

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 160**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2013** **E 16178598 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018** **EP 3150224**

54 Título: **Inhibidores de la ruta de señalización de CD95 para el tratamiento de MDS**

30 Prioridad:

18.07.2012 EP 12176974

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

10.06.2019

73 Titular/es:

**APOGENIX AG (100.0%)
Im Neuenheimer Feld 584
69120 Heidelberg, DE**

72 Inventor/es:

**FRICKE, HARALD;
FONTENAY, MICHAELA y
KUNZ, CLAUDIA**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 716 160 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Inhibidores de la ruta de señalización de CD95 para el tratamiento de MDS

5 La presente invención se refiere a inhibidores de la ruta de señalización del CD95 para su uso en el tratamiento del síndrome mielodisplásico (MDS) donde el MDS se selecciona de entre el subgrupo de MDS de bajo riesgo según el IPSS y/o el subgrupo de MDS de riesgo intermedio-1 (int-1) según el IPSS así como a un método para diagnosticar el MDS.

10 Los síndromes mielodisplásicos (MDS) son trastornos de las células madre hematopoyéticas clonales que se caracterizan por hematopoyesis ineficaz que da lugar a citopenias sanguíneas, especialmente anemia, y a menudo están implicados en la leucemia mieloide aguda (AML). En particular, los MDS se pueden caracterizar por el deficiente crecimiento de células progenitoras eritroides. En consecuencia, los MDS se clasifican comúnmente basándose en la morfología y el porcentaje de células blásticas en la sangre y la médula ósea (clasificaciones French American British (FAB) y de la OMS) (Bennett *et al*, 1982; Vardiman *et al*, 2009).

15 La eritropoyesis está controlada por un equilibrio entre las señales positivas y negativas que implican la interacción célula-célula y los factores solubles en las islas eritroblásticas de la médula ósea. Una visión en conjunto de la eritropoyesis se muestra en la figura 1. La restricción de las células madre hematopoyéticas (HSC) CD34⁺ al linaje eritroide está bajo el control de factores de transcripción importantes tales como GATA-1 y citocinas como el ligando c-Kit, el factor de células madre (SCF). El tamaño del compartimento eritroide está regulado por incremento por la eritropoyetina que estimula la maduración de CFU-E y pro-eritroblastos y evita su apoptosis. Las células eritroides adquieren la expresión de CD71 de membrana (receptor de transferencia) que continúa con la de glucoforina A (GPA) en las células más maduras (figura 1).

20 La regulación negativa de la eritropoyesis depende de Fas/FasL que contribuyen a la apoptosis de los eritroblastos inmaduros que expresan Fas por interacción con FasL que se expresa en los precursores eritroides maduros (De Maria *et al*, 1999) y también por autorregulación de los eritroblastos en el mismo estadio de diferenciación (Socolovski *et al*, 2008). La maduración de los precursores eritroides normales requiere la activación de la caspasa-3, aunque la actividad de la caspasa-8 no se ha probado (De Maria *et al*, 1999; Zermati *et al*, 2001). La escisión de los sustratos de la caspasa-3 es limitada. Por ejemplo, GATA-1 es un sustrato para la caspasa-3 en condiciones de privación de eritropoyetina, aunque en presencia de Epo, GATA-1 está protegido de la escisión por la interacción con la Hsp70 que se transloca desde el citosol al núcleo (Ribeil *et al*, 2007).

30 La diseritropoyesis en MDS se asocia con la activación ectópica de la caspasa-8 corriente abajo de Fas. El grupo de los solicitantes y otros habían demostrado anteriormente que Fas está sobreexpresado en la superficie de las células progenitoras inmaduras CD34⁺ y en células progenitoras eritroides restringidas. La expresión de Fas aumentaba a lo largo de la diferenciación eritroide con la aparición de la expresión del ligando Fas en los precursores eritroides positivos para GPA dando como resultado la activación ectópica de la caspasa-8 en el linaje eritroide. Esto se observó en células recién recolectadas de médula ósea (Bouscary *et al*, 1997), así como en células eritroides derivadas de un cultivo líquido en 2 etapas (Claessens *et al*, 2002). La inhibición de la señalización de Fas por la expresión ectópica de un mutante dominante negativo que se expresó en lentivirus del adaptador FADD, disminuía la activación de caspasa-8, e inhibía la apoptosis de los precursores eritroides en MDS (Claessens *et al*, 2005). Fas/FasL pueden contribuir a evitar la diferenciación eritroide normal e inducir apoptosis en las células eritroides en MDS.

40 Datos recientes demostraban que la maduración de las células eritroides está gravemente alterada en MDS de grado bajo. Los precursores de células eritroides se cuantificaron por el marcaje de CD71/GPA descrito por Socolovski *et al* (2007). Se observó que la fracción de células con CD71^{alto}/GPA^{bajo} está aumentada y CD71^{int}/GPA^{alto} está disminuida en los cultivos celulares de MDS en comparación con los cultivos normales después de 7 días. Los estudios transcriptómicos de precursores eritroides de 14 días demostraron una disminución de 2 veces de la expresión de GYPA que codifica para la glucoforina A (GPA). Además, varios de otros genes eritroides estaban regulados por disminución.

45 Además, Gupta, *et al*. (Leukemia (1999), 13(1):44-53) describieron la sobreexpresión de FasL en la médula ósea de pacientes con MDS y la inhibición del crecimiento de células progenitoras hematopoyéticas por dicha sobreexpresión de FasL, que podría bloquearse por una proteína de fusión Fas-Fc.

50 Los MDS son enfermedades raras (incidencia de 3 a 5/100.000 personas/año) y predominan entre los ancianos (mediana de edad de 65 a 70 años).

Habitualmente, el MDS se trata con la administración de agentes estimulantes de la eritropoyesis (ESA) clásicos.

Sin embargo, hasta la presente invención los pacientes con MDS que son resistentes a los ESA eran difíciles de tratar.

Por tanto, era un objetivo de la presente invención proporcionar una nueva opción de tratamiento para MDS, en particular para el tratamiento de pacientes con MDS que son resistentes a los ESA.

55 La invención se refiere a un inhibidor de la ruta de señalización de CD95 para su uso en el tratamiento de un síndrome

mielodisplásico (MDS), que se selecciona de entre el subgrupo de MDS con bajo riesgo según el IPSS y el subgrupo de MDS de riesgo intermedio (int-1) según el IPSS.

5 De acuerdo con la invención, los términos CD95, CD95R y receptor de CD95 se pueden utilizar de manera intercambiable. Sinónimos adicionales son Apo-1 o Fas que se pueden utilizar de manera intercambiable en el presente documento. Además, los términos CD95L, ligando de CD95 y los correspondientes sinónimos FasL, Apo-1L, CD178 o TNF-SF6 se pueden utilizar de manera intercambiable.

10 Un "inhibidor de la ruta de señalización de CD95" en términos de la presente invención puede ser cualquier compuesto que interfiera o bloquee al menos parcialmente la ruta de señalización de CD95. De acuerdo con una realización preferida, un "inhibidor de la ruta de señalización de CD95" bloquea la ruta de señalización de CD95. Se conocen métodos para determinar y/o evaluar la actividad de la ruta de señalización de CD95 por los expertos en la técnica, por ejemplo, los descritos por Lavrik *et. al.*, (Cell Death Differ. enero de 2012; 19(1):36-41 Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC).

15 Un inhibidor de acuerdo con la divulgación puede actuar a nivel proteico y/o a nivel de ácido nucleico. Los inhibidores que actúan a nivel proteico pueden seleccionarse de entre anticuerpos, proteínas y/o moléculas pequeñas. Los inhibidores que actúan a nivel de ácido nucleico son por ejemplo, moléculas antisentido, moléculas de ARNi y/o ribozimas.

El inhibidor se une al receptor de CD95 (CD95) y/o al ligando de CD95 (CD95L). En una realización adicional, se puede inhibir la interacción CD95/CD95L.

20 En una realización preferida, el inhibidor usado en la invención es un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo. El inhibidor que es un anticuerpo se puede unir a CD95, pero, por supuesto, también a CD95L. Un ejemplo de anticuerpo que se une a CD95L es Nok-1.

25 El anticuerpo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo multiespecífico, o un fragmento de anticuerpo de los mismos (por ejemplo, un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fv, un diacuerpo, o una molécula de anticuerpo de cadena sencilla). El anticuerpo puede ser del tipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

El anticuerpo se puede utilizar con o sin modificación, y se puede marcar, covalente o no covalentemente, con, por ejemplo, un grupo indicador o un grupo efector.

30 Un "fragmento de anticuerpo" usado en la invención presenta esencialmente el mismo sitio de unión al epítipo que el anticuerpo correspondiente y/o tiene sustancialmente la misma actividad inhibidora de CD95 y/o CD95L que el anticuerpo correspondiente.

Se conocen métodos para producir anticuerpos que van a usarse en la invención por los expertos en la técnica.

35 Un tipo de inhibidor usado en la presente invención puede ser un inhibidor del ligando de CD95. Por ejemplo, los inhibidores de ligando de CD95 se pueden seleccionar de entre (a) un anticuerpo inhibidor anti-ligando de CD95 o un fragmento del mismo como se ha descrito anteriormente; (b) una molécula soluble de receptor de CD95 o una parte de unión al ligando de CD95 de la misma; y (c) un inhibidor del ligando de CD95 que se selecciona de entre FLINT, DcR3 o fragmentos de los mismos.

40 Las moléculas solubles de receptor de CD95, por ejemplo una molécula soluble de receptor de CD95 sin dominio transmembrana se describen en el documento EP-A-0 595 659 y el documento EP-A-0 965 637 o péptidos receptores de CD95 como se describen en el documento WO 99/65935.

El inhibidor del ligando Fas como FLINT o DcR3 o un fragmento, por ejemplo un fragmento soluble de los mismos, por ejemplo el dominio extracelular fusionado opcionalmente a un polipéptido heterólogo, particularmente una molécula de inmunoglobulina Fc se describe en el documento WO 99/14330 o el documento WO 99/50413. FLINT y DcR3 son proteínas que son capaces de unirse al ligando de CD95.

45 En una realización adicional, el inhibidor es una proteína de fusión, en particular una proteína de fusión que se une a CD95L.

50 En una realización, un inhibidor de CD95 comprende un dominio extracelular de la molécula de CD95R, tal como los aminoácidos 1 a 172 (MLG ... SRS) de la secuencia de CD95 madura de acuerdo con la pat. de EE. UU. n.º 5.891.434. Este dominio extracelular de la molécula de CD95R se puede fusionar con un dominio de polipéptido heterólogo, particularmente una molécula de inmunoglobulina Fc que incluya la región bisagra, por ejemplo de una molécula de IgG1 humana. Una proteína de fusión que comprende un dominio extracelular de CD95 y un dominio Fc humano se describe en el documento WO 95/27735.

Por tanto, de acuerdo con una realización preferida, el agente que se une a CD95L es una proteína de fusión que comprende un dominio de CD95 extracelular y un dominio Fc, en particular un dominio Fc humano.

De acuerdo con una realización especialmente preferida, el agente que se une a CD95L es APG101 o fragmentos funcionales, isoformas y/o derivados del mismo.

El APG101 y los derivados del mismo se divulgan en los documentos WO95/27735 y WO2004/085478.

