. Une élimination similaire entre les cellules traitées à l'AVE9633 et à huMy9-6-Sulfo-SPDB-DM4 a été observée. Par contre, on remarque une plus grande hétérogénéité dans la réponse suite à un traitement à l'huMy9-6-Peg4-Mal1-DM1.

Comme l'agent de liaison de huMy9-6-Peg4-Mal1-DM1 a été développé dans l'optique de déjouer l'effet de la pompe MDR1, il est possible que la plus grande sensibilité de certaines lignées cellulaires en soit une résultante. Le dérivé engendré par cet immunoconjugué est plus hydrophile et échappe à l'extrusion hors de la cellule via la pompe MDR1. La plus grande sensibilité de certaines lignées pourrait être une conséquence d'une présence plus élevée de dérivé toxique au cytoplasme. Par contre, la pompe MDR1 n'est pas connue comme un mécanisme majeur de résistance face à l'AVE9633¹⁷⁷. Une autre caractéristique importante de huMy9-6-Peg4-Mal1-DM1 est la présence doublée du nombre de molécules toxiques comparativement aux deux autres IC. Face aux résultats obtenus, nous ne pouvons affirmer qu'une plus grande quantité d'agent toxique ait été bénéfique pour augmenter la cytotoxicité du conjugué. Par contre, sachant que le dérivé toxique résultant de la dégradation de huMy9-6-Peg4-Mal1-DM1 est plus hydrophile, il est légitime de se demander si ces interactions moléculaires sont affectées telle son affinité/avidité pour les microtubules.

Mécanisme d'action des IC

Des études sur des immunoconjugués de structure similaire à ceux à l'étude ont suggéré que le découplage de l'agent toxique de l'anticorps s'effectue dans le lysosome et par conséquent, est nécessaire à l'activité toxique du conjugué. Nous avons démontré que le lysosome est essentiel pour permettre l'arrêt du cycle cellulaire en phase G₂/M induit suite à un traitement à l'immunoconjugué. L'inhibition de l'acidification par des inhibiteurs lysosomaux résulte en l'inhibition de la dégradation du conjugué par le protéasome. Ces résultats ont été soutenus en observant l'expression du marqueur phospho-histone H3.

Mécanismes de résistance potentiels

Il est primordial d'élucider les facteurs influençant la réponse aux IC. Ces informations permettraient de déterminer à l'avance si le patient risque de bien répondre à ce type de thérapie. Les normes établies pourraient devenir un critère de sélection dans le choix du traitement pour les patients.

Nous avons observé que le niveau d'expression du récepteur CD33 à la surface cellulaire ne semble pas être un facteur dictant la sensibilité des cellules LMA, ni pour les lignées cellulaires, ni pour les cellules primaires de patients. D'autres laboratoires ont montré qu'en modulant le taux de molécules CD33 dans un type cellulaire donné, la sensibilité à un traitement anti-CD33 était proportionnelle à l'expression du récepteur¹⁷². Par contre, il nous est impossible de moduler l'expression du CD33 pour les cellules leucémiques d'un patient atteint de LMA. Dans un contexte plus près de la réalité clinique, il est encourageant de savoir que des cellules LMA présentant un faible taux de CD33 peuvent être sensibles à un traitement ciblant le récepteur CD33.

L'expression de la molécule CD33 à la surface cellulaire est nécessaire mais la cytotoxicité du conjugué dépend de son internalisation à l'intérieur de la cellule. La cinétique d'internalisation des lignées cellulaires LMA a permis de visualiser leur profil d'internalisation. Malgré la variation au niveau du nombre de molécules CD33 exprimées à la surface cellulaire, chaque lignée exprimait le récepteur CD33 sur plus de 90% de l'ensemble des cellules. Nous avons observé que la lignée cellulaire exprimant le plus haut taux de récepteur CD33, soit TF-1, était celle qui internalisait le conjugué le plus rapidement. Par contre, la lignée cellulaire exprimant le plus faible taux de CD33, NB4, permettait néanmoins d'internaliser approximativement 60% d'anticorps à 24 heures. Ces variantes au niveau de la rapidité d'internalisation des lignées cellulaires ne semblent pas concorder avec les résultats de sensibilité obtenus. En fait, plusieurs autres facteurs en lien avec l'internalisation influencent la sensibilité des cellules. Entre autres, il a été démontré que la réexpression du

récepteur CD33 à la surface cellulaire suite à une première internalisation a un impact sur la toxicité du conjugué¹⁷³.

La visualisation par microscopie nous a permis d'observer une internalisation similaire à celle observée par cytométrie de flux. À des temps précoces, l'anticorps huMy9-6 se retrouve à la membrane cellulaire par un phénomène nommé « capping », processus par lequel les récepteurs se condensent en un ou plusieurs points de la membrane cellulaire. Ensuite, l'anticorps est observable dans le cytoplasme à des temps d'environ 30-40 minutes suivant l'incubation. Une colocalisation possible entre l'anticorps fluorescent et le marquage spécifique à l'endosome a été observée à 40 minutes. Aucune colocalisation n'a été observée avec l'appareil de Golgi. Ces résultats sont cohérents avec le fait que l'endosome est le premier organelle où se retrouvent les protéines suite à l'endocytose par la cellule. En théorie, l'endosome maturera pour devenir lysosome, endroit où l'agent toxique sera libéré de l'anticorps dû à l'acidité de l'environnement. Des manipulations supplémentaires seront nécessaires afin de déterminer si l'anticorps est effectivement localisé dans le lysosome à des temps d'incubation prolongés. De plus, il sera intéressant de déterminer si le même profil d'internalisation sera respecté dans les lignées cellulaires qui expriment la protéine SOCS3.

