

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 800 162**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.06.2015 PCT/IB2015/054455**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.12.2015 WO15189813**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2015 E 15742068 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020 EP 3154580**

54 Título: **Uso terapéutico de moduladores funcionales negativos de la eritropoyetina**

30 Prioridad:

12.06.2014 IT MI20141067

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.12.2020

73 Titular/es:

**ANDREMACON S.R.L. (100.0%)
Viale Zara 63
20159 Milano, IT**

72 Inventor/es:

**MARFIA, GIOVANNI;
NAVONE, STEFANIA ELENA;
SCALVINI, GIUSEPPE;
RIBONI, LAURA y
CAMPANELLA, ROLANDO**

74 Agente/Representante:

RUO, Alessandro

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 800 162 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso terapéutico de moduladores funcionales negativos de la eritropoyetina

Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a moduladores funcionales negativos de la eritropoyetina (EPO). Los compuestos de la invención, solos o en combinación, son efectivos en el tratamiento del glioblastoma multiforme.

5 **Antecedentes**

[0002] Los anticuerpos monoclonales o policlonales representan el segmento del mercado que se está desarrollando más rápidamente en la industria farmacéutica. A pesar de una serie de desventajas, se valoran especialmente entre las bioterapias por sus características únicas, como una alta especificidad del objetivo, una farmacocinética favorable (alta vida media), así como un desarrollo rápido y una alta frecuencia de éxito en comparación con moléculas de menor tamaño. Además, debido a los avances de las nuevas tecnologías, la capacidad de diseñar y humanizar inmunoglobulinas monoclonales específicamente purificadas, representa una de las áreas más rentables de la nueva biotecnología, abriendo nuevas vías para su uso en diferentes áreas de la medicina. Los cánceres son un grupo de enfermedades caracterizadas por un crecimiento incontrolado y por una invasividad y diseminación de células anormales. Su causa se debe a factores externos como el tabaco, productos químicos, radiación y factores internos, como mutaciones hereditarias, hormonas y factores paracrin, desequilibrios en el sistema inmunitario y daños en el ADN.

[0003] Estos factores pueden actuar juntos o en secuencia para iniciar y/o promover la carcinogénesis. En los Estados Unidos, el cáncer es actualmente la principal causa de muerte en personas menores de 85 años. Se espera que aproximadamente la mitad de la población masculina y poco más de un tercio de las mujeres en los EE. UU. desarrollen cáncer durante su vida. Hoy, millones de personas viven con cáncer o han sufrido cáncer. Es una práctica común distinguir los cánceres en dos familias: cánceres sólidos y cánceres no sólidos, es decir, cánceres de sangre.

[0004] La mayoría de los tumores sólidos, debido a su escaso y anormal desarrollo vascular, presentan niveles medios de presiones parciales de oxígeno que son más bajas que las del tejido original. El microambiente hipóxico presente en los tumores sólidos les da una mayor agresividad y un mayor potencial metastásico. En el entorno hipóxico, a través de la estabilización del factor de transcripción HIF1 α (Factor inducible por hipoxia 1 α), existe un aumento en la expresión de proteínas relacionadas con la angiogénesis, como el VEGF (Factor de crecimiento de endotelio vascular) y su receptor VEGFR, para mantener el metabolismo energético anaeróbico y la adaptación al estrés oxidativo (Maxwell et al., 1997). La evidencia experimental ha demostrado que la masa tumoral está compuesta por una gran cantidad de células capaces de proliferar de manera limitada y está compuesta por una población rara de células, llamadas células madre cancerosas (CSC), caracterizada por una actividad de proliferación ilimitada y capaz de mantener el tumor activo. Las células madre cancerosas poseen dos características distintivas: pueden renovarse por sí mismas y también experimentar procesos de diferenciación en células más maduras. Estas características otorgan a las células madre cancerosas un papel clave en los procesos responsables del inicio y mantenimiento del cáncer y además, de ser responsables de la alta resistencia a los tratamientos terapéuticos y, en consecuencia, a sus recurrencias. Como tales, constituyen un importante objetivo terapéutico, pero los mecanismos subyacentes a su patobiología no se conocen en profundidad.; dificultando la identificación de moléculas capaces de atacarlas. La hipoxia, inducida por HIF y esfingolípidos, desempeña un papel clave en el control del crecimiento tumoral y la angiogénesis y constituye uno de los mecanismos de supervivencia más eficaces del tumor. Los genes implicados en la vía biosintética de la neurogénesis y la hipoxia están sobreexpresados por las CSC en el nicho vascular/hipoxia perinecrotica, pero no en el tejido de transición en el margen de resección, si ha sido definido como "libre de enfermedad" en términos anatómicos patológicos. La hipoxia juega un papel clave en la regulación de las CSC a través de la inducción de HIF y de sus genes diana (VEGF, GLUT-1, NOS, EPO). Las CSC muestran la activación específica de las quinasas HIF1 α y MAP y, como se demostró recientemente, sintetizan y liberan eficazmente la esfingosina-1-fosfato (S1P) en relación con el estímulo hipóxico (Riccitelli et al., 2013). Riccitelli et al., 2013, utilizando células madre de glioblastoma, demuestran que las CSC, y en particular las células madre de glioblastoma (GSC) sintetizan S1P y lo exportan al entorno extracelular donde refuerzan la resistencia a la quimioterapia.

[0005] S1P ejerce su acción estimulando la proliferación, la supervivencia y la resistencia a los medicamentos de las células tumorales y las células madre cancerosas, además de promover la angiogénesis al actuar sobre las células madre y las células endoteliales. Aunque S1P puede actuar como un segundo mensajero intracelular, la mayoría de sus efectos son ejercidos por mediadores extracelulares, a través de la unión a receptores específicos acoplados a proteínas G, originalmente conocidas como EDG y ahora llamadas receptores S1P (S1PR). Debido a su papel fundamental en el control de la proliferación y la viabilidad celular, la interacción de S1P y sus receptores, previamente estudiados por su impacto en las enfermedades autoinmunes, es objeto de un intenso estudio, con el objetivo de identificar nuevos y más eficaces medicamentos contra los carcinomas. Hasta la fecha, se ha identificado un análogo de la esfingosina, FTY720, que, después de la fosforilación, actúa como un antagonista funcional de los S1PR. Se ha encontrado que el FTY720 es efectivo en la terapia de trasplante de órganos, la esclerosis múltiple y, in vitro, en la disminución del crecimiento tumoral en diferentes tipos de tumores.

[0006] La inflamación es un innato mecanismo de defensa inespecífico, que constituye una respuesta de protección del organismo que resulta en la acción nociva de los agentes físicos, químicos y biológicos, y cuyo objetivo final es la eliminación de la causa inicial del daño celular o tisular o una reacción autoinmune. El sistema inmune es el sistema responsable de la respuesta inflamatoria, y está formado por diferentes tipos de células, tejidos y órganos inmunes. La

respuesta inflamatoria normal es un proceso agudo que se resuelve después de la eliminación del estímulo que lo causó. Por el contrario, cuando la respuesta inflamatoria progresa, ya sea debido a la exposición repetida a un estímulo o cuando el agente se elimina adecuadamente, el proceso se vuelve crónico. Dependiendo del tejido y de la fase de inflamación en la que se encuentra, se activan diferentes tipos de células. La inflamación puede ser provocada por fenómenos autoinmunes de reconocimiento por parte del sistema inmune de antígenos "propios". La neuroinflamación en particular es un proceso inflamatorio "mediado por citoquinas" que puede ser causado por daño sistémico del tejido o, más a menudo, por daño directo al sistema nervioso central (SNC). La neuroinflamación difiere de la inflamación por la presencia reducida de vasos linfáticos dentro del parénquima cerebral; la falta de células endógenas capaces de presentar el antígeno y la presencia de la barrera hematoencefálica, lo que reduce el intercambio de células inmunes y mediadores de inflamación dentro del torrente sanguíneo. La persistencia de los procesos inflamatorios en el SNC puede causar graves daños al complejo neural y comprometer su integridad funcional.