5 En un aspecto de la divulgación, el inhibidor es una molécula efectora de ácido nucleico. La molécula efectora de ácido nucleico puede ser ADN, ARN, APN o un híbrido de ADN-ARN. Puede ser de cadena sencilla o doble. Se pueden utilizar vectores de expresión derivados de retrovirus, adenovirus, herpesvirus o vacunales o de varios plásmidos bacterianos para suministrar las secuencias de nucleótidos al órgano, tejido o población celular diana. Dichos constructos se pueden utilizar para introducir secuencias sentido o antisentido no traducibles en una célula. Incluso en ausencia de integración en el ADN, dichos vectores pueden continuar transcribiendo moléculas de ARN hasta que son incapacitados por las nucleasas endógenas. La expresión transitoria puede durar un mes o más con un vector no replicante e incluso más si ciertos elementos de replicación apropiados forman parte del sistema del vector.

10 La molécula efectora de ácido nucleico se puede seleccionar en particular a partir de moléculas antisentido, moléculas de ARNi y ribozimas que sean preferentemente capaces de inhibir la expresión del gen CD95R y/o CD95L. Como se ha descrito anteriormente, la presente invención se refiere al tratamiento de un síndrome mielodisplásico (MDS) que se selecciona de entre el subgrupo de MDS de bajo riesgo según el Sistema internacional de puntuación de pronóstico (IPSS) y el subgrupo de MDS de riesgo intermedio-1 (int-1) según el IPSS.

15 El IPSS es bien conocido por el experto en la técnica. Los principales factores del pronóstico de la progresión de MDS a AML y la supervivencia incluyen el número y la importancia de las citopenias, el porcentaje de blastos de la médula y las anomalías citogenéticas de la médula ósea. Cada indicador se evalúa de acuerdo con su gravedad y las evaluaciones se combinan en una "puntuación", el IPSS.

20 El IPSS distingue 4 subgrupos con riesgos significativamente diferentes en cuanto a la progresión a AML y la supervivencia: bajo, intermedio-1 (int-1), intermedio-2 (int-2) y de alto riesgo. Los subgrupos de bajo riesgo e int-1 a menudo se agrupan juntos como «favorables» o MDS de bajo riesgo, y los subgrupos de riesgo intermedio-2 (int-2) y alto son «desfavorables» o MDS de alto riesgo (Greenberg *et al*, 1997).

25 El MDS de bajo riesgo (con IPSS bajo o int-1) se caracteriza por un aumento de apoptosis de células progenitoras de la médula que da lugar a una gran extensión de citopenias. En la mayoría de los pacientes, las células eritroides muestran una alteración de la diferenciación y un aumento de la apoptosis.

Por lo tanto, el subgrupo de MDS que se va a tratar de acuerdo con la presente invención, es decir, con un IPSS de bajo riesgo o int-1 se puede caracterizar por un aumento de apoptosis durante la eritropoyesis.

30 De acuerdo con una realización adicional, el subgrupo de MDS que se va a tratar se puede caracterizar adicionalmente por un grave defecto de la eritropoyesis sin exceso de blastos.

35 Otro rasgo característico del subgrupo de MDS que se va a tratar puede ser la resistencia a los agentes estimulantes de la eritropoyesis (ESA) clásicos y/o factores estimulantes de colonias. Un agente estimulante de la eritropoyesis de acuerdo con la invención puede ser cualquier compuesto que estimule la producción de glóbulos rojos. Ejemplos de ESA y/o factores estimulantes de colonias comprenden pero no se limitan a eritropoyetina (Epo), epoetina alfa (Procrit/Epogen), epoetina beta (NeoRecormon), darbepoetina alfa (Aranesp), metoxi-poli-etilenglicol-epoetina beta (Mircera) y/o algunas citocinas tales como IL-3 o IL-9.

El subgrupo de MDS que se va a tratar puede caracterizarse por un bajo valor del unidades formadoras de brotes eritroides (BFU-E) y/o un bajo valor de unidades formadoras de colonias eritroides (CFU-E).

40 Por supuesto, las características expuestas anteriormente se pueden combinar en cualquier combinación posible para describir un subgrupo de MDS que se va a tratar.

45 Teniendo en mente un subgrupo de MDS como se ha descrito anteriormente, una realización adicional de la invención se refiere al uso de inhibidores que aumentan el número de BFU-E y no afectan a las unidades formadoras de colonias de granulocitos y monocitos (CFU-GM) y/o sin aumentar el riesgo de expansión de células leucémicas. Preferentemente, el inhibidor también puede ser un compuesto que mejore el crecimiento de las células progenitoras eritroides.

Un inhibidor de la ruta de señalización de CD95 que se utiliza de acuerdo con el curso de la presente invención se puede proporcionar como una composición farmacéutica. Esta composición puede comprender vehículos, diluyentes y/o adyuvantes, etc. farmacéuticamente aceptables.

50 Detalles adicionales de las técnicas de formulación y administración se pueden encontrar en la última edición de Remington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing Co., Easton, Pa).

Las composiciones farmacéuticas que se utilizan en la presente invención se pueden administrar por cualquier número de rutas que incluyen, pero no se limitan a, oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, entérica, tópica, sublingual o rectal.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en la invención incluyen composiciones en las que los principios activos están contenidos en una cantidad eficaz para conseguir el fin que se pretende. La determinación de una dosis eficaz está en la capacidad de los expertos en la técnica. Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad de principio activo, por ejemplo, una proteína de la invención o un anticuerpo, que es suficiente para tratar una afección específica. La dosificación exacta la determinará un facultativo, a la luz de los factores relativos al sujeto que necesita el tratamiento.

La dosificación y administración se ajustan para proporcionar niveles suficientes del resto activo o para mantener el efecto deseado. Un experto en la técnica es consciente de métodos adicionales para proporcionar suficientes niveles del resto activo y/o mantener el efecto deseado. Los factores que se pueden tener en cuenta, incluyen la gravedad de la enfermedad, la salud general del sujeto, edad, peso y sexo del sujeto, dieta, tiempo y frecuencia de administración, combinaciones farmacológicas, reacciones de sensibilidad, y tolerancia/respuesta a la terapia. En una realización preferida, la cantidad total del inhibidor de la ruta de señalización de CD95 de acuerdo con la presente invención que se va a administrar a un paciente que padece MDS es desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 400 mg/semana, más preferentemente de aproximadamente 100 a aproximadamente 200 mg/semana. La dosis semanal preferida se puede administrar como una dosis única o como varias dosis. Especialmente preferida es una dosis única de desde 100 hasta 200 mg/semana que se administra por vía intravenosa como dosis única.

El tratamiento puede durar varias semanas. En cada caso individual, la duración del tratamiento se determina por el médico supervisor y está basado, por ejemplo, en el éxito del tratamiento, la existencia de efectos secundarios, etc.

De acuerdo con la presente invención, esta composición farmacéutica comprende un agente estimulante de la eritropoyesis y/o un agente inhibidor de la apoptosis.

Los ejemplos de los agentes estimulantes de la eritropoyesis se han especificado anteriormente.

Los ejemplos de agentes inhibidores de la apoptosis comprenden inhibidores de caspasas tales como XIAP, c-IAP-1, c-IAP-2, survivina, compuestos inhibidores del TNF- α tales como Revlimid, pomalidomida, inhibidores de la familia de proteínas Bcl-2, etc.

En un aspecto adicional de la presente divulgación, se usa una composición farmacéutica que comprende un inhibidor en los términos de la presente invención, que comprende además un agente estimulante de la eritropoyesis, en particular un agente estimulante de la eritropoyesis como se ha definido anteriormente.

Leyenda de las figuras

Figura 1: Visión en conjunto de la eritropoyesis. HSC: célula madre hematopoyética. BFU-E: unidad formadora de brotes eritroides, CFU-E: unidad formadora de colonias eritroides, PER: pro-eritroblasto, ERB: eritroblasto basófilo, ERP: eritroblasto policromatófilo, ERA: eritroblasto acidófilo, reticulo: reticulocito, RBC: glóbulo rojo, SCF: factor de célula madre, EPO: eritropoyetina.

Figura 2: Regulación negativa de eritropoyesis normal y de MDS. La eritropoyesis normal se controla por una regulación negativa de la proliferación por medio de apoptosis dependiente de Fas de las células progenitoras inmaduras mediada por las células maduras que expresan FasL (flechas azules). En el MDS, Fas y FasL están sobreexpresados dando lugar a una apoptosis excesiva e inapropiada (flechas rojas).

Figura 3: Papel/concentración de Fas y FasL durante la eritropoyesis.

Figura 4: Expresión de FasL en MDS, sAML y controles. A. Distribución de FasL RFI. B. Análisis ROC comparando el MDS con los controles.

Figura 5: Impacto de la expresión de Fas en células CD45^{bajo}/CD34⁺ en el diagnóstico sobre la supervivencia global.

Figura 6: Efecto de APG101 sobre el crecimiento de BFU-E y CFU-GM el día 14 en el cultivo en metilcelulosa.

Figura 7: Efecto de APG101 sobre el crecimiento de CFU-E y CFU-L el día 7 en el cultivo en metilcelulosa.

Figura 8: Efecto de APG101 sobre la procedencia de BFU-E y CFU-GM a partir de cultivos líquidos el día 5.

Figura 9: Efecto del APG101 añadido a la fase de diferenciación en un cultivo líquido de células progenitoras eritroides.

Figura 10: Efecto del APG101 sobre la diferenciación de células eritroides. Izquierda: Citospinas coloreadas MGG. Derecha: Análisis de citometría de flujo de CD71/GPA marcado doblemente.

Figura 11: Efecto del APG101 sobre el crecimiento de BFU-E. Una comparación entre MDS positivo para Fas y negativo para Fas.

Figura 12: Efecto del APG101 según la expresión de FasL en las células CD45^{bajo}.

Figura 13: Efecto del APG101 sobre el crecimiento de BFU-E de acuerdo con el crecimiento de CFU-L y BFU-E en el nivel inicial.

Materiales y métodos

5 Materiales de laboratorio

Descripción	Lote	Suministrador
Trímero purificado estable del ligando de CD95 (CD95L-T4)		Apogenix
Citocinas	SCF 02630	Promega
Metilcelulosa	04100	Stem Cell technologies
Medio de cultivo IDMD glutamax	31980-022	Invitrogen
Anticuerpos y proteínas marcados con un fluorocromo	CD95 clon UB2 IM1506 CD235a (GPA) clon 11E4B IM2212 CD71 clon YDJ1.2.2 IM0483	Beckman Coulter

Muestras de médula ósea

10 Se recolectaron médulas óseas normales y de MDS de pacientes en el Hôpital Cochin, París, de los departamentos relacionados que están asociados a estudios biológicos multicéntricos coordinados por el Prof. M. Fontenay por aspiración esternal. Los pacientes habían dado su consentimiento informado para los estudios genéticos y de biología celular antes de la aspiración de médula ósea de acuerdo con las recomendaciones del comité local de ética.