Nous avons déterminé que la protéine SOCS3 est présente dans les lignées cellulaires les plus résistantes aux immunoconjugués anti-CD33 alors que les lignées les plus sensibles ne l'expriment pas ou très faiblement. Or, la liaison de la protéine SOCS3 à sa cible entraînerait la dégradation du CD33 par le protéasome et SOCS3 jouerait ainsi un rôle dans l'adressage intracellulaire de la protéine CD33 suite à son activation. Le fait que les cellules de lignées LMA exprimant SOCS3 soient plus résistantes aux IC nous amène à penser que le trafic intracellulaire des immunoconjugués anti-CD33 pourrait être affecté par la présence ou l'absence de SOCS3. La protéine SOCS3, en compétition avec SHP-1/2 via son domaine SH2, pourrait lier le récepteur CD33 et entraîner sa polyubiquitination par l'action de la boîte SOCS. Cette polyubiquitination du CD33 entraînerait la dégradation par le protéasome non seulement du CD33-SOCS3 mais aussi de l'immunoconjugué. Cette dégradation de

l'immunoconjugué ne permettrait pas la libération du dérivé toxique de la maytansine et donc affecterait l'efficacité du conjugué. Finalement, on peut penser que l'expression de la protéine SOCS3 par les cellules LMA se traduit par une dégradation de l'immunoconjugué engendrant la résistance aux traitements avec des immunoconjugués anti-CD33.

Plusieurs groupes ont associé l'hyperméthylation des îlots CpG du promoteur SOCS3 avec un « silencing » transcriptionnel. La méthylation des cytosines au niveau des dinucléotides CpG de l'ADN est une modification épigénétique commune ayant un impact sur la structure de la chromatine et l'activité transcriptionnelle. Nous avons évalué de façon relative le niveau de méthylation du promoteur SOCS3 de 4 des lignées cellulaires LMA. La méthylation du promoteur ne semble pas expliquer les différents taux d'expression de la protéine dans les lignées LMA à l'étude vu le fait qu'aucune méthylation n'a été détectée

Conclusions et Perspectives

Les études effectuées ont permis de déterminer que les immunoconjugués anti-CD33 sont internalisés rapidement par la cellule et que le conjugué est retrouvé au niveau de l'endosome en premier lieu. Il a été confirmé que le lysosome est essentiel à l'effet anti-mitotique induit par le conjugué. Aussi, il est proposé que la protéine SOCS3 pourrait jouer un rôle dans la résistance aux immunoconjugués anti-CD33 en dirigeant le complexe IC-CD33-SOCS3 vers le protéasome et ainsi empêcher la libération du composé toxique dans le lysosome. Aussi, nous avons conclu que l'ajout d'un groupement sulfo à la structure de l'AVE9633 (huMy9-6-SPDB-DM4) n'était pas suffisant pour augmenter l'efficacité de l'immunoconjugué. Dans un même ordre d'idée, les modifications apportées pour créer huMy9-6-Peg4-Mal1-DM1 n'ont pas été suffisantes pour accroître la réponse des cellules de patients.

Afin d'élucider l'implication de la protéine SOCS3 dans la résistance aux immunoconjugués anti-CD33, des expériences sont présentement en cours dans notre laboratoire. L'expression de la protéine SOCS3 dans les lignées qui ne l'expriment pas, soit HL60HMR et HL60Qc et l'inhibition dans les lignées qui l'expriment, soit HL60/S, NB4 et TF-1, nous permettra de valider l'hypothèse selon laquelle la présence de SOCS3 pourrait engendrer la résistance aux traitements anti-CD33. La construction contenant la séquence SOCS3 nécessaire à la surexpression de la protéine est complétée ainsi que la synthèse de la construction contenant un shRNA nécessaire à l'inhibition de la transcription. Dans chaque cas, l'infection des lignées cellulaires par des rétrovirus est en cours et nous espérons des résultats positifs sous peu.

Aussi en cours au laboratoire, l'étude par microscopie du transport intracellulaire du conjugué. Nous en sommes à confirmer la localisation à l'endosome et par la suite, au lysosome du conjugué. De plus, il sera intéressant d'étudier le transport du conjugué dans le contexte d'une lignée plus résistante au conjugué : est-ce qu'une lignée exprimant la protéine SOCS3 dirige le conjugué au niveau de protéasome au lieu du lysosome? Ce

processus sera aussi étudié dans les lignées pour lesquelles nous aurons modulé, exprimé ou inhibé selon la lignée cellulaire, l'expression de la protéine SOCS3.

Finalement, il sera important de vérifier si les cellules primaires de patients réagissent de la même façon que les lignées cellulaires. Il sera important de déterminer le profil d'expression de la protéine SOCS3 et le statut de méthylation de son promoteur. Avec ces informations supplémentaires, il sera possible de vérifier s'il y a corrélation avec les résultats de sensibilité aux immunoconjugués.

Pour conclure, le développement d'un immunoconjugué anti-CD33 ayant les caractéristiques idéales de forte toxicité envers les cellules leucémiques et de sécurité face aux cellules saines ainsi que des effets secondaires négligeables représente un objectif très important afin d'augmenter l'activité de nos traitements actuels. Chaque information recueillie est importante afin de déterminer les facteurs influençant la réponse aux traitements et ainsi améliorer la sélection des patients aptes à recevoir ce type de traitement. Les immunoconjugués représentent une approche thérapeutique très intéressante pour les patients souffrant de leucémie myéloïde aigue, particulièrement chez les personnes âgées pour qui les traitements de chimiothérapie actuels sont souvent trop agressifs. Nous devons continuer à déployer tous les efforts possibles pour rendre ces traitements accessibles à ces patients.