[0007] La neuroinflamación puede tener diferentes orígenes como un origen biológico, por ejemplo, la isquemia; las infecciones bacterianas, pueden tener su origen en el depósito de material biológico (Alzheimer y Parkinson) o pueden derivarse de enfermedades de almacenamiento intracelular y extracelular que desencadenan la neuroinflamación. Además, pueden tener un origen traumático, como el trauma cerebral, y un origen autoinmune. Todas estas condiciones pueden activar la respuesta inmune innata en el SNC.

[0008] Las células microgliales representan el 5-10% de la población celular total en el cerebro. Es una población de derivación hematopoyética, de hecho, durante la embriogénesis, una subpoblación de monocitos migra en el sistema nervioso y se diferencia en macrófagos residentes.

[0009] Las células microgliales están compuestas por un cuerpo celular pequeño y por largos procesos cónicos con lamellipodia que les dan una morfología ramificada. Se propagan uniformemente en el parénquima cerebral y pueden adherirse a las neuronas, pero también a los vasos sanguíneos y propagarse libremente en la materia gris. Estas células están dentro de la barrera hematoencefálica y, por lo tanto, están listas para recibir y responder a cualquier daño en la misma barrera. La microglía normalmente está inactiva en el SNC, el soma celular permanece casi inmóvil mientras las ramas se mueven constantemente para controlar su entorno. La aparición de cambios fisiológicos en el medio ambiente, como el aumento de las proteínas séricas, la toxicidad del glutamato, los depósitos de proteínas amiloides, Tau y fosfo-Tau y sustancias amorfas, el aumento de purinas (ATP, ADP) o la presencia de lipopolisacárido (la molécula presente en la membrana de bacterias Gram-negativas) son todos estímulos capaces de activar los diferentes receptores de la microglía y sus vías de señalización. Las células microgliales presentes en las áreas perivasculares también ejercen la función de las células presentadoras de antígeno (APC) en las células T específicas de mielina, que se han infiltrado en el SNC y que pueden comenzar los procesos inflamatorios. (Ransohoff y Perry 2009). Cuando la microglía se activa, pasa de una morfología ramificada a una morfología ameboide. La lamellipodia se retrae y la célula asume su capacidad fagocítica para eliminar los residuos de las células muertas o engullir bacterias y virus. El papel principal de la microglía activada es promover y favorecer el estado de inflamación a través de la producción de citocinas, intermediarios reactivos de oxígeno, proteasas, factores del complemento y quimiocinas.

[0010] Dichos mediadores inflamatorios fomentan la infiltración de células inmunes del torrente sanguíneo, el reclutamiento de otras células microgliales de las áreas circundantes y la activación de astrocitos. Cuando el estímulo inflamatorio que desencadenó la activación falla, la microglía participa en los procesos de supresión del estado inflamatorio con la producción de citocinas inmunomoduladoras, como IL-15, y antiinflamatorias, como IL-10; posteriormente regresando a un estado de inactivación o experimentando apoptosis (Lee, Nagai et al. 2002; Garden y Moller 2006). La activación microglial y los eventos neuroinflamatorios que siguen están dirigidos a la neuroprotección y a la eliminación de la causa del fracaso de la homeostasis. En realidad, tanto en enfermedades neurodegenerativas de naturaleza crónica como en eventos traumáticos, como isquemia, la activación microglial persistente y no controlada puede tener efectos neurotóxicos y contribuir a exacerbar el daño neuronal. El equilibrio entre la acción neuroprotectora y la acción neurotóxica de la microglía está determinado por varios factores, incluida la naturaleza del estímulo y las interacciones que se desarrollan entre la microglía, las otras células del sistema inmune y la red neuronal, por lo que es demasiado simplista clasificar el papel de la microglía de una manera absoluta y ciertamente se necesitan estudios más profundos para arrojar luz sobre los mecanismos que regulan este doble papel (Harry y Kraft 2008). De manera evidente se ha demostrado que la modulación de la activación de la microglía, y el estado inflamatorio en el cerebro en general, puede mejorar los síntomas de muchas afecciones patológicas y disminuir el fenómeno de neurodegeneración (Morganti-Kossmann, Rancan et al. 2002; McGeer y McGeer 2007; Gonsette 2008; Shie, Nivison et al. 2009). En base a estas observaciones, la activación microglial representa un potencial candidato en el plano farmacológico para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas e inflamatorias.

[0011] La artropatía hemofílica se considera una enfermedad inflamatoria. En el contexto de la inflamación crónica, la artropatía hemofílica (vinculada a un déficit de factor VIII / IX) representa un marco específico caracterizado por hiperplasia sinovial respaldada por un aumento de la angiogénesis con características aberrantes similares a tumores. Este contexto implica una mayor frecuencia de sangrado intraarticular hasta la destrucción completa de los tejidos, lo que resulta en anquilosis y pérdida completa de la función motora. La terapia de reemplazo actualmente disponible basada en el uso de concentrados de factor VIII / IX no puede prevenir el desarrollo de daño articular (Manco-Johnson M. et al. New England Journal of Medicine 2007). En cambio, las terapias que interfieren con la angiogénesis, la proliferación sinovial y el proceso de inflamación intrínseca que sigue, pueden interrumpir el círculo vicioso de sinovitis-sangrado-inflamación.

[0012] La eritropoyetina humana (EPO) es una glucoproteína de 30,4 kDa producida y secretada principalmente por los riñones. La EPO normalmente está presente en el torrente sanguíneo, donde es la principal hormona eritropoyética. La

EPO es responsable de regular la producción de glóbulos rojos, estimulando la proliferación y diferenciación de los progenitores eritroides, así como la retención del mismo eritroide. La EPO interactúa con un receptor específico ubicado en progenitores en la médula ósea, mientras que todos los objetivos en el sistema nervioso y no nervioso que intervienen en las funciones "no eritropoyéticas" aún no están claramente definidos. El uso de la EPO y sus derivados es bien conocido en el tratamiento de la anemia por insuficiencia renal, eritropoyesis reducida y en combinación con regímenes de quimioterapia mielosupresora en el tratamiento de tumores malignos.

[0013] EP1067955 describe el uso de la EPO en la inhibición del crecimiento tumoral, donde la EPO estimula la respuesta inmune natural contra las células cancerosas.

[0014] El documento WO2005099773 describe el uso de la EPO o su análogo en la inhibición de la angiogénesis en tumores, un efecto que se cree una consecuencia de la capacidad de la EPO para reducir los niveles de HIF-1 alfa en las células tumorales. Este documento no describe el uso de un anticuerpo anti-EPO para el tratamiento de tumores malignos.

[0015] El documento WO 2010/000875 A1 se refiere a una molécula capaz de unirse al receptor EPO con un anticuerpo cuyas Regiones de Determinación Complementaria (CDR) están incluidas en una lista de secuencias de aminoácidos definidas por los autores con los acrónimos CDR1, CDR2, CDR3. Por lo tanto, este documento describe el uso de particulares moléculas bien definidas dirigidas solo hacia el receptor EPO, y que se unen con EPOR que tiene la propiedad de inhibir / comprometer la tasa de invasión de células tumorales. Este documento no describe el uso de un anticuerpo anti-EPO para el tratamiento del glioblastoma multiforme.

[0016] Yasuda y col., British Journal of Cancer, vol. 84, no. 6, 2001, se refiere al tratamiento in vivo de modelos animales murinos con anticuerpo monoclonal anti-EPOR2 y una forma soluble del receptor EPO. El anticuerpo en cuestión, R2, se obtuvo y caracterizó en Goto et al. 1989. Sin embargo, no hay una descripción del epítipo contra el cual se dirige el anticuerpo R2.

[0017] El documento EP 1459762 describe péptidos que se unen a EPO y que son antagonistas de los receptores de EPO. Sin embargo, este documento no describe un anticuerpo anti-EPO y su uso farmacéutico.

[0018] JP2012162500 no describe un anticuerpo anti-EPO que reconozca y se una a la EPO humana AA 28-189. El documento WO2009 / 074969 no describe el uso de un anticuerpo anti-EPO y / o el uso combinado con anti-EPO y un antagonista de la esfingosina-1-fosfato en el tratamiento de tumores malignos, en la artropatía hemofílica y mucho menos en patologías relacionadas con la neuroinflamación, identificando un anticuerpo anti-EPO capaz de bloquear la síntesis y liberación de esfingosina-1-fosfato.