Equipamiento

Nombre	Número de identificación interna
Columna MIDI Macs	Milteny Biotech
Citómetro de flujo FC 500	Beckman Coulter
Incubadoras (5% de CO ₂ , 37°C)	Jouan
Microscopio	Zeiss

15

Métodos

SOP relevantes

Se hizo referencia al SOP actual del laboratorio y se validó en la Guide de Bonne Exécution des Analyses de Biologie médicale de M. Fontenay y C. Lacombe in 2002.

20

SOP	N.º	Fecha de lanzamiento
Aislamiento de células CD34+	GBEA2v1	01/02/2002
Cultivo de células progenitoras eritroides	GBEA2v1	01/02/2002
Ensayos en metilcelulosa	GBEA1v1	01/02/2002

Herramientas y plataformas

- APG101 Fas-Fc quimérico (Apogenix): un inhibidor de la apoptosis dependiente de Fas; proporcionado por Apogenix GmbH.
- 5 ● CD95L-T4: Ligando trimérico para Fas proporcionado por Apogenix.
- Los cultivos celulares eritroides se llevaron a cabo como se ha descrito: se aislaron células CD34⁺ de médula ósea en una columna MIDI Macs y se cultivaron con SCF, Epo, IGF-1 y dexametasona para inducir la restricción de las células CD34⁺ al linaje eritroide y la proliferación de las células eritroides diana. Tras 10 días, se obtuvo la maduración terminal de células eritroides por cambio de las células a un medio que contenía Epo e insulina.
- 10 ● Se utilizó citometría de flujo para cuantificar la maduración de células eritroides durante el cultivo líquido *in vitro*.

Protocolos

Citometría de flujo

- 15 Se identificaron las subpoblaciones de células por doble marcado utilizando anticuerpos monoclonales contra CD71 (receptor de transferrina) y glucoforina A (GPA, CD235a). Los diferentes estadios de maduración eran células CD71-/GPA-, CD71+/GPA-, CD71+/GPA+ y finalmente CD71-/GPA+. Se cuantificó la expresión de Fas de membrana por marcado y expresión de CD95 como la razón de la mediana de intensidad de fluorescencia respecto al control isotópico (RFI). Se utilizó el análisis de la característica operativa del receptor (ROC) que es una representación gráfica de la relación entre la proporción de verdaderos positivos y la proporción de falsos positivos para un intervalo de valores de corte para comparar 132 MDS con 25 controles demostraba que el umbral de positividad era de un RFI de 1,8. Se midió la apoptosis por marcado con anexinaV/7-AAD. Las muestras se analizaron en un aparato FC500 (Beckman Coulter).
- 20

Aislamiento y cultivo celular

- 25 Se recolectaron muestras de médula ósea de los pacientes y los sujetos sanos de control por aspiración esternal y se purificaron las células CD34⁺ (>85% de células CD34⁺) en columnas de inmunoafinidad MIDI-MACS (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Alemania) (Claessens *et al*, 2002). Las células CD34⁺ purificadas se cultivaron en un medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contenía BIT al 20% (seroalbúmina bovina, insulina, holotransferrina), y las citocinas apropiadas: factor de células madre (SCF) 50 ng/ml, eritropoyetina (Epo) 1 UI/ml, factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1) 40 ng/ml, y dexametasona 10⁻⁶ M hasta el día 10 de cultivo, y 1 UI/ml de Epo y 10⁻⁶ M de insulina a partir de entonces. Una visión en conjunto de las etapas de cultivo se muestra en la figura 3. Las células se dividían activamente hasta el día 10 y mostraban poca maduración eritroide. Tras el cambio de citocinas, la mayoría de las células se diferenciaron en eritroblastos hacia el día 14.
- 30

Inducción de apoptosis por CD95L-T4 en células eritroides normales

- 35 Se trataron células eritroides normales con concentraciones crecientes de CD95L-T4. A una concentración determinada, se midió el impacto de la adición de CD95L-T4 en una fase temprana de la diferenciación de células eritroides sobre el crecimiento de células eritroides (BFU-E y amplificación total de células precursoras eritroides). Se sometió a prueba el impacto de la adición de CD95L-T4 antes de la aparición de la activación de caspasa-3 que precede a la maduración eritroide. La caspasa-3 y las dianas se siguieron por análisis de citometría de flujo y de inmunotransferencia tipo Western.
- 40 Considerando la estequiometría 1/1 del complejo CD95L-T4/APG101 con una afinidad de unión de 11 nM en seres humanos, la concentración de CD95L-T4 y APG101 que se iba a someter a prueba en el cultivo estaban en el mismo intervalo (de 0,01 a 10 µg/ml).

Inhibición de la apoptosis inducida por CD95L-T4 por APG101 en células eritroides normales

- 45 Se pretrataron células eritroides normales con APG101 a una concentración creciente antes del tratamiento con la concentración de CD95L-T4 determinada previamente en la fase temprana de la amplificación de las células eritroides o en la fase tardía de diferenciación (o en ambas). Es importante señalar que se evitaba la adición de CD95L-T4 en las muestras con altos niveles de apoptosis en el nivel inicial. Se evaluaron los efectos del APG101 sobre la amplificación total de células eritroides, el crecimiento de BFU-E, la apoptosis, la actividad de caspasa-3, la escisión direccionada por caspasa-3, y la diferenciación (GPA, citología).

50 Inhibición de la apoptosis de células eritroides de MDS por APG101

Se sometieron a prueba concentraciones crecientes de APG101 (de 0,001 a 100 µg/ml)

- sobre el número de BFU-E en ensayos clonogénicos.
- sobre la tasa de amplificación.
- sobre la apoptosis (actividad de caspasa-3, exposición a fosfatidilserina, dianas de la caspasa-3).
- sobre la diferenciación de células eritroides (GPA/CD71, examen citológico, expresión genética eritroide en microalineamientos).

Se había demostrado anteriormente que el Fas se sobreexpresaba en la fracción celular CD34+ de la médula ósea. Por tanto, se hizo una comparación entre las células progenitoras granulocíticas y eritroides en las muestras de MDS en condiciones de cultivo específicas para cada linaje. Se sometió a prueba si el tratamiento con APG101 restauraba la cinética normal de la actividad de caspasa-3 y evitaba la escisión direccionada de la caspasa-3.

10 Ensayo en metilcelulosa

Se sembraron células mononucleares aisladas de los aspirados de médula ósea después de un gradiente de Ficoll, en metilcelulosa al 0,8% que contenía suero bovino fetal, BSA y citocinas (IL-3 0,1 UI/ml, IL-6 10 ng/ml, GM-CSF 5 ng/ml, Epo 1 UI/ml y SCF 20 ng/ml a una concentración de 10⁶ células/ml). Se contaron las CFU-E y CFU-L el día 7 del cultivo y se contaron las BFU-E y CFU-GFM el día 14. Se añadieron concentraciones crecientes de APG101.

15 Estadística

Los datos biológicos se analizaron como valores de mediana ± el error estándar de la media. Se evaluaron la sensibilidad y especificidad de la citometría de flujo para los ensayos de Fas y FasL con la característica operativa del receptor (ROC) y se dedujo el valor del umbral. Se compararon las variables continuas con la prueba de la t de Student (software Excel 2003, Microsoft). Se utilizó el estimador de Kaplan-Meier para evaluar el impacto de Fas y FasL sobre la supervivencia global a lo largo del tiempo, en los dos subgrupos de población bajo estudio, y se comparó con la prueba de rangos logarítmicos. Todos los análisis estadísticos fueron bilaterales y los valores de P menores de 0,05 se consideraron significativos. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software GraphPad.

Resultados

Expresión de FasL y diagnóstico de MDS

25 Se midió la expresión de FasL tanto en poblaciones celulares de médula ósea CD45bajo/CD34+ como CD71+ de 84 MDS, 21 sAML y 17 controles. El FasL estaba significativamente más elevado en MDS que en sAML o los controles (figura 4A) y de acuerdo con la ROC, el umbral de positividad era de 6. Cuando se compararon los MDS con los controles, el valor predictivo de la expresión de FasL para discriminar entre MDS y los controles era bueno (área bajo la curva: 0,73; P=0,002; figura 4B).

30 Se recogió la información clínica de 166 pacientes con MDS o sAML con un valor conocido de la expresión de Fas en el momento del diagnóstico y en 42 pacientes con MDS/sAML con un valor conocido de FasL en el momento del diagnóstico para analizar el impacto de la expresión de Fas o FasL sobre el pronóstico. En el grupo de los 166 pacientes con MDS, el 41% eran positivos para Fas y no se demostró ninguna diferencia en términos de edad, sexo, parámetros del hemograma, % de blastos en médula ósea, displasia multilineaje, cariotipo, IPSS y tratamientos. La expresión de Fas no tenía impacto en la supervivencia global (figura 5). Además, la expresión de Fas no era predictiva de la respuesta a la Epo.

40 En el grupo de 42 pacientes con MDS/sAML, 18 pacientes eran positivos para FasL (RFI≥5). El nivel de Hb y la mediana de supervivencia global eran equivalentes en los pacientes positivos para FasL y negativos para FasL (P=0,57 y P=0,97, respectivamente). Además, la expresión de FasL en una pequeña cohorte de pacientes (n=22) no era predictiva de la respuesta al tratamiento.

En resumen, estos datos muestran que Fas y FasL estaban sobreexpresados en MDS, y la sobreexpresión de FasL es predictiva de MDS. Ni la expresión de Fas ni la expresión de FasL son parámetros pronósticos para la supervivencia global.

Efecto de APG101 sobre el crecimiento de células progenitoras hematopoyéticas

45 Los estudios han demostrado que bloqueando FasL con un exceso de Fas soluble (Fas: Fc) así como la disrupción de la señalización Fas por medio de expresión ectópica de una forma dominante negativa del adaptador FADD rescataba el crecimiento de BFU-E. Cuando se analizó el efecto de las concentraciones crecientes de APG101 (0, 0,01, 0,1, 1, 10 µg/ml) sobre células progenitoras eritroides y granulo-monocíticas en ensayos en metilcelulosa resultó evidente que el APG101 no estimulaba el crecimiento de CFU-GM mientras que se notaba un efecto positivo moderado sobre el crecimiento de BFU-E (figura 6).

Además, se analizó efecto de APG101 sobre el crecimiento de células progenitoras eritroides maduras (CFU-E) y la respuesta de los blastos leucémicos contando el número de CFU-L (agrupamientos no eritroides de al menos 50

células) el día 7 del cultivo en metilcelulosa (figura 7). Se encontró que el APG101 no rescataba el crecimiento de CFU-E y no aumentaba el número de CFU-L ni siquiera en muestras de pacientes RAEB2 (MDS con más de un 10% de blastos en el momento del diagnóstico) sugiriendo que el APG101 no estimula el crecimiento de blastos leucémicos.

5 Para adquirir más conocimientos del efecto de APG101 sobre la eritropoyesis en MDS, se aislaron y sembraron células CD34+ de médula ósea de pacientes con MDS en “condiciones eritroides” para la restricción. Las células se recolectaron el día 5 en el cultivo líquido y luego se sembraron en metilcelulosa para evaluar el número de BFU-E y CFU-GM. Como se muestra en la figura 7, el número inicial de BFU-E era reducido en MDS en comparación con los controles. El APG101 inducía un aumento de 3 veces del número de BFU-E sin alcanzar un nivel normal. CFU-GM estaban menos gravemente alterados que las BFU-E y no los afectaba el APG101. Estos resultados sugieren un efecto específico de APG101 sobre el linaje eritroide.