Références bibliographiques

Référence Bibliographique

1. Krause,D.S., Fackler,M.J., Civin,C.I., & May,W.S. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* **87**, 1-13 (1996).
2. Sutherland,D.R. & Keating,A. The CD34 antigen: structure, biology, and potential clinical applications. *J. Hematother.* **1**, 115-129 (1992).
3. Baum,C.M., Weissman,I.L., Tsukamoto,A.S., Buckle,A.M., & Peault,B. Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**, 2804-2808 (1992).
4. Terstappen,L.W. & Huang,S. Analysis of bone marrow stem cell. *Blood Cells* **20**, 45-61 (1994).
5. Huang,S. & Terstappen,L.W. Lymphoid and myeloid differentiation of single human CD34+, HLA-DR+, CD38- hematopoietic stem cells. *Blood* **83**, 1515-1526 (1994).
6. Osawa,M., Hanada,K., Hamada,H., & Nakauchi,H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* **273**, 242-245 (1996).
7. Bhatia,M., Bonnet,D., Murdoch,B., Gan,O.I., & Dick,J.E. A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. *Nat. Med.* **4**, 1038-1045 (1998).
8. Zanjani,E.D., Almeida-Porada,G., Livingston,A.G., Flake,A.W., & Ogawa,M. Human bone marrow CD34- cells engraft in vivo and undergo multilineage expression that includes giving rise to CD34+ cells. *Exp. Hematol.* **26**, 353-360 (1998).
9. Morrison,S.J. & Weissman,I.L. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity.* **1**, 661-673 (1994).
10. Morrison,S.J., Wright,D.E., & Weissman,I.L. Cyclophosphamide/granulocyte colony-stimulating factor induces hematopoietic stem cells to proliferate prior to mobilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 1908-1913 (1997).
11. Kondo,M. *et al.* Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 759-806 (2003).
12. Christensen,J.L. & Weissman,I.L. Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 14541-14546 (2001).

13. Akashi,K., Traver,D., Miyamoto,T., & Weissman,I.L. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* **404**, 193-197 (2000).
14. Kondo,M., Weissman,I.L., & Akashi,K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* **91**, 661-672 (1997).
15. Manz,M.G., Traver,D., Miyamoto,T., Weissman,I.L., & Akashi,K. Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood* **97**, 3333-3341 (2001).
16. Reya,T., Morrison,S.J., Clarke,M.F., & Weissman,I.L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**, 105-111 (2001).
17. Blair,A., Hogge,D.E., Ailles,L.E., Lansdorp,P.M., & Sutherland,H.J. Lack of expression of Thy-1 (CD90) on acute myeloid leukemia cells with long-term proliferative ability in vitro and in vivo. *Blood* **89**, 3104-3112 (1997).
18. Bonnet,D. & Dick,J.E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* **3**, 730-737 (1997).
19. Ravandi,F. & Estrov,Z. Eradication of leukemia stem cells as a new goal of therapy in leukemia. *Clin. Cancer Res.* **12**, 340-344 (2006).
20. Sperr,W.R. *et al.* Human leukaemic stem cells: a novel target of therapy. *Eur. J. Clin. Invest* **34 Suppl 2**, 31-40 (2004).
21. Shipley,J.L. & Butera,J.N. Acute myelogenous leukemia. *Exp. Hematol.* **37**, 649-658 (2009).
22. Deschler,B. & Lubbert,M. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer* **107**, 2099-2107 (2006).
23. Aquino,V.M. Acute myelogenous leukemia. *Curr. Probl. Pediatr. Adolesc. Health Care* **32**, 50-58 (2002).
24. National Cancer Institute. SEER cancer statistics review. 2010.
Ref Type: Online Source
25. American Cancer Society. Cancer Facts and Figures 2011. 2011.
Ref Type: Online Source
26. Hoffman,R. *Hematology: Basic Principles and Practice*(2005).
27. Vardiman,J.W., Harris,N.L., & Brunning,R.D. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* **100**, 2292-2302 (2002).

28. Vardiman, J.W. *et al.* The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* **114**, 937-951 (2009).
29. Arber, D.A. Realistic pathologic classification of acute myeloid leukemias. *Am. J. Clin. Pathol.* **115**, 552-560 (2001).
30. Robak, T. & Wierzbowska, A. Current and emerging therapies for acute myeloid leukemia. *Clin. Ther.* **31 Pt 2**, 2349-2370 (2009).
31. Farag, S.S. *et al.* Outcome of induction and postremission therapy in younger adults with acute myeloid leukemia with normal karyotype: a cancer and leukemia group B study. *J. Clin. Oncol.* **23**, 482-493 (2005).
32. Skovsgaard, T. & Nissen, N.I. Membrane transport of anthracyclines. *Pharmacol. Ther.* **18**, 293-311 (1982).
33. Tewey, K.M., Rowe, T.C., Yang, L., Halligan, B.D., & Liu, L.F. Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science* **226**, 466-468 (1984).
34. Tallman, M.S., Gilliland, D.G., & Rowe, J.M. Drug therapy for acute myeloid leukemia. *Blood* **106**, 1154-1163 (2005).
35. Berman, E. *et al.* Results of a randomized trial comparing idarubicin and cytosine arabinoside with daunorubicin and cytosine arabinoside in adult patients with newly diagnosed acute myelogenous leukemia. *Blood* **77**, 1666-1674 (1991).
36. Rowe, J.M. Consolidation therapy: what should be the standard of care? *Best. Pract. Res. Clin. Haematol.* **21**, 53-60 (2008).
37. Cassileth, P.A. *et al.* Chemotherapy compared with autologous or allogeneic bone marrow transplantation in the management of acute myeloid leukemia in first remission. *N. Engl. J. Med.* **339**, 1649-1656 (1998).
38. Milligan, D.W. *et al.* Guidelines on the management of acute myeloid leukaemia in adults. *Br. J. Haematol.* **135**, 450-474 (2006).
39. Buchner, T. *et al.* Acute myeloid leukemia in adults: is postconsolidation maintenance therapy necessary? *Int. J. Hematol.* **72**, 285-289 (2000).
40. Robak, T. & Wrzesien-Kus, A. The search for optimal treatment in relapsed and refractory acute myeloid leukemia. *Leuk. Lymphoma* **43**, 281-291 (2002).
41. Cassileth, P.A. *et al.* Chemotherapy compared with autologous or allogeneic bone marrow transplantation in the management of acute myeloid leukemia in first remission. *N. Engl. J. Med.* **339**, 1649-1656 (1998).