[0019] Hardee y col., Clinical Cancer Research, The American Association for Cancer Research, vol. 12, no. 2, p. 332-339, 2006, es una revisión que describe el papel de la EPO en los tumores. En particular, los autores describen la expresión de EPOR en células cancerosas y la relación EPO-EPOR, sugiriendo que un tratamiento exógeno con rEPO, EPO recombinante, podría tener efectos directos sobre las células tumorales, actuando sobre la proliferación, apoptosis y modulación de sensibilidad de estas células a los agentes quimioterapéuticos. Los autores concluyen que es necesaria más investigación para estudiar el sistema autocrino-paracrino de EPO-EPOR, sin demostrar ningún mecanismo biológico en las células cancerosas y, sobre todo, argumentando que existe evidencia opuesta que sugiere cuán beneficiosa es la administración de EPO en algunos tumores. La revisión no describe moléculas capaces de funcionar a través de la inhibición de la síntesis y / o liberación de esfingosina-1-fosfato.

[0020] De acuerdo con el cuadro clínico descrito anteriormente, y con la información disponible en el campo, existe una gran necesidad de nuevos enfoques terapéuticos para el tratamiento de tumores, efectivos incluso a nivel de células madre cancerosas e incluso en tumores particularmente agresivos, como, por ejemplo, el glioblastoma, que es el tumor maligno más común y agresivo del sistema nervioso central.

[0021] En particular, existe una gran necesidad de nuevos y poderoso anticancerígenos más efectivos, capaces de actuar sobre la síntesis de S1P y/o sobre la interacción de S1P/S1PR estos nuevos compuestos constituyen una oportunidad de desarrollo de terapias válidas en el tratamiento de autoinmunes y no autoinmunes basadas en enfermedades inflamatorias crónicas, la neuroinflamación en particular, en el tratamiento de pacientes sometidos a trasplantes de órganos o tejidos, en el tratamiento de la artropatía hemofílica y enfermedades neurológicas en las que la activación anormal o excesiva del sistema autoinmune tiene un papel patogénico.

[0022] Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar un nuevo enfoque terapéutico también efectivo en modelos tumorales caracterizados por una agresividad considerable, así como en enfermedades de carácter autoinmune, en el tratamiento de pacientes sometidos a trasplante de órganos o tejidos y en el tratamiento de hemofilia artropatía.

Breve descripción de las figuras

[0023]

Figura 1: SEC 2

Figura 2: microfotografía del cultivo en el tiempo 0.

Figura 3: fotomicrográficas del cultivo de control y tratadas con anti-EPO a las 72 h del tratamiento.

Figura 4: fotomicrográficas del cultivo de control y tratadas con anti-EPO a las 96 h del tratamiento.

- Figura 5: microfotografías del cultivo de control y tratadas con anti-EPO a las 120 h del tratamiento.
- Figura 6: fotomicrografías del cultivo de control y tratadas con anti-EPO a las 144 h del tratamiento.
- Figura 7: microfotografías del cultivo de control y tratadas con anti-EPO a las 168 h del tratamiento.
- Figura 8: microfotografías del cultivo de control y tratadas con anti-EPOR a las 72 h del tratamiento.
- 5 Figura 9: microfotografías del cultivo de control y tratadas con anti-EPOR a las 96 h del tratamiento.
- Figura 10: fotomicrografías del cultivo de control y tratadas con anti-EPOR a las 120 h del tratamiento.
- Figura 11: fotomicrografías del cultivo de control y tratadas con anti-EPOR a 144H del tratamiento.
- Figura 12: fotomicrografías del cultivo de control y tratadas con anti-EPOR a las 168 h del tratamiento.
- Figura 13: recuento del número de células infiltrantes.
- 10 Figura 14: recuento de viabilidad celular.
- Figura 15: análisis de citometría de flujo del ciclo celular realizado en células de control.
- Figura 16: análisis de citometría de flujo del ciclo celular realizado en células expuestas durante 24 horas a anti EPO.
- Figura 17: Western Blot con anticuerpo anti-Caspase-9 y control de carga con beta actina.
- Figura 18: cuantificación de los niveles de expresión de Caspase-9.
- 15 Figura 19: Western Blot con anticuerpo anti-Caspasa 3 y control de carga con beta actina.
- Figura 20: cuantificación de los niveles de expresión de Caspase-3.
- Figura 21: Western Blot con anticuerpos anti-Bax y anti-Bcl2 y control de carga con beta actina.
- Figura 22: cuantificación de los niveles de expresión de Bcl2 y Bax.
- 20 Figura 23: citometría de flujo con tinción con anexina V y yoduro de propidio en la muestra de control, tratada durante 24, 48, 72, 96 horas con anti-EPO.
- Figura 24: análisis de la expresión de PCNA en control y muestra tratada durante 48 y 72 horas con anti-EPO.
- Figura 25: análisis de los niveles de expresión de SK1 por Western Blot.
- Figura 26: análisis de los niveles de expresión de SK2 por Western Blot.
- 25 Figura 27: análisis de los niveles de expresión de S1P intracelular y extracelular por HPTLC después del pulso con esfingosina tritiada y cuantificación relativa.
- Figura 28: recuento de viabilidad celular de la línea celular de microglía N9
- Figura 29: recuento de la cantidad de células microgliales que migran
- Figura 30: análisis de la migración de células microgliales que se infiltran en el tabique.
- Figura 31: análisis de la proliferación celular de células microgliales.
- 30 Figura 32: recuento del número de células Caco-2 infiltrantes
- Figura 33: recuento de viabilidad celular de células Caco-2
- Figura 34: recuento del número de células A549 infiltrantes
- Figura 35: recuento de viabilidad celular de células A549
- Figura 36: recuento de viabilidad celular con tratamiento combinado de células madre GBM a las 48 h
- 35 Figura 37: recuento de viabilidad celular con tratamiento combinado de células madre GBM a las 72 h.
- Figura 38: recuento de viabilidad celular de células endoteliales aisladas de la membrana sinovial de sujetos sanos (CTR) y pacientes hemofílicos
- Figura 39: recuento de proliferación celular de células endoteliales aisladas de la membrana sinovial de sujetos sanos (CTR) y pacientes hemofílicos
- 40 Figura 40: Niveles de ceramida en células endoteliales aisladas de sinovial de sujetos sanos (CTR) y pacientes hemofílicos.
- Figura 41: Niveles de células endoteliales intracelulares de esfingosina-1-fosfato aisladas de la membrana sinovial de sujetos sanos y pacientes hemofílicos.

Figura 42: Medida de los niveles de VEGF liberados en los medios de cultivo condicionados por células endoteliales aisladas de la membrana sinovial de sujetos control y pacientes hemofílicos.

Resumen de la invención

[0024] La presente invención se refiere a moduladores funcionales negativos de la eritropoyetina (EPO) para su uso en el tratamiento del glioblastoma multiforme, en el que dichos moduladores son moléculas que se unen a la EPO seleccionada del grupo que consiste en:

(i) anticuerpos anti-EPO, que reconocen y se unen al AA 28-189 de EPO humano (SEQ ID NO: 2);

(ii) anticuerpos anti-receptor de EPO (EPOR) que reconocen la porción citoplasmática C-terminal de EPOR; y

(iii) péptidos o péptidos miméticos que reconocen y se unen al AA 28-189 de EPO humano. En la presente invención, la frase 'modulador funcional negativo de EPO' significa una molécula, natural o sintética, capaz de interacción directa o indirecta con EPO y/o interacción directa o indirecta con el receptor de EPO, y/o interacción directa o indirecta con uno de los mediadores de la cascada de transducción de señales que involucra EPO, y/o interacción directa o indirecta con la vía biosintética de EPO y/o el receptor anti-EPO (EPOR), en el que dichas interacciones han dado como resultado una disminución en los niveles de EPO, en lugar de una disminución en la estimulación de la cascada de transducción de señales en la que está implicada la EPO. En una realización adicional, dichos moduladores funcionales negativos de EPO actúan sobre EPO que ha sufrido modificaciones postraduccionales.