Para someter a prueba el efecto del APG101 sobre la diferenciación de células durante la eritropoyesis se añadieron diferentes concentraciones de APG101 al cultivo celular cuando el cultivo se cambió a Epo e insulina, que coincidía con la aparición de la expresión de FasL. El día 14 del cultivo el número total de células había aumentado una media del 60% y la apoptosis parecía que se había reducido hasta un 33% (figura 9).

15 El APG101 no tenía efecto sobre la diferenciación eritroide, de la manera más importante, no bloqueaba la maduración celular (figura 10).

Para delinear el grupo de pacientes que podría beneficiarse del fármaco, los datos de los ensayos en metilcelulosa se analizaron de nuevo de acuerdo con las características clínicas y biológicas iniciales. Los ensayos en metilcelulosa se validaron previamente como una herramienta útil para predecir la respuesta a Epo y se correlacionaba bien con la calidad de la eritropoyesis (Frisan *et al*, 2010).

20 Primero se analizaron los ensayos clonogénicos de acuerdo con la expresión inicial de Fas. Como se muestra en la figura 11, la mejora del crecimiento de BFU-E en presencia de APG101 10 µg/ml no era diferente significativamente en pacientes positivos para Fas y negativos para Fas.

25 Después, se analizó el efecto de APG101 de acuerdo con la expresión de FasL sobre la población positiva para CD71. En esta serie, el umbral de positividad era de 2,8. Los MDS positivos para FasL tenían una mediana de RFI de FasL de 3,7 y los pacientes negativos para FasL tenían una mediana de RFI de FasL de 2,2. El efecto de APG101 no se diferenciaba entre pacientes positivos para FasL que mostraban una alta expresión de FasL y pacientes negativos para FasL que mostraban una baja expresión de FasL.

30 Tercero, se buscó una posible correlación entre el efecto de APG101 sobre el crecimiento de BFU-E y el crecimiento inicial de CFU-L en el momento del diagnóstico. En pacientes con exceso de agrupamientos leucémicos, el APG101 no podía rescatar el crecimiento de BFU-E mientras que aumentaba muy eficazmente el número de BFU-E en pacientes con un bajo crecimiento inicial de CFU-L (figura 13, a la izquierda).

35 Finalmente, el APG101 mejoraba más eficazmente el crecimiento de BFU-E en las células de médula ósea de los pacientes con MDS con alteración grave de la eritropoyesis en el nivel inicial que en pacientes con eritropoyesis conservada (figura 13, derecha).

Resumen

40 Se demostró que en el cultivo *in vitro* de células madre hematopoyéticas (células CD34+) de pacientes con MDS de grado bajo e int-1 con alteración grave de la eritropoyesis, el APG101 rescata el crecimiento de células eritroides. El APG101 no promovía el crecimiento de células leucémicas y, por tanto, no aumentaba el riesgo de una expansión de células leucémicas.

La sobreexpresión de FasL era predictiva de la enfermedad. Sin embargo, ni la expresión de Fas ni la de FasL demostraban claramente que tuvieran un impacto sobre la supervivencia global.

45 Fas es uno de los principales actores de la muerte celular apoptótica de las células precursoras hematopoyéticas, lo que da como resultado anemia. Por tanto, al inhibir la interacción entre Fas y FasL utilizando un receptor soluble de Fas (por ejemplo, el APG101) se podía rescatar la eritropoyesis en pacientes con MDS.

50 El APG101 rescata el crecimiento de células eritroides en el subgrupo de pacientes con MDS con un grave defecto en la eritropoyesis y sin exceso de blastos leucémicos. El APG101 no estimuló el crecimiento de células leucémicas como se evalúa por el recuento de CFU-L, sin embargo, el APG101 era incapaz de rescatar el crecimiento de BFU-E en pacientes que presentaban un exceso de CFU-L en el momento del diagnóstico. En conjunto, el APG101 es eficaz en el rescate del crecimiento de BFU-E en células madre hematopoyéticas de pacientes con MDS con alteración grave de la eritropoyesis en el momento del diagnóstico y sin exceso de blastos. Estos pacientes se identificaron anteriormente como resistentes a los agentes estimulantes de la eritropoyesis (ESA) en parte debido a la sobreexpresión de Fas y un alto nivel de apoptosis (Frisan *et al*, 2010).

Bibliografía

- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, *et al.* Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br. J. Haematol.* junio de 1982; 51 (2):189-199.
- 5 Bouscary D, De Vos J, Guesnu M, Jondeau K, Viguier F, Melle J, Picard F, Dreyfus F, Fontenay-Roupie M. Fas/Apo-1 (CD95) expression and apoptosis in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia.* junio de 1997; 11 (6):839-45.
- Carlile GW, Smith DH, Wiedmann M. Caspase-3 has a nonapoptotic function in erythroid maturation. *Blood.* 1 de junio de 2004; 103(11):4310-6.
- Claessens YE, Bouscary D, Dupont JM, *et al.* In vitro proliferation and differentiation of erythroid progenitors from patients with myelodysplastic syndromes: evidence for Fas-dependent apoptosis. *Blood.* 2002; 99: 1594-1601.
- 10 Claessens YE, Park S, Dubart-Kupperschmitt A, Mariot V, Garrido C, Chrétien S, Dreyfus F, Lacombe C, Mayeux P, Fontenay M. Rescue of early-stage myelodysplastic syndrome-deriving erythroid precursors by the ectopic expression of a dominant-negative form of FADD. *Blood.* 15 de mayo de 2005; 105(10):4035-42.
- De Maria R, Zeuner A, Eramo A, Domenichelli C, Bonci D, Grignani F, Srinivasula SM, Alnemri ES, Testa U, Peschle C. Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. *Nature.* 30 de sep. de 1999; 401 (6752):489-93.
- 15 Frisan E, Pawlikowska P, Pierre-Eugène C, Viallon V, Gibault L, Park S, Mayeux P, Dreyfus F, Porteu F, Fontenay M. p-ERK1/2 is a predictive factor of response to erythropoiesis-stimulating agents in low/int-1 myelodysplastic syndromes. *Haematologica.* nov. de 2010; 95(11):1964-8.
- Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, Sanz M, Vallespi T, Hamblin T, Oscier D, Ohyashiki K, Toyama K, Aul C, Mufti G, Bennett J. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 15 de marzo de 1997; 89(6):2079-88.
- 20 Gupta P, Niehaus GA, LeRoy SC, Gupta K, Morrison VA, Schultz C, Knapp DJ, Kratzke RA Fas ligand expression in the bone marrow in myelodysplastic syndromes correlates with FAB subtype and anemia, and predicts survival. *Leukemia.* enero de 1999; 13(1):44-53.
- 25 Liu Y, Pop R, Sadegh C, Brugnara C, Haase VH, Socolovsky M. Suppression of Fas-FasL. Coexpression by erythropoietin mediates erythroblast expansion during the erythropoietic stress response in vivo. *Blood.* 1 de julio de 2006; 108(1):123-33.
- Ribeil JA, Zermati Y, Vandekerckhove J, Cathelin S, Kersual J, Dussiot M, Coulon S, Moura IC, Zeuner A, Kirkegaard-Sørensen T, Varet B, Solary E, Garrido C, Hermine O. Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1. *Nature.* 4 de enero de 2007; 445(7123):102-5.
- 30 Socolovsky M, Murrell M, Liu Y, Pop R, Porpiglia E, Levchenko A. Negative autoregulation by FAS mediates robust fetal erythropoiesis. *PLoS Biol.* oct. de 2007; 5(10):e252.
- Tehranchi R, Fadeel B, Forsblom AM, *et al.* Granulocyte colony-stimulating factor inhibits spontaneous cytochrome c release and mitochondria-dependent apoptosis of myelodysplastic syndrome hematopoietic progenitors. *Blood.* 2003; 101: 1080-1086.
- 35 Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellstrom-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood.* 30 de julio de 2009; 114(5):937-51.
- 40 Zermati Y, Garrido C, Amsellem S, *et al.* Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J Exp Med.* 2001; 1 93: 247-254.

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica que comprende un inhibidor de la ruta de señalización de CD95 que se une al receptor de CD95 (CD95R) y/o al ligando de CD95 (CD95L) para su uso en el tratamiento de síndrome mielodisplásico (MDS), donde el MDS se selecciona de entre el subgrupo de MDS de bajo riesgo según el IPSS y el subgrupo de MDS de riesgo intermedio-1 (int-1) según el IPSS, y comprendiendo además la composición farmacéutica un agente estimulante de la eritropoyesis seleccionado del grupo que consiste en eritropoyetina (Epo), epoetina alfa (Procrit/Epogen), epoetina beta (NeoRecormon), darbepoetina alfa (Aranesp), metoxi-polietilenglicol-epoetina beta (Mircera) y citocinas tales como IL-3 o IL-9 y/o un agente inhibidor de la apoptosis seleccionado del grupo que consiste en inhibidores de caspasas tales como xIAP, c-IAP-1, c-IAP-2, survivina, compuestos inhibidores del TNF- α tales como Revlimid, pomalidomida e inhibidores de la familia de proteínas Bcl-2.
2. Composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el inhibidor es un compuesto que mejora el crecimiento de células progenitoras eritroides.
3. Composición farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde el inhibidor es un anticuerpo, en particular un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a CD95L.
4. Composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde el inhibidor es una molécula receptora de CD95 o una parte de unión al ligando de CD95 de la misma y/o un inhibidor del ligando de CD95.
5. Composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde el inhibidor es una proteína de fusión que se une al CD95L.
6. Composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, donde la proteína de fusión comprende un dominio de CD95 extracelular o un fragmento funcional del mismo y un dominio Fc humano o un fragmento funcional del mismo.
7. Composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, donde el inhibidor es APG101.
8. Composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la población de MDS se caracteriza por un aumento de la apoptosis durante la eritropoyesis.
9. Composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la población de MDS se caracteriza por un grave defecto de la eritropoyesis sin exceso de blastos.
10. Composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde la población de MDS se caracteriza por ser resistente a los agentes estimulantes de la eritropoyesis (ESA) y/o factores estimulantes de colonias.
11. Composición farmacéutica para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 10, que comprende vehículos, diluyentes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables.