42. Nathan,P.C., Sung,L., Crump,M., & Beyene,J. Consolidation therapy with autologous bone marrow transplantation in adults with acute myeloid leukemia: a meta-analysis. *J. Natl. Cancer Inst.* **96**, 38-45 (2004).
43. Tsimberidou,A.M. *et al.* Comparison of allogeneic stem cell transplantation, high-dose cytarabine, and autologous peripheral stem cell transplantation as postremission treatment in patients with de novo acute myelogenous leukemia. *Cancer* **97**, 1721-1731 (2003).
44. Burnett,A.K. *et al.* The value of allogeneic bone marrow transplant in patients with acute myeloid leukaemia at differing risk of relapse: results of the UK MRC AML 10 trial. *Br. J. Haematol.* **118**, 385-400 (2002).
45. Suciú,S. *et al.* Allogeneic compared with autologous stem cell transplantation in the treatment of patients younger than 46 years with acute myeloid leukemia (AML) in first complete remission (CR1): an intention-to-treat analysis of the EORTC/GIMEMAAML-10 trial. *Blood* **102**, 1232-1240 (2003).
46. Harousseau,J.L. *et al.* Comparison of autologous bone marrow transplantation and intensive chemotherapy as postremission therapy in adult acute myeloid leukemia. The Groupe Ouest Est Leucemies Aigues Myeloblastiques (GOELAM). *Blood* **90**, 2978-2986 (1997).
47. Cornelissen,J.J. *et al.* Results of a HOVON/SAKK donor versus no-donor analysis of myeloablative HLA-identical sibling stem cell transplantation in first remission acute myeloid leukemia in young and middle-aged adults: benefits for whom? *Blood* **109**, 3658-3666 (2007).
48. Mato,A.R., Morgans,A., & Luger,S.M. Novel strategies for relapsed and refractory acute myeloid leukemia. *Curr. Opin. Hematol.* **15**, 108-114 (2008).
49. Estey,E.H. Treatment of relapsed and refractory acute myelogenous leukemia. *Leukemia* **14**, 476-479 (2000).
50. Craddock,C., Tauro,S., Moss,P., & Grimwade,D. Biology and management of relapsed acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* **129**, 18-34 (2005).
51. Breems,D.A. *et al.* Prognostic index for adult patients with acute myeloid leukemia in first relapse. *J. Clin. Oncol.* **23**, 1969-1978 (2005).
52. Chantry,A.D. *et al.* Long-term outcomes of myeloablation and autologous transplantation of relapsed acute myeloid leukemia in second remission: a British Society of Blood and Marrow Transplantation registry study. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **12**, 1310-1317 (2006).

53. Grigg,A.P. *et al.* Factors affecting the outcome of allogeneic bone marrow transplantation for adult patients with refractory or relapsed acute leukaemia. *Br. J. Haematol.* **107**, 409-418 (1999).
54. Boiron,J.M. *et al.* Allogeneic transplantation for patients with advanced acute leukemia: a single center retrospective study of 92 patients. *Leuk. Lymphoma* **41**, 285-296 (2001).
55. Lech-Maranda,E., Korycka,A., & Robak,T. Pharmacological and clinical studies on purine nucleoside analogs--new anticancer agents. *Mini. Rev. Med. Chem.* **6**, 575-581 (2006).
56. Tallman,M.S. New strategies for the treatment of acute myeloid leukemia including antibodies and other novel agents. *Hematology. Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* 143-150 (2005).
57. Giles,F.J. Troxacitabine-based therapy of refractory leukemia. *Expert. Rev. Anticancer Ther.* **2**, 261-266 (2002).
58. Serova,M. *et al.* Antiproliferative effects of sapacitabine (CYC682), a novel 2'-deoxycytidine-derivative, in human cancer cells. *Br. J. Cancer* **97**, 628-636 (2007).
59. Damiani,D. *et al.* The role of MDR-related proteins in the prognosis of adult acute myeloid leukaemia (AML) with normal karyotype. *Hematol. Oncol.* **25**, 38-43 (2007).
60. Wilson,C.S. *et al.* Gene expression profiling of adult acute myeloid leukemia identifies novel biologic clusters for risk classification and outcome prediction. *Blood* **108**, 685-696 (2006).
61. Braun,T. & Fenaux,P. Farnesyltransferase inhibitors and their potential role in therapy for myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* **141**, 576-586 (2008).
62. Le,D.T. & Shannon,K.M. Ras processing as a therapeutic target in hematologic malignancies. *Curr. Opin. Hematol.* **9**, 308-315 (2002).
63. Fandy,T.E., Carraway,H., & Gore,S.D. DNA demethylating agents and histone deacetylase inhibitors in hematologic malignancies. *Cancer J.* **13**, 40-48 (2007).
64. Kuendgen,A. & Germing,U. Emerging treatment strategies for acute myeloid leukemia (AML) in the elderly. *Cancer Treat. Rev.* **35**, 97-120 (2009).
65. Saiki,J.H. *et al.* 5-azacytidine in acute leukemia. *Cancer* **42**, 2111-2114 (1978).
66. Sudan,N. *et al.* Treatment of acute myelogenous leukemia with outpatient azacitidine. *Cancer* **107**, 1839-1843 (2006).