[0025] En una representación preferida, dichos moduladores funcionales negativos se seleccionan del grupo que comprende un anticuerpo policlonal anti-EPO o una inmunoglobulina monoclonal purificada específica, preferiblemente manipulada o humanizada, contenida en dicha mezcla de anticuerpo policlonal anti-EPO, o es un péptido purificado de dicha mezcla de anticuerpo policlonal anti-EPO por escisión proteolítica de una o más de las inmunoglobulinas de la misma mezcla. En otro aspecto preferente dichos moduladores son péptidos o anticuerpos que tienen un efecto sobre la modulación de la esfingosina-1-fosfato (S1P).

[0026] En una forma de realización preferida, dicho modulador funcional negativo es un anticuerpo anti-EPO monoclonal o policlonal. Preferiblemente, dicho anti-EPO es un anticuerpo policlonal contra el AA 28-189 EPO humano (SEC.2), o un anticuerpo monoclonal generado contra un epítipo contenido en la secuencia AA 28-189 del EPO humano (SEC.2), donde EPO es codificado por la secuencia del gen humano SEC.1:

SEC.1:

1 cccggagccg gaccggggcc accgcgcccg ctctgctccg acaccgcgcc

ccctggacag

61 ccgccctctc ctccaggccc gtggggctgg ccctgcaccg

ccgagctcc cgggatgagg

121 gcccccggtg tggtcaccg ggcgcgccca ggtcgctgag

ggaccccgcc caggcgcgga

181 gatgggggtg cacggtgagt actcgcgggc tgggcgctcc

cgcccgccc ggtccctgtt

241 tgagcgggga ttagcgccc cggctattgg ccaggaggtg

gctgggttca aggaccggcg

301 actgtcaag gaccccgaa gggggagggg ggtggggcag

cctccagtg ccagcgggga

361 ctgggggag tcctgggga tggcaaaac ctgacctgtg aaggggacac agtttggggg

421 ttgaggggaa gaagggttg ggggttctgt gtgccagtgg agaggaagct gataagctga

481 taacctgggc gctggagcca ccactatct gccagagggg aagcctctgt cacaccagga

541 ttgaagtttg gccggagaag tggatgctgg tagctggggg tggggtgtgc acacggcagc

601 aggattgaat gaaggccagg gaggcagcac ctgagtgtt gcattggttg ggacaggaag

661 gacgagctgg ggcagagacg tggggatgaa ggaagctgtc ctccacagc cacccttctc

721 cctccccgcc tgactctcag cctggctatc tgttctagaa tgcctgcct ggctgtggct

781 tctcctgtcc ctgctgtcgc tcccttggg cctccagtc

ctgggcgccc caccacgcct

ES 2 800 162 T3

841 catctgtgac agccgagtc tggagaggta cctcttgag
 gccaaggagg ccgagaatat
 901 cacggtgaga cccctcccc agcacattcc acagaactca
 cgctcagggc ttcagggaac
 5 961 tcctcccaga tccaggaacc tggcacttg tttgggtgg
 agttgggaag ctgacactg
 1021 cccccctaca taagaataag tctggtggcc ccaaaccata
 cctggaaact aggcaaggag
 1081 caaagccagc agatcctacg gcctgtgggc cagggccaga
 10 gccttcaggg acccttgact
 1141 ccccggtgct tgtgatttc agacgggctg tgctgaacac
 tgcagctga atgagaatat
 1201 cactgtcca gacaccaaag ttaattcta tgctggaag
 aggatggagg tgagttcctt
 15 1261 tttttttt ttcctttct tttggagaat ctcatgtcg
 agcctgattt tggatgaaag
 1321 ggagaatgat cgagggaag gtaaatgga gcagcagaga
 tgaggctgcc tgggcgcaga
 1381 ggctcacgc tataatcca ggctgagatg gccgagatgg
 20 gagaattgct tgagccctgg
 1441 agttcagac caacctaggc agcatagtga gatccccat
 ctctacaaac atttaaaaa
 1501 attagtcagg tgagggtgt catggtgta gtccagata
 tttgaaggc tgaggcggga
 25 1561 ggatcgctt agcccaggaa tttaggctg cagtgagctg
 tgatcacacc actgcactcc
 1621 agcctcagtg acagagtga gccctgtctc aaaaaagaaa
 agaaaaaga aaaataatga
 1681 gggctgtatg gaatacatc attattcatt cactcactca
 30 ctactcact cattattca
 1741 ttcattcatt caacaagtct tattgcatac ctctgtttg
 ctgacttg tgctggggc
 1801 tgctagggg caggaggag agggtagat gggtagctg
 actccagag tccactcct
 35 1861 gtaggcggg cagcaggccg tagaagtctg gcaggcctg
 gccctgctg cggaagctg
 1921 cctgcggggc caggccctgt tggtaactc tcccagccg
 tgggagcccc tgagctgca
 1981 tgtggataaa gccgtcagtg gccttcgag cctcaccat
 40 ctgcttcggg ctctgggagc
 2041 ccaggtgagt aggagcggac acttctgctt gcccttctg
 taagaagggg agaaggtct

2101 tgctaaggag tacaggaact gtccgtattc cttccctttc
tgtggcactg cagcgacctc
2161 ctgttttctc ctggcagaa ggaagccatc tcccctccag
atgcggcctc agctgctcca
5 2221 ctccgaacaa tctactgtga cactttccgc aaactcttcc
gagtctactc caatttcctc
2281 cggggaaagc tgaagctgta cacaggggag gcctgcagga
caggggacag atgaccaggt
2341 gtgtccacct gggcatatcc accacctccc tcaccaacat
10 tgcttggtcc acaccctccc
2401 ccgccactcc tgaaccccggt cgaggggctc tcagctcagc
gccagcctgt cccatggaca
2461 ctccagtgcc agcaatgaca tctcaggggc cagaggaact
gtccagagag caactctgag
15 2521 atctaaggat gtcacagggc caactgagg gccagagca
ggaagcattc agagagcagc
2581 tttaaactca gggacagagc catgctggga agacgcctga
gctcactcgg caccctgcaa
2641 aatttgatgc caggacacgc ttggaggcg atttacctgt
20 tttcgcacct accatcaggg
2701 acaggatgac ctggataact taggtggcaa gctgtgactt
ctccagggtc cacgggcatg
2761 ggcactccct tgggtggcaag agcccccttg acaccggggg
ggtgggaacc atgaagacag
25 2821 gatgggggct ggcctctggc tctcatgggg tccaagttt
gtgtattctt caacctcatt
2881 gacaagaact gaaaccacca a

[0027] Dicha porción de aminoácido es la siguiente:

SEC.2:

30 28 app rlicdsrvle rylleakeae nittgcaehc
61 slnenitvpd tkvnfyawkr mevgqqavev wqglallsea
vlrgqallvn ssqpweplql
121 hvdkavsglr sltllralg aqeaisppda asaaplrtilt
adtfrklfrv ysnflrgklk
35 181 lytgeacrtg dr

[0028] El efecto terapéutico de los moduladores de la invención también puede tener lugar a través de la acción independiente de la modulación negativa de EPO o mediante la unión a su receptor, a través de la acción sobre diferentes células diana.

40 **[0029]** En una forma de realización adicional, dichos moduladores funcionales negativos de EPO, solos o en combinación, se combinan en una formulación farmacéutica adecuada para usar en el tratamiento de glioblastoma multiforme. Dado que la molécula de la presente invención muestra baja toxicidad, puede administrarse de forma segura sola o como una formulación farmacéutica como tabletas, polvo, gránulos, cápsulas (incluidas cápsulas blandas), agentes líquidos, inyecciones, supositorios o agentes de liberación lenta generalmente utilizados para la producción de preparaciones farmacéuticas, por vía oral o parenteral (tópica, rectal, intravenosa, subcutánea, intramuscular, intranasal, intravaginal, a
45 través de la mucosa oral, la mucosa pulmonar o la administración transocular, etc.) o mediante la incorporación a liposomas

o mediante el suministro funcional hacia objetivos o compartimentos específicos, por ejemplo intracraneales, intratumorales, mediante la unión a portadores moleculares o en combinación con moléculas que permiten la apertura temporal de la barrera hematoencefálica (por ejemplo, manitol) u otros anticuerpos antiinflamatorios, monoclonales y fármacos que actúan como inmunosupresores

5 **[0030]** Mientras que el objetivo terapéutico son las células de glioblastoma, dicha combinación está formulada de tal manera que facilita el cruce de la barrera hematoencefálica. A modo de ejemplo, en dicha formulación se usan factores conocidos como vehículos, tales como IL13 / IL13R-ApoE. Alternativamente, dichos compuestos se administran en forma de nanopartículas o liposomas, o con tratamiento local o intratecal, o las obleas de biopolímero biodegradables cargadas con el tratamiento de interés se implantan directamente en la cavidad quirúrgica después de la resección de tumores
10 primarios y tumores recurrentes.