Figura 1

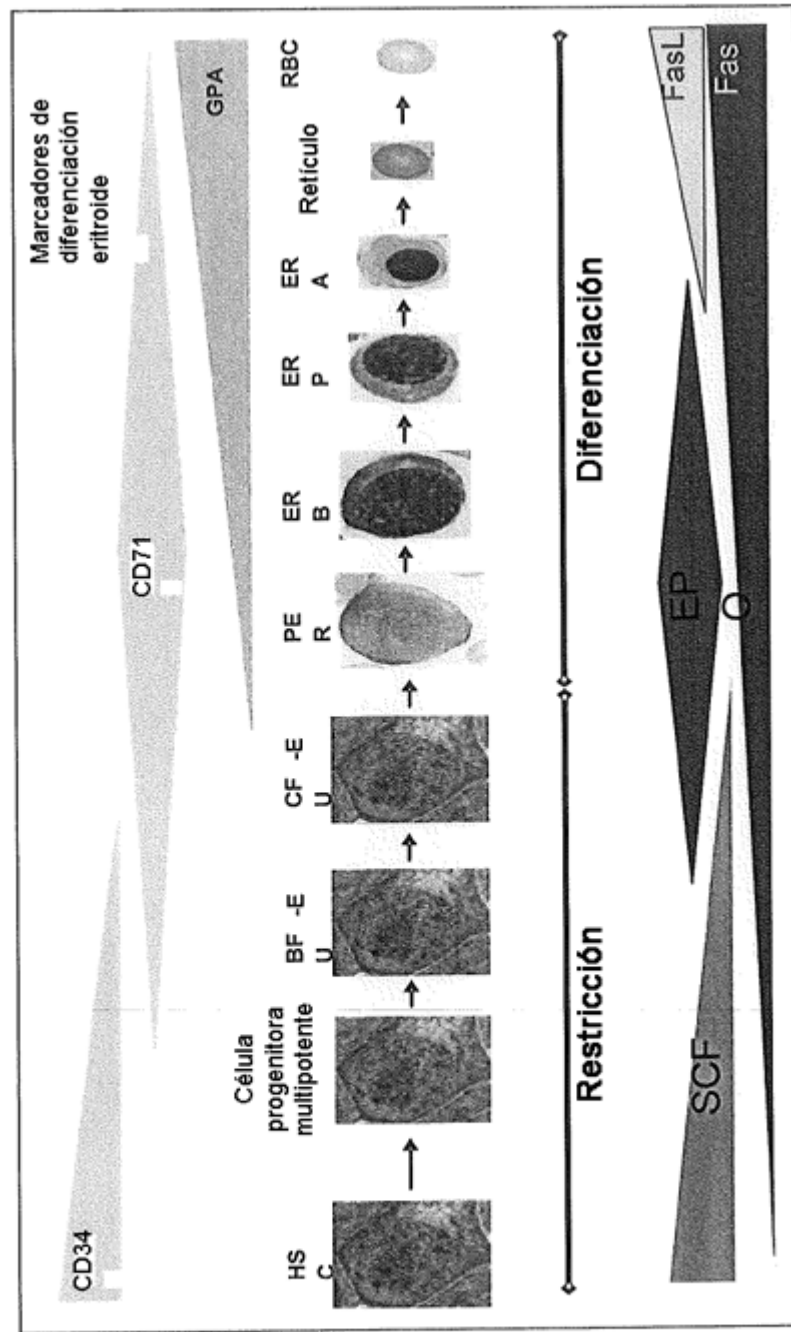


Figura 2

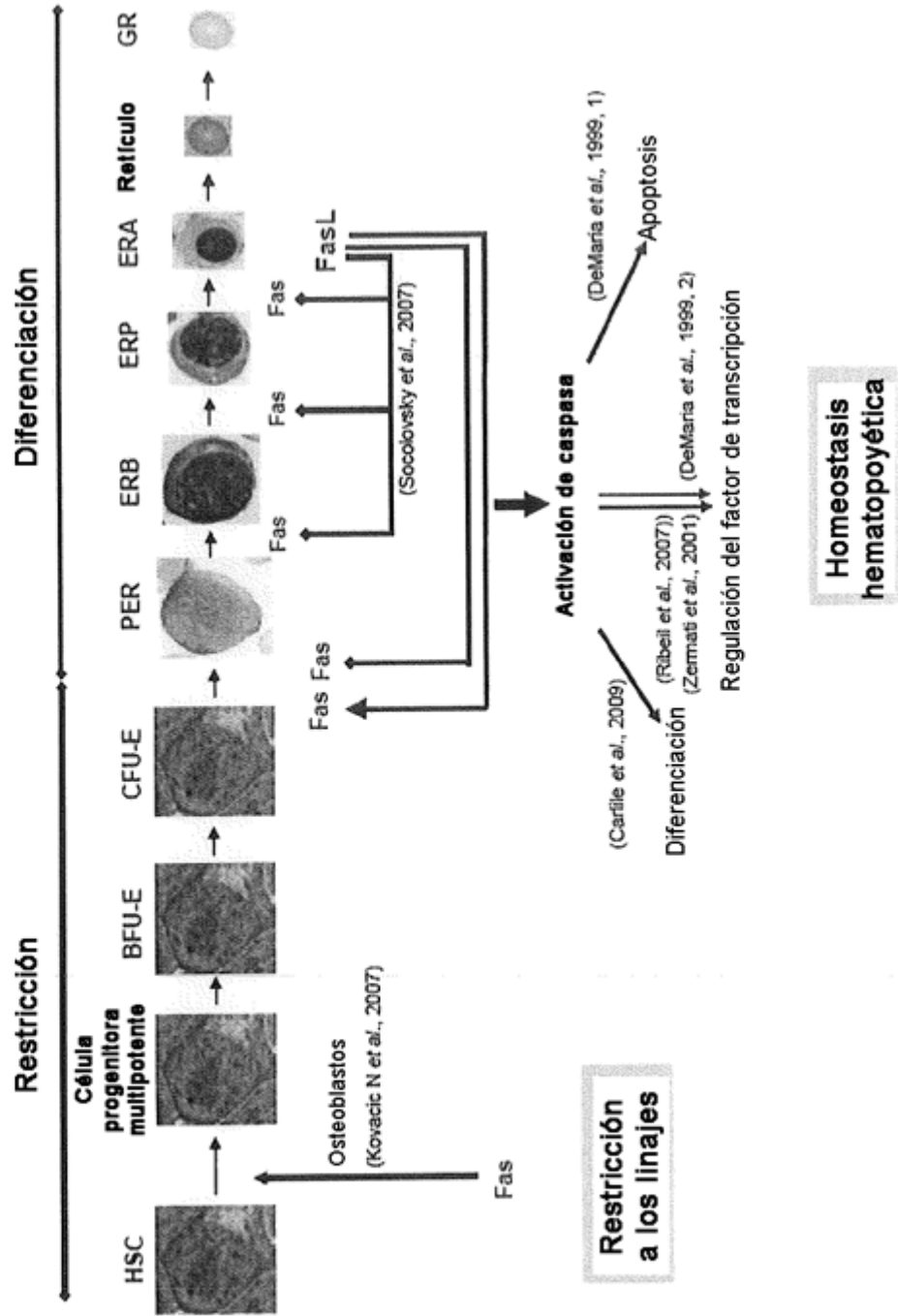
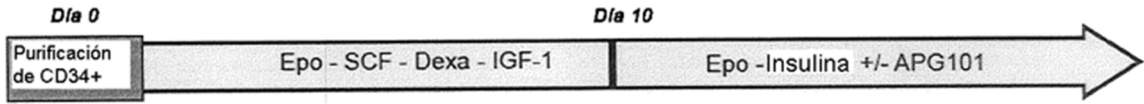