67. Cashen,A.F., Schiller,G.J., O'Donnell,M.R., & DiPersio,J.F. Multicenter, phase II study of decitabine for the first-line treatment of older patients with acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* **28**, 556-561 (2010).
68. Maslak,P. *et al.* Pilot study of combination transcriptional modulation therapy with sodium phenylbutyrate and 5-azacytidine in patients with acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome. *Leukemia* **20**, 212-217 (2006).
69. Garcia-Manero,G. *et al.* Phase 1 study of the oral isotype specific histone deacetylase inhibitor MGCD0103 in leukemia. *Blood* **112**, 981-989 (2008).
70. Mrozek,K., Marcucci,G., Paschka,P., Whitman,S.P., & Bloomfield,C.D. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood* **109**, 431-448 (2007).
71. Frohling,S. *et al.* Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. *Blood* **100**, 4372-4380 (2002).
72. Levis,M., Pham,R., Smith,B.D., & Small,D. In vitro studies of a FLT3 inhibitor combined with chemotherapy: sequence of administration is important to achieve synergistic cytotoxic effects. *Blood* **104**, 1145-1150 (2004).
73. Marcucci,G. *et al.* G3139, a BCL-2 antisense oligo-nucleotide, in AML. *Ann. Hematol.* **83 Suppl 1**, S93-S94 (2004).
74. Marcucci,G. *et al.* Phase 1 and pharmacodynamic studies of G3139, a Bcl-2 antisense oligonucleotide, in combination with chemotherapy in refractory or relapsed acute leukemia. *Blood* **101**, 425-432 (2003).
75. Vitale,C. *et al.* Engagement of p75/AIRM1 or CD33 inhibits the proliferation of normal or leukemic myeloid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 15091-15096 (1999).
76. Bross,P.F. *et al.* Approval summary: gemtuzumab ozogamicin in relapsed acute myeloid leukemia. *Clin. Cancer Res.* **7**, 1490-1496 (2001).
77. Ricart,A.D. & Tolcher,A.W. Technology insight: cytotoxic drug immunoconjugates for cancer therapy. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* **4**, 245-255 (2007).
78. Larson,R.A. *et al.* Final report of the efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first recurrence. *Cancer* **104**, 1442-1452 (2005).

79. Hanbali,A., Wollner,I., Neme,K., & Ulreich,C. Fatal hypersensitivity reaction to gemtuzumab ozogamicin associated with platelet transfusion. *Am. J. Health Syst. Pharm.* **64**, 1401-1402 (2007).
80. Pfizer Oncology. Withdrawal of Mylotarg. 2012. 2010.
Ref Type: Internet Communication
81. Nabhan,C. *et al.* Gemtuzumab ozogamicin (MylotargTM) is infrequently associated with sinusoidal obstructive syndrome/veno-occlusive disease. *Ann. Oncol.* **15**, 1231-1236 (2004).
82. Riechmann,L., Clark,M., Waldmann,H., & Winter,G. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* **332**, 323-327 (1988).
83. Liu,A.Y. *et al.* Chimeric mouse-human IgG1 antibody that can mediate lysis of cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **84**, 3439-3443 (1987).
84. Grillo-Lopez,A.J., Hedrick,E., Rashford,M., & Benyunes,M. Rituximab: ongoing and future clinical development. *Semin. Oncol.* **29**, 105-112 (2002).
85. Ceze,N. *et al.* [Target antigens for therapeutic antibodies in oncology: many candidates, few successes]. *Bull. Cancer* **94**, F129-F136 (2007).
86. Zangemeister-Wittke,U. Antibodies for targeted cancer therapy -- technical aspects and clinical perspectives. *Pathobiology* **72**, 279-286 (2005).
87. Chari,R.V. Targeted cancer therapy: conferring specificity to cytotoxic drugs. *Acc. Chem. Res.* **41**, 98-107 (2008).
88. Law,C.L. *et al.* Lymphocyte activation antigen CD70 expressed by renal cell carcinoma is a potential therapeutic target for anti-CD70 antibody-drug conjugates. *Cancer Res.* **66**, 2328-2337 (2006).
89. Vitetta,E.S., Thorpe,P.E., & Uhr,J.W. Immunotoxins: magic bullets or misguided missiles? *Immunol. Today* **14**, 252-259 (1993).
90. Meister,A. & Anderson,M.E. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* **52**, 711-760 (1983).
91. Wu,A.M. & Senter,P.D. Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates. *Nat. Biotechnol.* **23**, 1137-1146 (2005).
92. Dubowchik,G.M. *et al.* Cathepsin B-labile dipeptide linkers for lysosomal release of doxorubicin from internalizing immunoconjugates: model studies of enzymatic drug release and antigen-specific in vitro anticancer activity. *Bioconjug. Chem.* **13**, 855-869 (2002).