[0031] Dicho cáncer es el glioblastoma multiforme.

[0032] Preferiblemente, dicho cáncer es un glioblastoma multiforme, gliomas de grado II y III (glioma gemistocítico de grado II, gliomatosis cerebri, glioma anaplásico) (clasificación de la OMS 2007).

15 **[0033]** Como se muestra más adelante en el texto, el uso de anti-EPOR y EPO-ARNip, da los efectos parcialmente positivos en las enfermedades tratadas, respecto al anti-EPO policlonal dirigido contra la secuencia de aminoácidos AA. 28-189 de EPO. Se puede suponer, por lo tanto, que el objetivo de la invención no es solo capturar y reducir los niveles de EPO evitando la unión al receptor, sino que dentro de la mezcla de anticuerpos hay contenidas moléculas con acción independiente sobre la modulación negativa a los niveles de EPO en otros objetivos celulares, o que los módulos EPO funcionan como se muestra en los experimentos, no solo uniéndose al receptor, sino que actúan, por ejemplo, en otras
20 rutas, como el ajuste de las células madre de las células tumorales, la resistencia a la apoptosis, hipoxia y la modulación de la síntesis y liberación de esfingosina-1-fosfato.

Descripción detallada de la invención

[0034] Sorprendentemente, se ha demostrado que los moduladores funcionales negativos de EPO, descritos y reivindicados en la presente invención, pueden inducir apoptosis en células madre cancerosas, inhibir su crecimiento y
25 conducir a una posible inducción de su diferenciación. En una realización, dicho modulador funcional negativo es un anticuerpo anti-EPO, EPO es preferiblemente el anticuerpo policlonal (H-162) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) desarrollado contra la secuencia de aminoácidos EPO 28-189 de origen humano (SEC. 1) En una realización adicional, dicho modulador funcional negativo es una inmunoglobulina monoclonal específica purificada, contenida en la mezcla anterior del anticuerpo policlonal anti-EPO (H-162) (Santa Cruz Biotechnology, Inc), o es un péptido purificado de dicha mezcla de anti -EPO
30 anticuerpo policlonal (H-162) (Santa Cruz Biotechnology, Inc) por escisión proteolítica de una o más de las inmunoglobulinas de la misma mezcla o un anticuerpo monoclonal generado contra un epítipo contenido en la secuencia de aminoácidos 28-189 en consecuencia. En una realización preferida adicional, dicho modulador funcional negativo es el anticuerpo policlonal EPO R (M-20) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), o una inmunoglobulina específica purificada, contenida en la mezcla anterior de anticuerpo policlonal anti-EPOR. Alternativamente, dicho modulador funcional negativo
35 está dado por la combinación del anticuerpo anti-EPO y el anticuerpo anti-EPOR. Sorprendentemente, los moduladores funcionales negativos de EPO, como los anticuerpos anti-EPO y los anticuerpos anti-EPOR, pudieron inducir apoptosis en células madre de glioblastoma humano in vitro. Es bien sabido que el glioblastoma es un tumor particularmente agresivo y que las células derivadas del glioblastoma son particularmente resistentes a los estímulos tóxicos. En particular, la biología y la agresividad del glioblastoma permiten modelar esta afección como un ejemplo de cáncer en el que las células madre
40 tienen un papel jerárquico en la modulación del crecimiento de las células cancerosas no del tipo de células madre (que constituyen la masa tumoral), por ejemplo a través de la liberación de S1P que tiene acción paracrina/autocrina (ver Marfia G, et al. autocrine/paracrine sphingosine-1-phosphate fuels and proliferative stemness qualities of glioblastoma stem cells. Glia. 2014 Dec; 62 (12): 1968-81) y que por su naturaleza son resistentes a los tratamientos comunes de quimioterapia y radioterapia, lo que aumenta la agresividad del tumor y desencadena su propia recaída. Para el propósito de la presente
45 invención, se ha seleccionado una línea celular de glioblastoma específica, denominada SC02. Las células SC02 tienen mutaciones en el gen p53. Se sabe que las mutaciones en el gen p53 confieren resistencia a los estímulos apoptóticos, por lo tanto, es particularmente difícil inducir la apoptosis en las células SC02. Los resultados obtenidos con los moduladores funcionales negativos de EPO, reivindicados aquí y descritos en los ejemplos que siguen, muestran la sorprendente efectividad de dichos moduladores, particularmente porque se obtuvieron en un modelo in vitro caracterizado por una fuerte
50 resistencia a los estímulos apoptóticos. Sorprendentemente, la exposición a un anticuerpo anti-EPO reduce los niveles de esfingosina quinasa 1 (SK1) en las células madre del glioblastoma, siendo SK1 una enzima con una acción predominantemente antiapoptótica involucrada en la fosforilación de la esfingosina en la posición 1 y en su posterior conversión en activa forma esfingosina-1-fosfato (S1P). Esto da como resultado una disminuida producción y una menor liberación extracelular de S1P, cuyos niveles se han reducido sorprendentemente en aproximadamente un 50% después
55 del tratamiento con anti-EPO. El mismo tratamiento con anti-EPO no ha cambiado, o en algunos modelos celulares, ha llevado a un aumento en los niveles de esfingosina quinasa 2 (SK2), una enzima con un papel predominantemente pro-apoptótico. El tratamiento con anti-EPO también ha aumentado los niveles de ceramida, cuya función proapoptótica y diferenciación contra las células madre está bien documentada entre las técnicas conocidas. Estos estudios han sido publicados: Marfia G, et al. Autocrine/paracrine sphingosine-1-phosphate fuels and proliferative stemness qualities of glioblastoma stem cells. Glia. 2014 Dec; 62 (12): 1968-81.

[0035] El tratamiento combinado realizado en células madre cancerosas con el anticuerpo anti-EPO y FTY720 y/o temozolomida mostró un efecto superior en términos de inducción de apoptosis y de bloqueo del crecimiento tumoral, en

comparación con el efecto medido por anti-EPO, FTY720 y temozolomida probado individualmente. FTY720, agonista funcional para el receptor S1P, se activa después de la fosforilación mediada por la esfingosina quinasa, especialmente por SK2 y se usa en la terapia inmunosupresora post-trasplante, en la esclerosis múltiple y también en el tratamiento de tumores malignos. Dado que anti-EPO mantiene inalterados los niveles de esfingosina quinasa 2 (SK2), o aumenta los niveles de esfingosina quinasa 2 (SK2), y reduce en cambio los de la esfingosina quinasa 1 (SK1), la combinación con anti-EPO y FTY720 se ve favorecida aún más, esta última administrada en forma de un profármaco y activado a nivel celular por SK2. La combinación con anti-EPO puede realizarse también con una o más moléculas seleccionadas de antagonistas de S1P que incluyen FTY720-P, SW-2871, VPC24191, AUY954, SEW2871 (5- [4-fenil-5- (trifluorometil) -2-tienil] -3- [trifluorometil] fenil] -1,2,4-oxadiazol), VPC23153, DS-GS-44, VPC01091. Dentro del alcance de los efectos sobre las afecciones inflamatorias crónicas y no sobre la base autoinmune, los estudios han demostrado que, al activar la microglía con lipopolisacárido, un potente estímulo inflamatorio, hay proliferación y migración del mismo, así como daño a las células objetivo y síntesis, y lanzamiento de S1P. El tratamiento con moduladores negativos de EPO de acuerdo con la invención, en asociación con o sin FTY720 y sus análogos, como se muestra en los ejemplos que siguen, inhibe la proliferación, migración y supervivencia de la microglía activada, además de reducir los niveles de productos S1P mediante microglía. Estos efectos se ven reforzados por la asociación de dos principios. Las células que participan principalmente en el mantenimiento y la amplificación del estado neuroinflamatorio, a través de la producción de moléculas proinflamatorias como las citocinas y las quimiocinas, son las de la microglía. Sin embargo, la activación microglial prolongada e incontrolada es perjudicial para las neuronas y, por lo tanto, la inhibición del estado neuroinflamatorio prolongado constituye hoy un objetivo de estrategias para limitar el daño neuronal. Para probar esta hipótesis, un modelo *in vitro* en el que las células N9, (una línea celular inmortalizada de microglía murina), cultivada en presencia de lipopolisacárido, se usó como un potente estímulo inflamatorio y se sometió a tratamiento con anti-EPO policlonal; EPO-ARNip; anti-EPO + FTY720 para estudiar los efectos sobre la supervivencia, la migración y la proliferación de microglía activada.