Figura 3



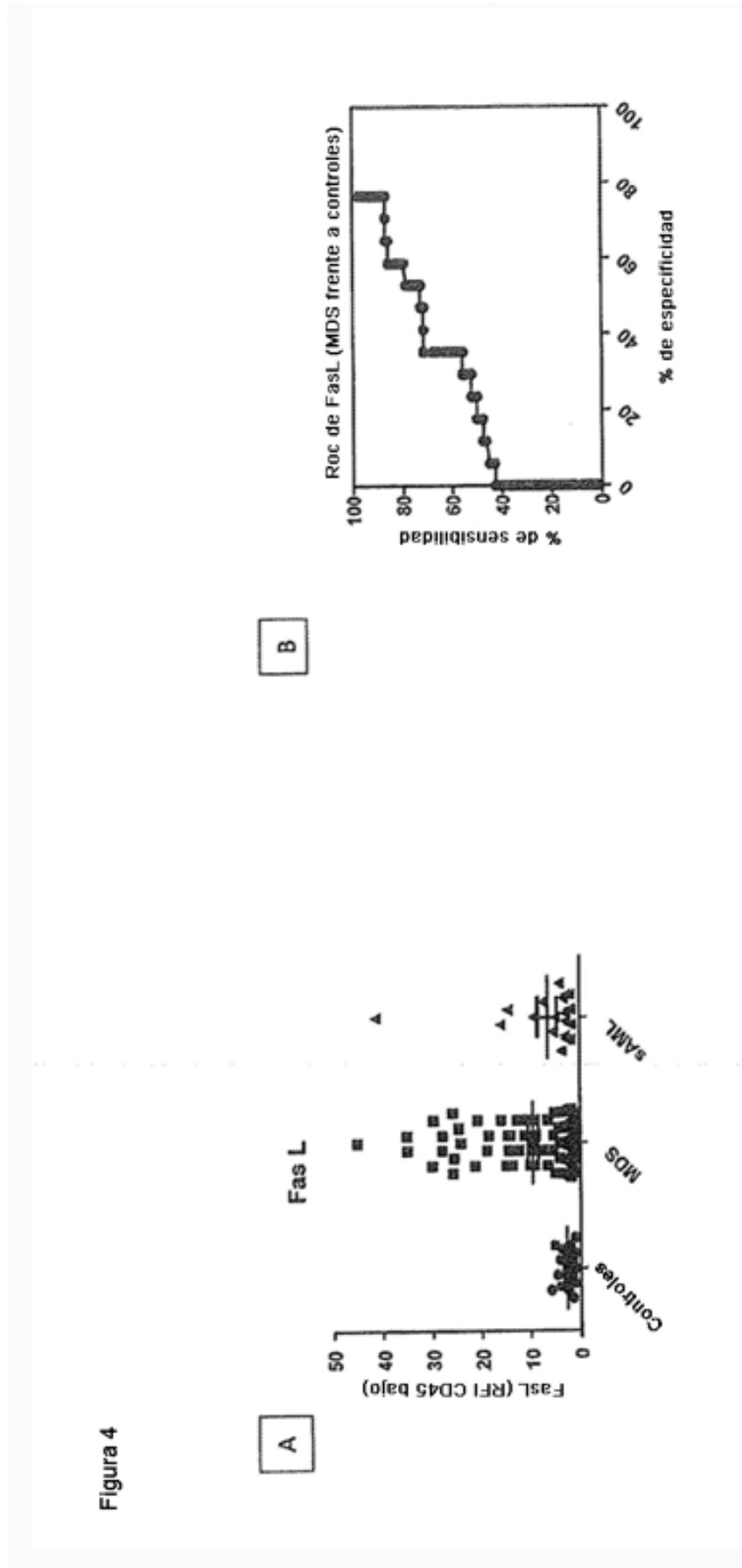


Figura 4

Figura 4

B

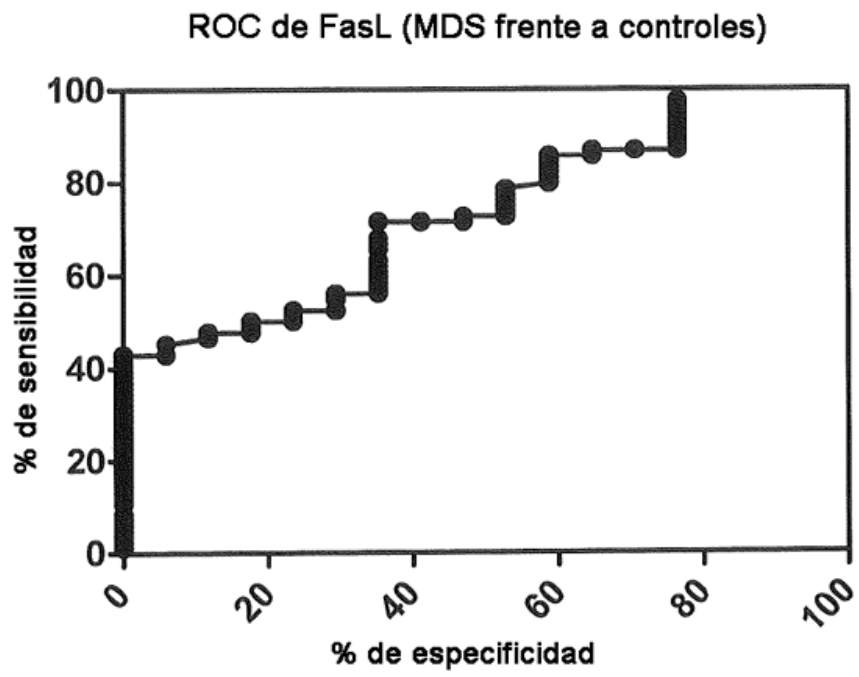


Figura 5

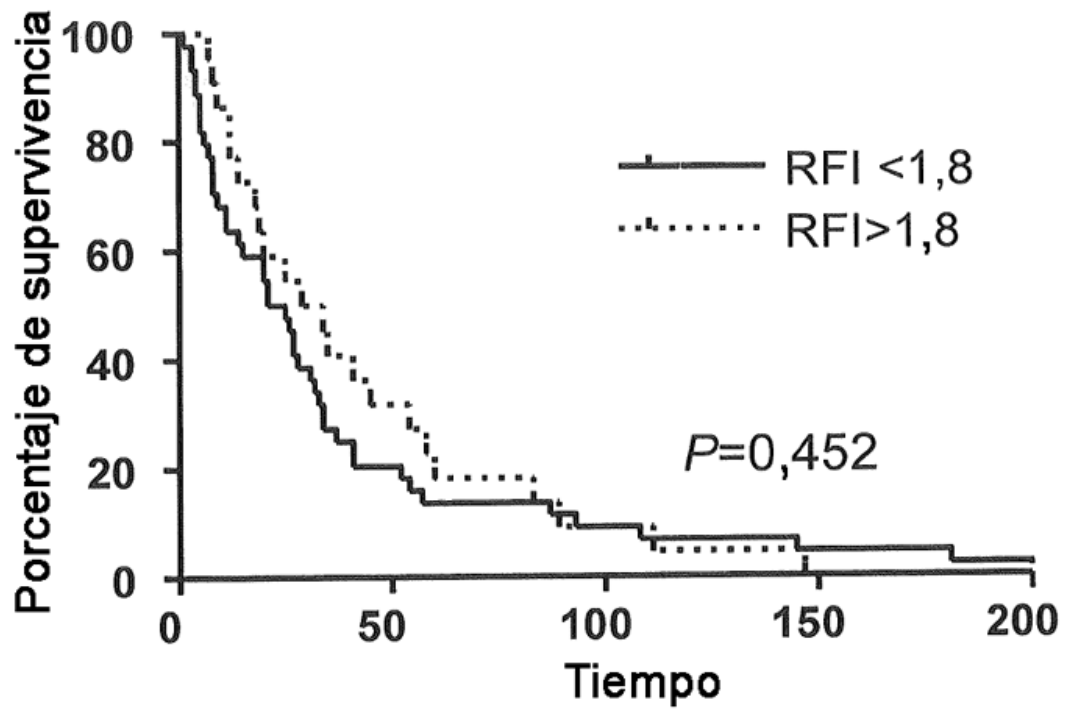


Figura 6

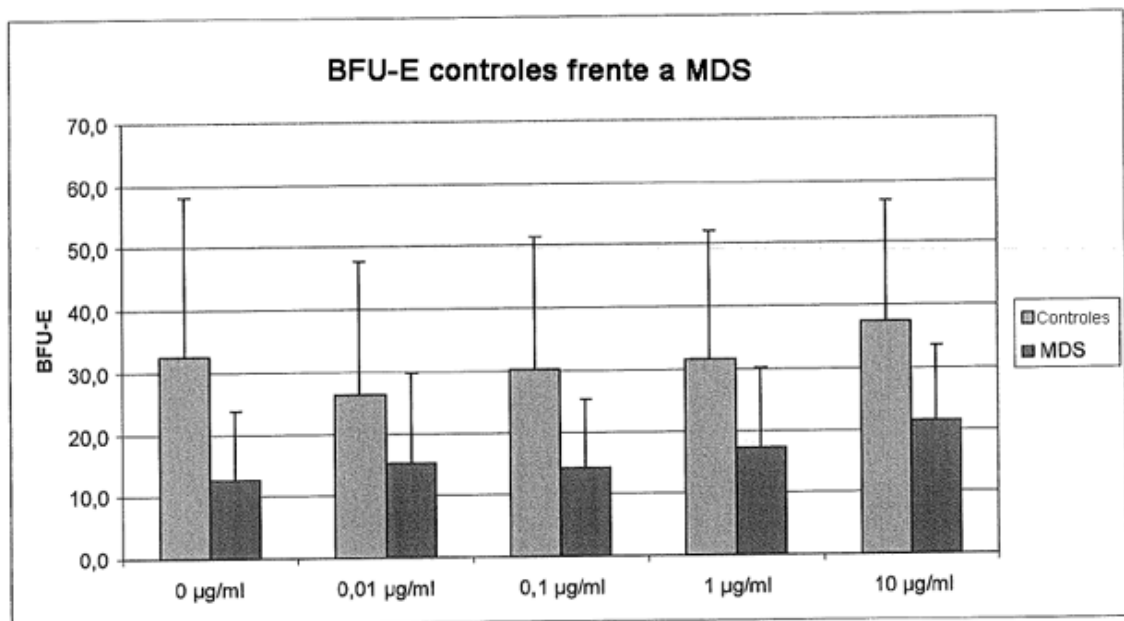
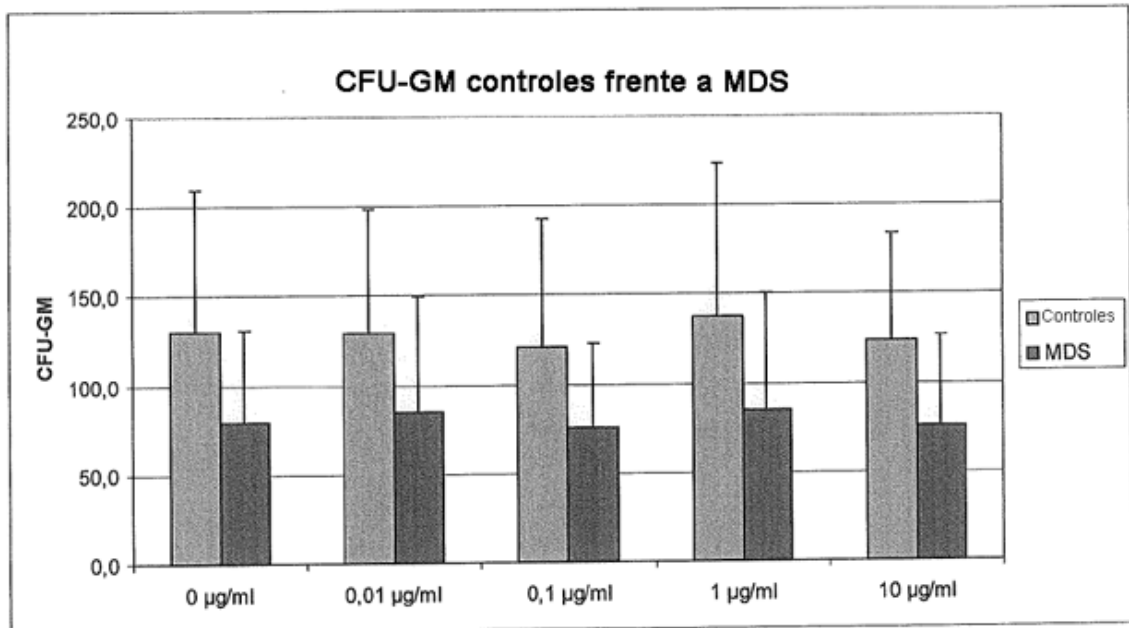


Figura 7

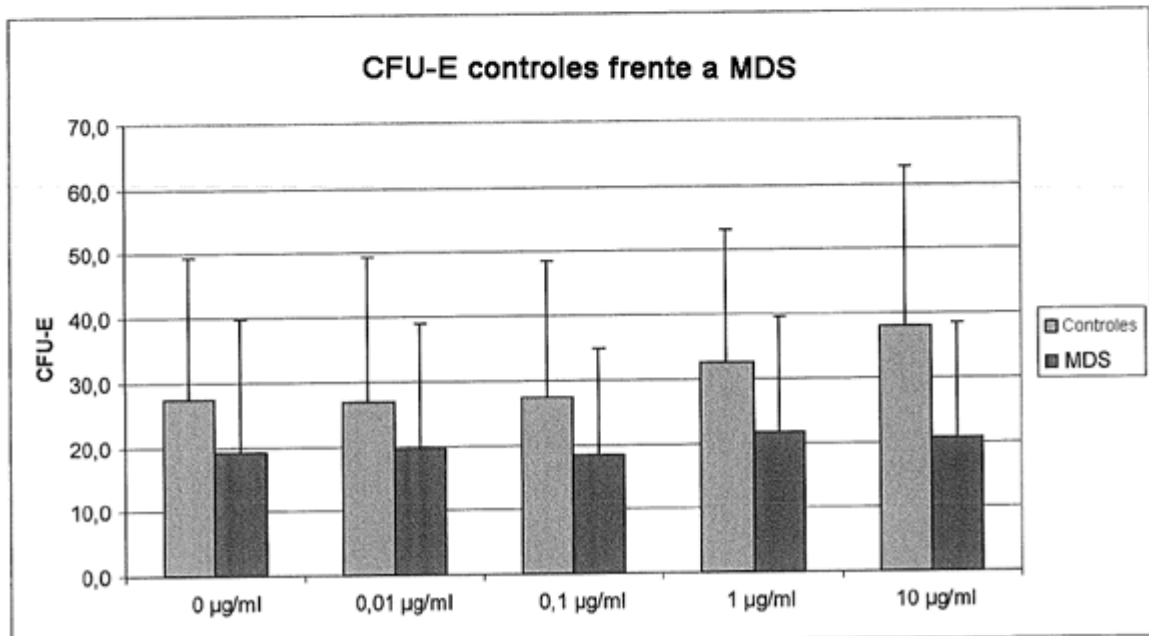
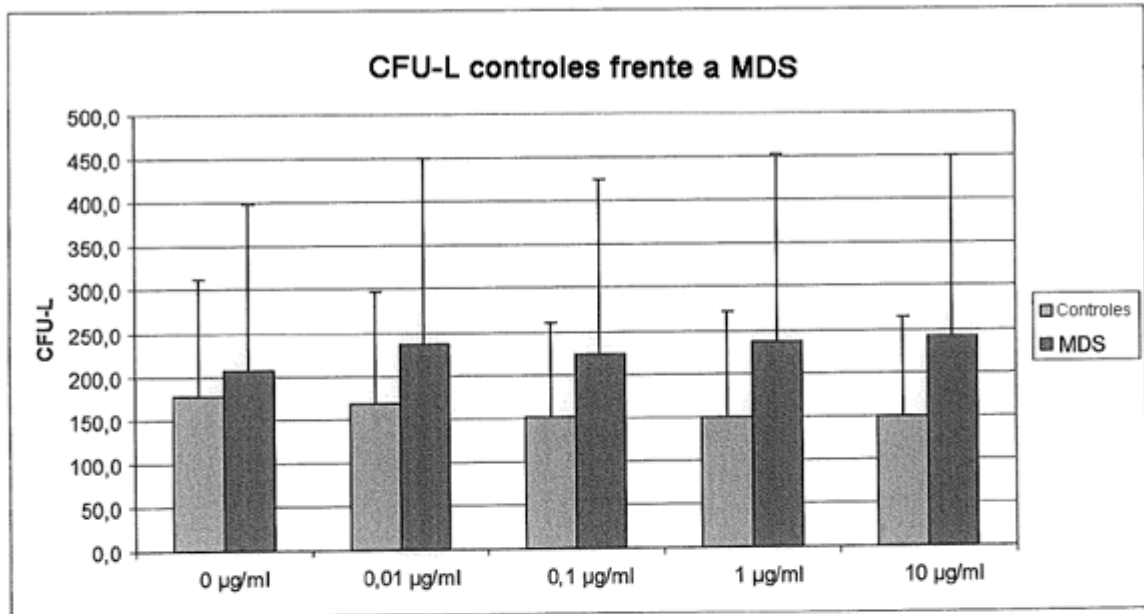