93. Mukherjee,S., Ghosh,R.N., & Maxfield,F.R. Endocytosis. *Physiol Rev.* **77**, 759-803 (1997).
94. Maxfield,F.R. & McGraw,T.E. Endocytic recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 121-132 (2004).
95. Lemmon,S.K. Clathrin uncoating: Auxilin comes to life. *Curr. Biol.* **11**, R49-R52 (2001).
96. Weber,T. *et al.* SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* **92**, 759-772 (1998).
97. Schrama,D., Reisfeld,R.A., & Becker,J.C. Antibody targeted drugs as cancer therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 147-159 (2006).
98. Garnett,M.C. Targeted drug conjugates: principles and progress. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **53**, 171-216 (2001).
99. Hernandez-Caselles,T. *et al.* A study of CD33 (SIGLEC-3) antigen expression and function on activated human T and NK cells: two isoforms of CD33 are generated by alternative splicing. *J. Leukoc. Biol.* **79**, 46-58 (2006).
100. Andrews,R.G., Torok-Storb,B., & Bernstein,I.D. Myeloid-associated differentiation antigens on stem cells and their progeny identified by monoclonal antibodies. *Blood* **62**, 124-132 (1983).
101. Simmons,D. & Seed,B. Isolation of a cDNA encoding CD33, a differentiation antigen of myeloid progenitor cells. *J. Immunol.* **141**, 2797-2800 (1988).
102. Crocker,P.R., Paulson,J.C., & Varki,A. Siglecs and their roles in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 255-266 (2007).
103. Dinndorf,P.A. *et al.* Expression of normal myeloid-associated antigens by acute leukemia cells. *Blood* **67**, 1048-1053 (1986).
104. Hauswirth,A.W. *et al.* Expression of the target receptor CD33 in CD34+/CD38-/CD123+ AML stem cells. *Eur. J. Clin. Invest* **37**, 73-82 (2007).
105. van,R.A. *et al.* Aberrant marker expression patterns on the CD34+. *Leukemia* **21**, 1700-1707 (2007).
106. Crocker,P.R. & Redelinghuys,P. Siglecs as positive and negative regulators of the immune system. *Biochem. Soc. Trans.* **36**, 1467-1471 (2008).
107. Crocker,P.R. Siglecs: sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins in cell-cell interactions and signalling. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**, 609-615 (2002).

108. McMillan,S.J. & Crocker,P.R. CD33-related sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins in health and disease. *Carbohydr. Res.* **343**, 2050-2056 (2008).
109. Brinkman-Van der Linden EC *et al.* CD33/Siglec-3 binding specificity, expression pattern, and consequences of gene deletion in mice. *Mol. Cell Biol.* **23**, 4199-4206 (2003).
110. Vitale,C. *et al.* Surface expression and function of p75/AIRM-1 or CD33 in acute myeloid leukemias: engagement of CD33 induces apoptosis of leukemic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 5764-5769 (2001).
111. Vitale,C. *et al.* Engagement of p75/AIRM1 or CD33 inhibits the proliferation of normal or leukemic myeloid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 15091-15096 (1999).
112. Walter,R.B. *et al.* ITIM-dependent endocytosis of CD33-related Siglecs: role of intracellular domain, tyrosine phosphorylation, and the tyrosine phosphatases, Shp1 and Shp2. *J. Leukoc. Biol.* **83**, 200-211 (2008).
113. Lapusan,S. *et al.* Phase I studies of AVE9633, an anti-CD33 antibody-maytansinoid conjugate, in adult patients with relapsed/refractory acute myeloid leukemia. *Invest New Drugs*(2011).
114. Kupchan,S.M. *et al.* Maytansine, a novel antileukemic ansa macrolide from *Maytenus ovatus*. *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 1354-1356 (1972).
115. Remillard,S., Rebhun,L.I., Howie,G.A., & Kupchan,S.M. Antimitotic activity of the potent tumor inhibitor maytansine. *Science* **189**, 1002-1005 (1975).
116. Bhattacharyya,B. & Wolff,J. Maytansine binding to the vinblastine sites of tubulin. *FEBS Lett.* **75**, 159-162 (1977).
117. Oroudjev,E. *et al.* Maytansinoid-antibody conjugates induce mitotic arrest by suppressing microtubule dynamic instability. *Mol. Cancer Ther.* **9**, 2700-2713 (2010).
118. Jordan,M.A. & Wilson,L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 253-265 (2004).
119. Jordan,M.A. & Wilson,L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 253-265 (2004).
120. Jordan,M.A. Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* **2**, 1-17 (2002).