[0036] En el contexto de los efectos sobre las enfermedades inflamatorias como la artropatía hemofílica, los estudios de aislamiento de células endoteliales de la sinovial de pacientes con hemofilia, por primera vez demostraron sorprendentemente un aumento de la angiogénesis con estabilización reducida y maduración de los vasos (tipo tumor) a nivel sinovial, asociado con una mayor liberación de VEGF en el medio de cultivo, especialmente en comparación con sus respectivos controles de salud. Además, el estudio del metabolismo de los esfingolípidos de estas células mostró un aumento significativo en los niveles intracelulares de esfingosina-1-fosfato como el principal mediador de la neo-angiogénesis y el mecanismo inflamatorio (Strub GM et al, Adv. Exp. Med. Biol 2010). La proliferación anormal y la maduración alterada de los vasos asociados con un estado inflamatorio también se manifiestan en otros trastornos de la coagulación que comprenden la hemofilia A y B, la enfermedad de von Willebrand y la angiodisplasia asociada. La inflamación crónica es común a este fenotipo, al de las células madre cancerosas/tejidos tumorales y otras enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide. En este sentido, los datos obtenidos (insertados en los ejemplos a continuación) muestran que el tratamiento con "anti-EPO" puede bloquear la proliferación endotelial sinovial patológica y reducir la síntesis de los niveles intracelulares de esfingosina-1-fosfato, aumentando los niveles de ceramida, con actividad pro-apoptótica y diferenciativa, y también suprimiendo el estímulo inflamatorio inicial. Por lo tanto, los moduladores negativos de EPO según la presente invención pueden usarse para el tratamiento intraarticular directo en forma de gel o suspensión, en asociación o no con "factores de coagulación y sus derivados" y si es necesario FTY720 y/o moduladores negativos de la vía de la esfingosina-1-fosfato y/o inhibidores de VEGF y receptores. Alternativamente, es posible utilizar los moduladores negativos de EPO para aplicación tópica o sistémica, así como en forma de micropartículas, liposomas, etc.

[0037] Alternativamente, la administración puede lograrse mediante el uso de todas aquellas tecnologías actualmente relacionadas con la terapia génica, o el uso de vectores para la introducción de ácidos nucleicos en las células del paciente. Dicha administración puede realizarse a nivel sistémico, luego por infusión, o a nivel local, con la administración de vectores directamente en el sitio de la lesión, tumor, sinovial, cerebral, etc.

[0038] Un objetivo adicional de la presente invención es una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de glioblastoma multiforme, que comprende un modulador funcional negativo de EPO, de acuerdo con la presente invención, en concentraciones terapéuticamente efectivas y excipientes farmacéuticamente aceptables. Preferiblemente, dicha composición comprende además una cantidad terapéuticamente efectiva de una o más moléculas naturales o sintéticas que actúan sobre los receptores de S1P, y/o sobre el metabolismo de S1P directa o indirectamente, y/o moléculas citotóxicas anticancerígenas y/o antivirales y/o anti-angiogénico. Incluso más preferiblemente, dicha molécula que actúa sobre los receptores de S1P, y / o sobre el metabolismo de S1P directa o indirectamente, es FTY720 o sus análogos. Preferentemente, dicha molécula citotóxica anticancerígena y/o antiviral y/o antiangiogénica se selecciona en el grupo que comprende: paclitaxel, taxol, cicloheximida, carboplatino, clorambucilo, cisplatino, colchicina, ciclofosfamida, daunorubicina, dactinomicina, dietilstubbesicina, doxorubicina, etoposido, 5-fluorouracilo, floxuridina, melfalán, metotrexato, mitomicina, 6-mercaptopurina, tenipósido, 6-tioguanina, vincristina y/o vinblastina, fotemustina, carmustina, sistémicamente irinotecan o por carmustina adsorbido obleas de biopolímeros para la terapia locorregional, temozolomida, tamoxifeno, valganciclovir, ganciclovir, aciclovir, anti-VEGF, anti-VEGFR, anti-HER2 / neu, anti-EGFR, gefitinib, bevacizumab, ranibizumab, vatalanib, Cediranib, Sorafenib, Sunitinib, Motesanib, Axitinib.

Migración, ensayo de invasividad *in vitro*

[0039] Las células SC02 están plateadas en un pozo de doble cámara (Cámara Boyden) separadas por una membrana de silicona. Una vez que se alcanza la confluencia celular, se elimina membrana tabique y se mide el tiempo que tardan las células en invadir el espacio vacío que queda después de la extracción de la membrana tabique. El análisis se basa en el recuento de las células que ocupan este espacio.

[0040] Las células fueron expuestas a los siguientes tratamientos:

- Anticuerpo anti-EPO (H-162) (el medio de cultivo se reemplaza en el momento 0 con medio de cultivo nuevo que contiene anticuerpo anti-EPO).
- Anticuerpo anti-receptor de eritropoyetina (EPOR; el medio de cultivo se reemplaza en el momento 0 con medio de cultivo nuevo que contiene anticuerpo anti-EPOR).
- Control (reemplazo del medio de cultivo en el momento 0 con medio de cultivo nuevo).

[0041] Se observa que el anticuerpo anti-EPO (H-162) puede restablecer el número de células infiltrantes. El anticuerpo anti-EPOR también es capaz, aunque con menos eficacia, de reducir la migración. El análisis de la viabilidad celular muestra que, a las 72 horas después del tratamiento con anti-EPO, solo alrededor del 2% de las células inicialmente en placa todavía están vivas. Al evaluar el nivel de expresión de los factores involucrados en la cascada apoptótica, además del análisis por citometría de flujo después de la tinción con anexina V y yoduro de propidio, se demostró que el tratamiento con anticuerpo anti-EPO podía inducir la muerte celular mediante la activación atreves de la apoptótica.

[0042] La inducción de apoptosis en las células SC02 descritas en este documento, células particularmente resistentes a la apoptosis por las razones descritas anteriormente, muestra que el anti-EPO es sorprendentemente eficaz en la activación de la vía apoptótica.

[0043] Anti-EPO, un péptido que se une a EPO y/o un modulador funcional negativo de los niveles de expresión de EPO ha demostrado ser moléculas eficaces para su uso en el tratamiento de tumores malignos, en particular en el tratamiento del glioblastoma.

Niveles de expresión y liberación de esfingosina-1-fosfato.