Figura 8

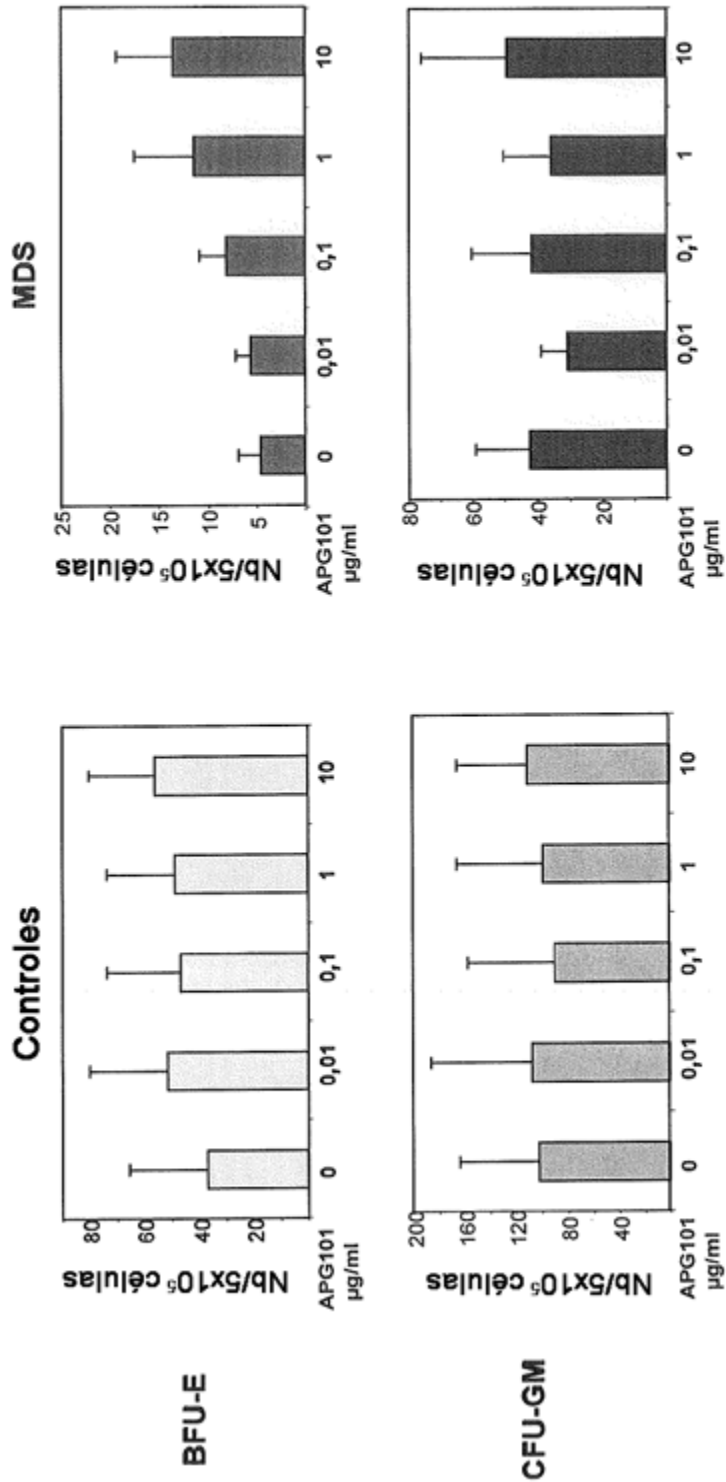


Figura 9

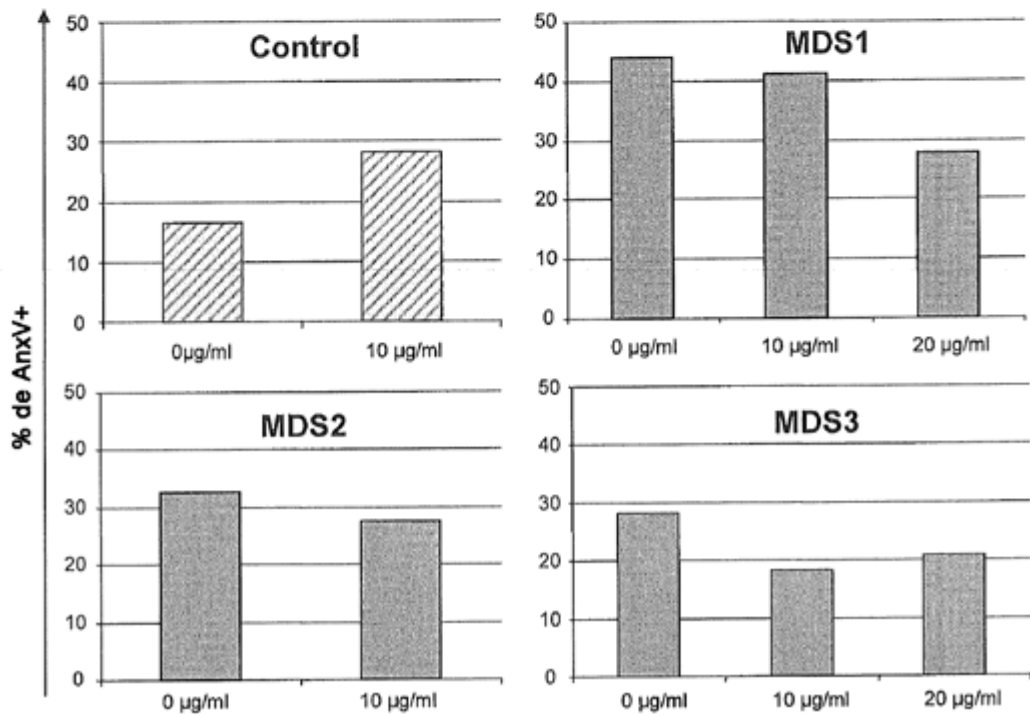
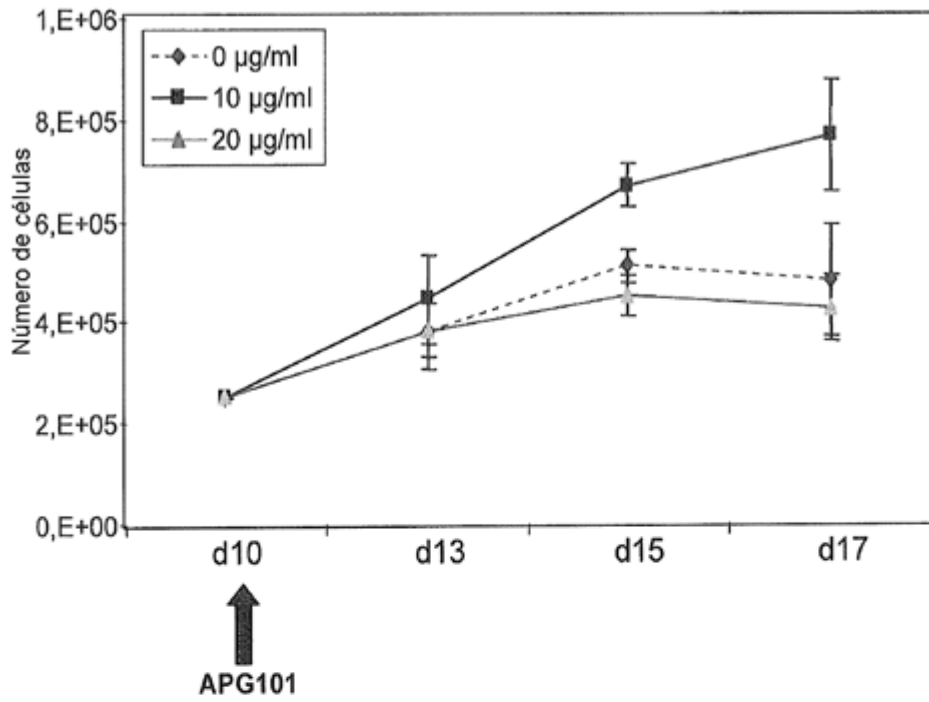