121. Jordan, M.A. & Kamath, K. How do microtubule-targeted drugs work? An overview. *Curr. Cancer Drug Targets*. **7**, 730-742 (2007).
122. Cassady, J.M., Chan, K.K., Floss, H.G., & Leistner, E. Recent developments in the maytansinoid antitumor agents. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **52**, 1-26 (2004).
123. Issell, B.F. & Crooke, S.T. Maytansine. *Cancer Treat. Rev.* **5**, 199-207 (1978).
124. Tassone, P. *et al.* Cytotoxic activity of the maytansinoid immunoconjugate B-B4-DM1 against CD138+ multiple myeloma cells. *Blood* **104**, 3688-3696 (2004).
125. Erickson, H.K. *et al.* Antibody-maytansinoid conjugates are activated in targeted cancer cells by lysosomal degradation and linker-dependent intracellular processing. *Cancer Res.* **66**, 4426-4433 (2006).
126. Pacifici, G.M., Santerini, S., Giuliani, L., & Rane, A. Thiol methyltransferase in humans: development and tissue distribution. *Dev. Pharmacol. Ther.* **17**, 8-15 (1991).
127. Lopus, M. *et al.* Maytansine and cellular metabolites of antibody-maytansinoid conjugates strongly suppress microtubule dynamics by binding to microtubules. *Mol. Cancer Ther.* **9**, 2689-2699 (2010).
128. Linenberger, M.L. CD33-directed therapy with gemtuzumab ozogamicin in acute myeloid leukemia: progress in understanding cytotoxicity and potential mechanisms of drug resistance. *Leukemia* **19**, 176-182 (2005).
129. van der Velden, V.H. *et al.* High CD33-antigen loads in peripheral blood limit the efficacy of gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) treatment in acute myeloid leukemia patients. *Leukemia* **18**, 983-988 (2004).
130. Walter, R.B. *et al.* Multidrug resistance protein attenuates gemtuzumab ozogamicin-induced cytotoxicity in acute myeloid leukemia cells. *Blood* **102**, 1466-1473 (2003).
131. Linenberger, M.L. *et al.* Multidrug-resistance phenotype and clinical responses to gemtuzumab ozogamicin. *Blood* **98**, 988-994 (2001).
132. Legrand, O., Zittoun, R., & Marie, J.P. Role of MRP1 in multidrug resistance in acute myeloid leukemia. *Leukemia* **13**, 578-584 (1999).
133. Van Der Kolk, D.M. *et al.* P-glycoprotein and multidrug resistance protein activities in relation to treatment outcome in acute myeloid leukemia. *Clin. Cancer Res.* **6**, 3205-3214 (2000).
134. Legrand, O., Zittoun, R., & Marie, J.P. Role of MRP1 in multidrug resistance in acute myeloid leukemia. *Leukemia* **13**, 578-584 (1999).

135. Legrand,O., Simonin,G., Beauchamp-Nicoud,A., Zittoun,R., & Marie,J.P. Simultaneous activity of MRP1 and Pgp is correlated with in vitro resistance to daunorubicin and with in vivo resistance in adult acute myeloid leukemia. *Blood* **94**, 1046-1056 (1999).
136. Walter,R.B. *et al.* The peripheral benzodiazepine receptor ligand PK11195 overcomes different resistance mechanisms to sensitize AML cells to gemtuzumab ozogamicin. *Blood* **103**, 4276-4284 (2004).
137. Haag,P. *et al.* Deficient activation of Bak and Bax confers resistance to gemtuzumab ozogamicin-induced apoptotic cell death in AML. *Exp. Hematol.* **37**, 755-766 (2009).
138. Balaian,L., Zhong,R.K., & Ball,E.D. The inhibitory effect of anti-CD33 monoclonal antibodies on AML cell growth correlates with Syk and/or ZAP-70 expression. *Exp. Hematol.* **31**, 363-371 (2003).
139. Balaian,L. & Ball,E.D. Cytotoxic activity of gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) in acute myeloid leukemia correlates with the expression of protein kinase Syk. *Leukemia* **20**, 2093-2101 (2006).
140. Balaian,L. & Ball,E.D. Direct effect of bispecific anti-CD33 x anti-CD64 antibody on proliferation and signaling in myeloid cells. *Leuk. Res.* **25**, 1115-1125 (2001).
141. Goodman,P.A., Wood,C.M., Vassilev,A., Mao,C., & Uckun,F.M. Spleen tyrosine kinase (Syk) deficiency in childhood pro-B cell acute lymphoblastic leukemia. *Oncogene* **20**, 3969-3978 (2001).
142. Goodman,P.A., Burkhardt,N., Juran,B., Tibbles,H.E., & Uckun,F.M. Hypermethylation of the spleen tyrosine kinase promoter in T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Oncogene* **22**, 2504-2514 (2003).
143. Ushmorov,A. *et al.* Epigenetic processes play a major role in B-cell-specific gene silencing in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* **107**, 2493-2500 (2006).
144. Coopman,P.J. *et al.* The Syk tyrosine kinase suppresses malignant growth of human breast cancer cells. *Nature* **406**, 742-747 (2000).
145. Yuan,Y., Mendez,R., Sahin,A., & Dai,J.L. Hypermethylation leads to silencing of the SYK gene in human breast cancer. *Cancer Res.* **61**, 5558-5561 (2001).
146. Jedema,I. *et al.* Internalization and cell cycle-dependent killing of leukemic cells by Gemtuzumab Ozogamicin: rationale for efficacy in CD33-negative malignancies with endocytic capacity. *Leukemia* **18**, 316-325 (2004).