[0044] El tratamiento de diferentes tipos de células, tumorales y no tumorales con moduladores funcionales negativos de EPO condujo a una disminución de los niveles de expresión de SK1. Los niveles de SK2, por otro lado, permanecieron sin cambios y, en algunos casos, aumentaron después del mismo tratamiento. Los niveles de S1P intracelular y extracelular disminuyeron constantemente después del tratamiento con moduladores negativos funcionales de EPO.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: ensayo de migración, invasividad in vitro

[0045] Las células SC02 se colocan en placas en una cámara Boyden separada por una membrana de silicona en un medio de crecimiento llamado SCM (medio de células madre) selectivo para el crecimiento de células madre cancerosas. La formulación del medio mencionado anteriormente es la siguiente: DMEM/F-12 a una concentración de 1X, solución de antibióticos/antimicóticos en la proporción de concentración de 1/100, apotransferrina a una concentración de 48.82 µg/mL, Insulina a concentración de 11.5 µg/mL, selenio a una concentración de 2.37 ng/mL, Progesterona a una concentración de 2.88 ng/mL, Putrescina a una concentración de 48.25 µg/mL, Glucosa (33 mM), factor de crecimiento epidérmico (EGF) a una concentración de 10 ng/ml, factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF) a una concentración de 5 ng/ml, L-glutamina a una concentración de 292 µg/ml, bicarbonato de sodio (7.5% peso/vol) (60 µg/ml), Hepes (ácido 4-2-hidroxietil-1-piperazinil-etanosulfónico) a una concentración de 1 M, heparina a una concentración de 2 µg/ml, albúmina de suero bovino (BSA) a una concentración de 1,95 µg/ml y 10 incubados a 37°C, 5% CO₂, 0.1-5% O₂. Una vez que se ha alcanzado la confluencia celular, se elimina el tabique y se mide el tiempo que tardan las células en invadir el espacio vacío que queda después de la extracción del tabique. Las células que ocupan este espacio se cuentan para el análisis necesario. Las células se exponen a los siguientes tratamientos: - anticuerpo anti-EPO (H-162) (en el momento 0, reemplazando el medio de cultivo con medio de cultivo que contiene 3 µg/ml de anticuerpo policlonal anti-EPO (H-162) contra AA 28 -189 del EPO humana).

- Anti-EPOR (M-20) (en el momento 0, reemplazando el medio de cultivo con medio de cultivo que contiene 3 µg/ml de anti-EPOR, anticuerpo policlonal contra un dominio citoplasmático C-terminal de EPOR humana).

- Control (en el momento 0, reemplazo del medio de cultivo).

[0046] En la figura 2 se muestra una fotomicrografía del cultivo en el momento 0. Las Figuras 3 a 7 muestran fotomicrografías en momentos sucesivos, de 72 a 168 h, en la muestra de control y en la muestra tratada con anti-EPO. Las fotografías muestran la migración esperada en las células de control, mientras que el cultivo tratado con anti-EPO no solo no se produce migración, sino que el cultivo celular parece estropearse. Las figuras 8 a 12 muestran fotomicrografías al mismo tiempo, de 72 a 168 h, en la muestra de control y en la muestra tratada con anti-EPOR. El tratamiento con anti-EPOR no puede bloquear la migración, el bloqueo es solo parcial y la viabilidad celular parece en cualquier caso buena.

[0047] La observación se cuantificó contando el número de células infiltrantes en diferentes momentos. Los resultados, que se muestran en el gráfico de la Figura 13, confirman que el cultivo no tratado, después de un tiempo, tiene una migración celular tal como para alcanzar la confluencia, mientras que el tratamiento con anti-EPO bloquea completamente la migración celular. Al exponer el mismo cultivo a anti-EPOR, el bloqueo es solo parcial.

Ejemplo 2: viabilidad celular

[0048] Las células SC02 se sembraron en una placa en el medio SCM como se ha descrito previamente y se expusieron a los siguientes tratamientos:

- Anti-EPO (H-162) (en el momento 0, reemplazando el medio de cultivo con medio de cultivo que contiene 3 µg/ml de anti-EPO, anticuerpo policlonal contra AA 28-189 de EPO humana).

- Anti-EPOR (M-20) (en el momento 0, reemplazando el medio de cultivo con medio de cultivo que contiene 10 µg/ml de anti-EPOR, anticuerpo policlonal contra un dominio citoplasmático C-terminal de EPOR humana).

- 5 - Control (en el momento 0, reemplazo del medio de cultivo).

[0049] Las células se contaron con azul de tripano para verificar la viabilidad celular cada 24 horas después de la exposición a anti-EPO. Los resultados se muestran en el gráfico de la Figura 14. A partir de las 72 horas posteriores al tratamiento, la viabilidad celular es prácticamente nula.

Ejemplo 3: Análisis del ciclo celular.

- 10 **[0050]** El efecto sobre el ciclo celular al tratar el cultivo celular con anticuerpo anti-EPO (H-162) se estimó por citometría de flujo. Las células SC02, 24 horas después del enchapado en un medio SCM muestran el perfil esperado (Figura 15). La exposición durante 24 horas a anti-EPO conduce a la desincronización de todas las fases del ciclo celular, lo que resulta en una reducción drástica y temprana de la proliferación celular en las siguientes horas, causando la detención del crecimiento celular (Figura 16).

- 15 Ejemplo 4: Análisis de los niveles de expresión de factores implicados en la apoptosis.

[0051] Para evaluar el tipo de muerte celular inducida por el tratamiento con anticuerpo anti-EPO, los niveles de expresión de factores clave de la cascada apoptótica se evaluaron mediante Western Blot. Los niveles de expresión de: caspasa 9, caspasa 3, el efector final de la apoptosis, Bax, molécula pro-apoptótica y Bcl2, la molécula anti-apoptótica, se midieron en células SC02 tratadas o no tratadas con anti-EPO (H-162).

- 20 **[0052]** Los niveles de beta-actina se usaron como factor de normalización de la cantidad de proteína cargada. La Figura 17 muestra cómo, en presencia del tratamiento con anti-EPO, los niveles de expresión de la forma activa de caspasa 9 y la forma inactiva de caspasa 9 han aumentado. La cuantificación de las bandas y su normalización muestra, en la Figura 18, una acumulación de aproximadamente 8 veces los niveles de Caspasa 9 activa en las muestras expuestas al tratamiento con anti-EPO en comparación con el control no tratado.

- 25 **[0053]** La Figura 19 muestra cómo, en presencia del tratamiento con anti-EPO, los niveles de expresión de la forma activa de caspasa 3 y la forma inactiva de caspasa 3 han aumentado. La cuantificación de las bandas y su normalización, que se muestra en la Figura 20, muestra una acumulación de aproximadamente 33 veces los niveles de Caspasa 3 inactiva y aproximadamente 4 veces los niveles de caspasa 3 activa en las muestras expuestas al tratamiento con anti-EPO en comparación con el control no tratado.

- 30 **[0054]** Al evaluar los niveles de expresión de Bax y Bcl2, existe, en presencia del tratamiento con anti-EPO, un cambio en la relación Bcl2/Bax a favor de Bax, o en favor de la molécula pro-apoptótica (Figuras 21, 22).

[0055] Los datos obtenidos en este documento demuestran que el tratamiento con anti-EPO es capaz de inducir la muerte celular por apoptosis.

Ejemplo 5: Análisis de anexina V/yoduro de propidio por citometría de flujo

- 35 **[0056]** Para confirmar el hecho de que la exposición a anti-EPO es capaz de inducir una muerte celular de tipo apoptótico, las células se evaluaron mediante citometría de flujo con tinción con anexina V y yoduro de propidio. Las células anexinas V-FITC negativas y las células PI negativas son células no apoptóticas, las células anexinas V-FITC negativas y las células PI negativas son células en una etapa temprana de apoptosis. Las células anexinas V-FITC negativas y las células PI negativas son células en una etapa tardía de apoptosis, las células anexinas V-FITC negativas y las células PI negativas son células en necrosis. A las 48 horas posteriores al inicio del tratamiento, figura 23, se encuentran varias células en la fase inicial de apoptosis, mientras que, a las 96 horas del tratamiento, la mayoría de las células (alrededor del 75%) están en apoptosis tardía. La proporción de células en la necrosis siempre es limitada. Esto confirma que anti-EPO induce la muerte celular apoptótica.
- 40

Ejemplo 6: Análisis de la expresión de PCNA (Antígeno nuclear de células en proliferación).

- 45 **[0057]** Las células se analizaron para la expresión de la proteína PCNA, índice de proliferación celular, como se muestra en la Figura 24.

[0058] El análisis de citometría de flujo de la expresión de la proteína PCNA indica que las células de glioblastoma no tratadas (CTR) tienen una alta expresión de la proteína, identificable por el diagrama de puntos del control de la población celular. Después de 48 horas de tratamiento con anti-EPO, se midió una disminución de la positividad de las células que expresan PCNA, detectable por una disminución en la intensidad de fluorescencia expresada por el gráfico de puntos. Esta tendencia es claramente mayor a las 72 horas de tratamiento.

50

Ejemplo 7: Análisis de los niveles de expresión de esfingosina quinasa 1 (SK1) y esfingosina quinasa 2 (SK2).