Figura 10

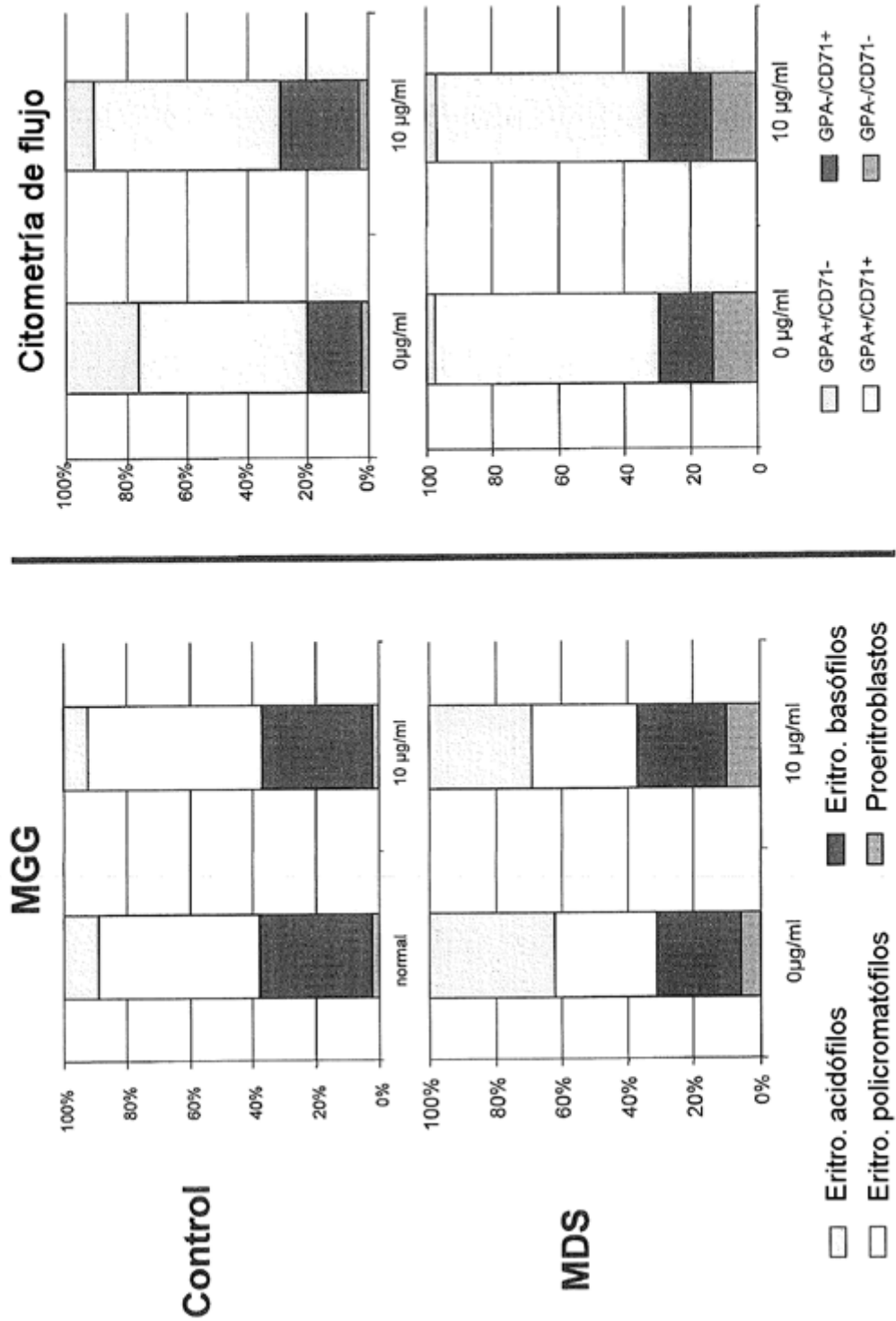


Figura 11

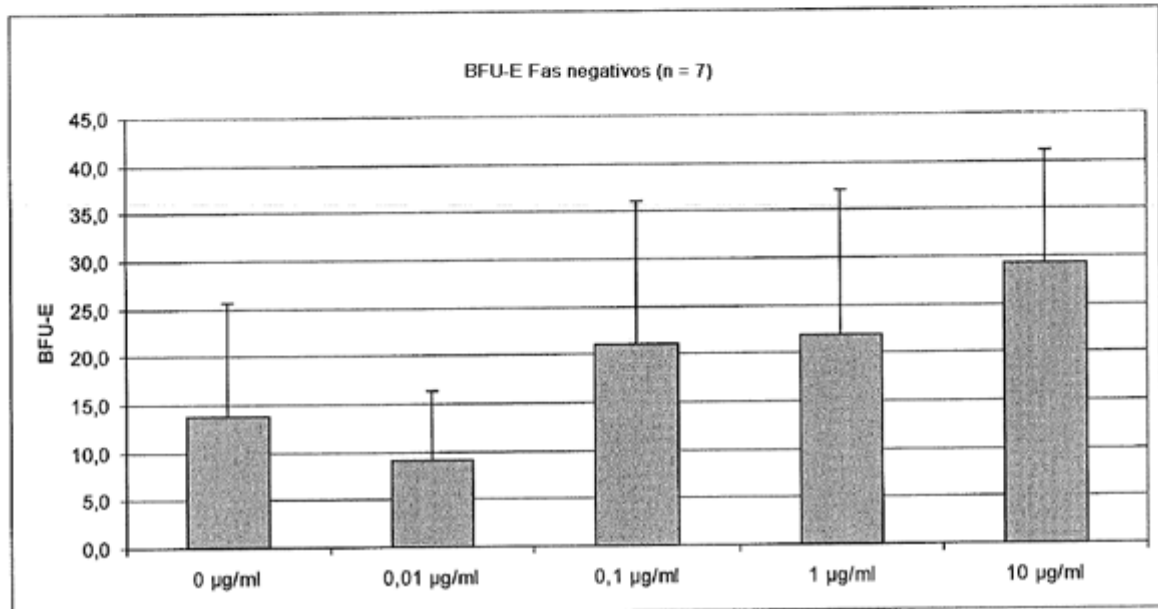
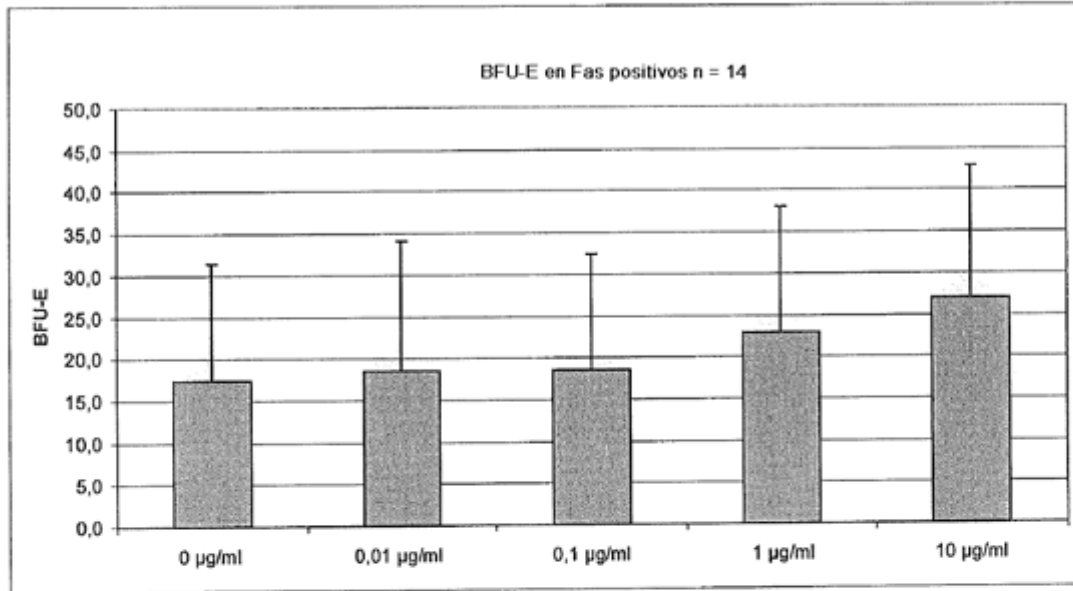


Figura 12

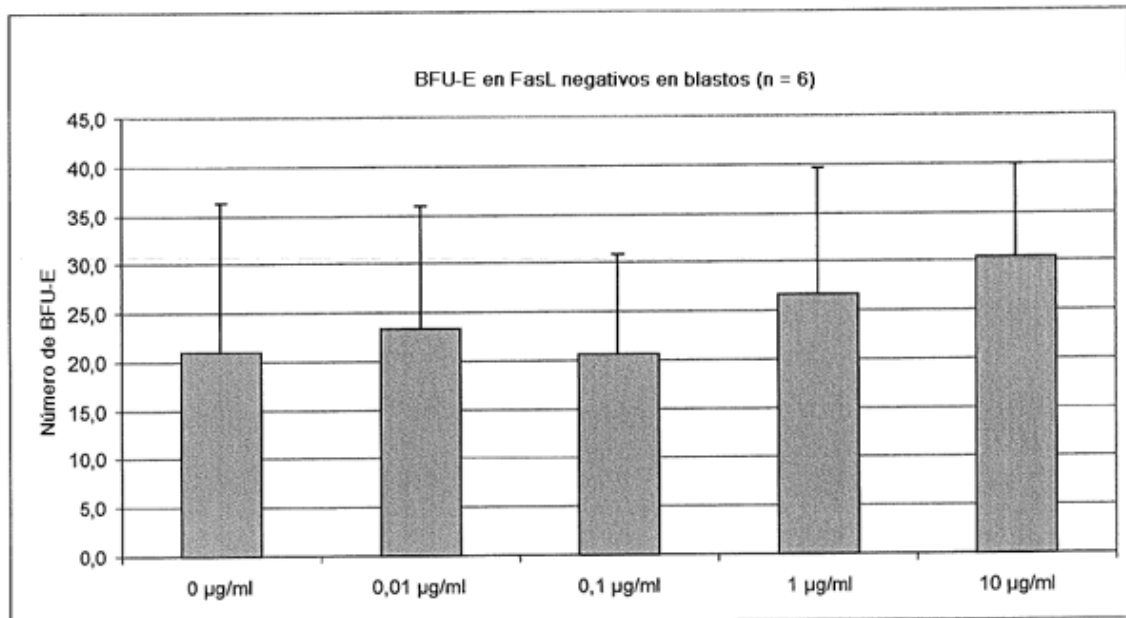
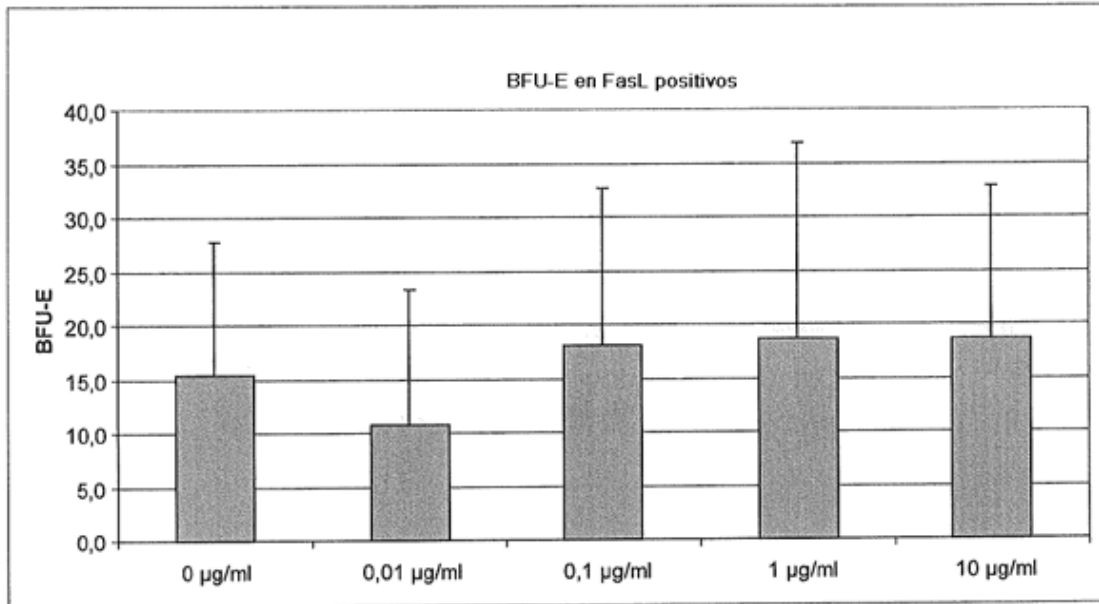


Figura 13