147. Orr,S.J. *et al.* CD33 responses are blocked by SOCS3 through accelerated proteasomal-mediated turnover. *Blood* **109**, 1061-1068 (2007).
148. Hilton,D.J. Negative regulators of cytokine signal transduction. *Cell Mol. Life Sci.* **55**, 1568-1577 (1999).
149. Kile,B.T. *et al.* The SOCS box: a tale of destruction and degradation. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 235-241 (2002).
150. Patton,E.E., Willems,A.R., & Tyers,M. Combinatorial control in ubiquitin-dependent proteolysis: don't Skp the F-box hypothesis. *Trends Genet.* **14**, 236-243 (1998).
151. Hershko,A. & Ciechanover,A. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 425-479 (1998).
152. Kamura,T. *et al.* The Elongin BC complex interacts with the conserved SOCS-box motif present in members of the SOCS, ras, WD-40 repeat, and ankyrin repeat families. *Genes Dev.* **12**, 3872-3881 (1998).
153. Greenhalgh,C.J. & Hilton,D.J. Negative regulation of cytokine signaling. *J. Leukoc. Biol.* **70**, 348-356 (2001).
154. De,S.P. *et al.* Socs1 binds to multiple signalling proteins and suppresses steel factor-dependent proliferation. *EMBO J.* **18**, 904-915 (1999).
155. Stoiber,D. *et al.* Lipopolysaccharide induces in macrophages the synthesis of the suppressor of cytokine signaling 3 and suppresses signal transduction in response to the activating factor IFN-gamma. *J. Immunol.* **163**, 2640-2647 (1999).
156. Kario,E. *et al.* Suppressors of cytokine signaling 4 and 5 regulate epidermal growth factor receptor signaling. *J. Biol. Chem.* **280**, 7038-7048 (2005).
157. Espert,L., Dusanter-Fourt,I., & Chelbi-Alix,M.K. [Negative regulation of the JAK/STAT: pathway implication in tumorigenesis]. *Bull. Cancer* **92**, 845-857 (2005).
158. Kile,B.T. & Alexander,W.S. The suppressors of cytokine signalling (SOCS). *Cell Mol. Life Sci.* **58**, 1627-1635 (2001).
159. Jo,D., Liu,D., Yao,S., Collins,R.D., & Hawiger,J. Intracellular protein therapy with SOCS3 inhibits inflammation and apoptosis. *Nat. Med.* **11**, 892-898 (2005).
160. Roberts,A.W. *et al.* Placental defects and embryonic lethality in mice lacking suppressor of cytokine signaling 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 9324-9329 (2001).

161. Marine, J.C. *et al.* SOCS3 is essential in the regulation of fetal liver erythropoiesis. *Cell* **98**, 617-627 (1999).
162. Sakai, I., Takeuchi, K., Yamauchi, H., Narumi, H., & Fujita, S. Constitutive expression of SOCS3 confers resistance to IFN- α in chronic myelogenous leukemia cells. *Blood* **100**, 2926-2931 (2002).
163. Barclay, J.L., Anderson, S.T., Waters, M.J., & Curlewis, J.D. SOCS3 as a tumor suppressor in breast cancer cells, and its regulation by PRL. *Int. J. Cancer* **124**, 1756-1766 (2009).
164. Orr, S.J. *et al.* SOCS3 targets Siglec 7 for proteasomal degradation and blocks Siglec 7-mediated responses. *J. Biol. Chem.* **282**, 3418-3422 (2007).
165. Middeldorf, I. *et al.* Sequence of administration and methylation of SOCS3 may govern response to gemtuzumab ozogamicin in combination with conventional chemotherapy in patients with refractory or relapsed acute myelogenous leukemia (AML). *Am. J. Hematol.* **85**, 477-481 (2010).
166. Kovtun, Y.V. *et al.* Antibody-maytansinoid conjugates designed to bypass multidrug resistance. *Cancer Res.* **70**, 2528-2537 (2010).
167. Loo, T.W. & Clarke, D.M. Recent progress in understanding the mechanism of P-glycoprotein-mediated drug efflux. *J. Membr. Biol.* **206**, 173-185 (2005).
168. Lowenberg, B., Downing, J.R., & Burnett, A. Acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **341**, 1051-1062 (1999).
169. Sasaki, A. *et al.* CIS3/SOCS-3 suppresses erythropoietin (EPO) signaling by binding the EPO receptor and JAK2. *J. Biol. Chem.* **275**, 29338-29347 (2000).
170. Bjorbak, C. *et al.* SOCS3 mediates feedback inhibition of the leptin receptor via Tyr985. *J. Biol. Chem.* **275**, 40649-40657 (2000).
171. Yoshimori, T., Yamamoto, A., Moriyama, Y., Futai, M., & Tashiro, Y. Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *J. Biol. Chem.* **266**, 17707-17712 (1991).
172. Walter, R.B., Raden, B.W., Kamikura, D.M., Cooper, J.A., & Bernstein, I.D. Influence of CD33 expression levels and ITIM-dependent internalization on gemtuzumab ozogamicin-induced cytotoxicity. *Blood* **105**, 1295-1302 (2005).
173. van der Velden, V.H. *et al.* Targeting of the CD33-calicheamicin immunoconjugate Mylotarg (CMA-676) in acute myeloid leukemia: in vivo and in vitro saturation and internalization by leukemic and normal myeloid cells. *Blood* **97**, 3197-3204 (2001).

174. Tokita,T. *et al.* Methylation status of the SOCS3 gene in human malignant melanomas. *Int. J. Oncol.* **30**, 689-694 (2007).
175. Fourouclas,N. *et al.* Methylation of the suppressor of cytokine signaling 3 gene (SOCS3) in myeloproliferative disorders. *Haematologica* **93**, 1635-1644 (2008).
176. Niwa,Y. *et al.* Methylation silencing of SOCS-3 promotes cell growth and migration by enhancing JAK/STAT and FAK signalings in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* **24**, 6406-6417 (2005).
177. Tang,R. *et al.* P-gp activity is a critical resistance factor against AVE9633 and DM4 cytotoxicity in leukaemia cell lines, but not a major mechanism of chemoresistance in cells from acute myeloid leukaemia patients. *BMC. Cancer* **9**, 199 (2009).