[0059] En las células SC02 tratadas o no tratadas con anti-EPO (H-162), se midieron los niveles de expresión de SK1 y SK2. Los niveles de beta-actina se usaron como factor de normalización de la cantidad de proteína cargada. El análisis se

realizó en el lisado de proteínas obtenido después de 48 horas del tratamiento. Para la detección, se utilizaron anticuerpos desarrollados en conejo anti SK1 y anti SK2 por Abcam (Cambridge, Reino Unido).

[0060] La Figura 25 muestra los niveles de expresión de SK1 en células de glioblastoma tratadas como sigue:

FTY = FTY720, 1 μ M

5 SKI = inhibidor de la esfingosina quinasa, 2 μ M

S1P = esfingosina-1-fosfato, 200 nM

FTY5 = FTY720, 5 μ M

CTRL = células GSC cultivadas durante 48 horas sin ningún tratamiento anti-EPO = células GSC tratadas con anticuerpo anti-EPO

10 **[0061]** Todos los tratamientos se realizaron durante 48 horas en cultivo antes de obtener la proteína lisada. Los datos obtenidos muestran que, en presencia del tratamiento con anti-EPO, los niveles de expresión de SK1 disminuyeron significativamente.

[0062] La Figura 26 muestra cómo, en presencia del tratamiento con anti-EPO, los niveles de expresión de SK2 permanecen sin cambios.

15 **[0063]** Las células fueron tratadas de la siguiente manera:

FTY1 = FTY720, 1 μ M

SKI = inhibidor de la esfingosina quinasa, 2 μ M

S1P = esfingosina-1-fosfato, 200 nM

FTY5 = FTY720, 5 μ M

20 CTRL = células GSC cultivadas durante 48 horas sin ningún tratamiento

anti-EPO = células GSC tratadas con anticuerpo anti-EPO

[0064] Todos los tratamientos se realizaron durante 48 horas en cultivo antes de obtener la proteína lisada. La inhibición observada de la conversión de esfingosina a esfingosina-1-fosfato, desplaza el equilibrio hacia la conversión de esfingosina a ceramida a través de la N-acilación en lugar de la fosforilación.

25 Ejemplo 8: Análisis de los niveles intracelulares y extracelulares de esfingosina-1-fosfato (S1P)

[0065] Se añadió esfingosina-1-fosfato tritado a una concentración de 200 nM durante 48 horas y se trató cada 24 horas con células madre de glioblastoma en dos condiciones: 1) con tratamiento anti-EPO 2) sin tratamiento adicional (CTR). Los niveles de esfingosina-1-fosfato intracelular después de 48 horas se redujeron en un 38% cuando las células se trataron con anti-EPO (Figura 27, columna negra intracelular). La esfingosina-1-fosfato extracelular después de 48 horas se redujo en un 55% después del tratamiento con anti-EPO en comparación con el control (Figura 27, columna negra extracelular). Estos datos indican que las células de glioblastoma pueden liberar esfingosina-1-fosfato en el entorno extracelular y dicha liberación extracelular se reduce a la mitad en presencia de tratamiento con anti-EPO.

Ejemplo 9: Análisis del efecto del tratamiento con anti-EPO y EPO-ARNip sobre la viabilidad celular de una línea comercial de microglía después del estímulo inflamatorio.

35 **[0066]** La Figura 28 muestra la viabilidad celular de una línea de microglía comercial (línea N9).

[0067] Se cultivaron células N9 en el medio de Dulbecco modificado por Iscove MEM (IMDM) que contenía 1x estreptomycin/penicilina y L-glutamina 2 mM, suplementado con FBS (suero fetal bovino) al 5%.

40 **[0068]** Las células se colocaron en placas a una concentración de 1.5×10^4 células/cm² y se mantuvieron en una incubadora termostática a 37°C, con 5% de CO₂, durante 24 horas. Al día siguiente, las células fueron expuestas a diferentes tratamientos durante 24 y 48 horas. Al final de los tratamientos, se evaluó la viabilidad celular mediante tinción con azul de tripano.

[0069] La microglía se mantuvo en un medio de cultivo base y luego se activó con lipopolisacárido (LPS), una molécula presente en la membrana de las bacterias Gram negativas.

45 **[0070]** Además, para estudiar el papel del producto "anti-EPO" en la inhibición de la neuroinflamación y luego en la inhibición de la activación de la microglía, se administró el anticuerpo según el esquema siguiente, en asociación y no con LPS, para activar la microglía. De manera similar al tratamiento con anti-EPO, se combinó una condición de tratamiento de microglía activada con ARNip, usando la técnica de silenciamiento génico por interferencia de ARN. Esta técnica permite una reducción de hasta el 90% de la expresión de una proteína de interés. La célula en la que se requiere el silenciamiento de una proteína específica se transfecta con moléculas de ARN bicatenario que contiene la secuencia de aproximadamente 50 pb llamada ARN interferente pequeño (ARNip).

[0071] Las células fueron expuestas a los siguientes tratamientos:

- Control, CTR, (reemplazo del medio de cultivo en el tiempo 0 con medio de cultivo nuevo);
- LPS, lipopolisacárido, a una concentración de 3 µg/ml;
- Anticuerpo anti-EPO (H-162) (el medio de cultivo se reemplaza en el momento 0 con medio de cultivo nuevo que contiene anticuerpo anti-EPO);

- 5 - LPS + anti-EPO (en el momento 0 las células se sembraron en placa en medio de cultivo, se activaron con LPS a una concentración de 3 µg/ml y se trataron con anticuerpo anti-EPO (H-162);
- LPS + EPO-ARNip (en el momento 0 el medio de cultivo se reemplazó con medio de cultivo nuevo para la transfección con EPO-ARNip). Las células se cultivaron durante 24 horas en un medio de cultivo sin antibióticos. Los ARNip (Santa Cruz, catálogo no. Sc-37220) se prepararon diluyendo hasta la concentración final directamente en el medio de cultivo e incubando a temperatura ambiente durante 30 minutos. La solución se añadió luego a las células previamente lavadas con 1 ml de medio para la transfección. Las células se incubaron durante 7 horas y luego se añadió 1 ml de medio nuevo que contenía una cantidad doble de FBS y antibióticos. Las células se trataron directamente en el medio de cultivo con LPS a una concentración de 3 µg/ml y se incubaron durante las siguientes 24 y 48 horas.

- 10
- 15 **[0072]** Sorprendentemente, se observa que los tratamientos con anti-EPO y EPO-ARNip no son tóxicos para las células de microglía quiescente. La N9, de hecho, después de 48 horas de cultivo con diferentes tratamientos conserva una viabilidad superior al 85% y este porcentaje es mayor después de 24 horas de tratamiento.

Ejemplo 10: Análisis del efecto del tratamiento con migración anti-EPO y EPO-ARNip de una línea comercial de microglía después del estímulo inflamatorio

- 20 **[0073]** La Figura 29 muestra la capacidad del tratamiento con anti-EPO y EPO-ARNip para inhibir la migración de la N9. El ensayo de migración o "ensayo de quimiotaxis" se llevó a cabo para resaltar la capacidad migratoria de la N9, un fenómeno que se observa en respuesta a un estímulo inflamatorio. Para este propósito, se utilizaron placas multipocillos (24 pocillos) equipadas con insertos con una membrana de policarbonato. Los agujeros en la membrana de un diámetro de 8 µm son capaces de retener las células y el medio de cultivo, pero permiten que la transmigración activa de las células a través de la membrana llegue al pozo inferior.

- 25 **[0074]** La N9 normal y la N9 tratadas/transfectadas con EPO-ARNip se diseminaron en el inserto superior.

- [0075]** En los compartimentos inferiores, se añadieron LPS a una concentración de 3 µg/ml en suelo IMDM, y/o en combinación con anti-EPO según con el esquema elaborado. Después de 24 horas, se retiraron los insertos y las células presentes en el compartimento inferior se tiñeron con calceína AM. La visualización de las células se realizó mediante microscopía de fluorescencia con un objetivo 4x y las imágenes se analizaron con el software ImageJ. Los ensayos de migración muestran cómo las células N9 son quimioatraídas por el estímulo con LPS y que este efecto se reduce significativamente cuando se agrega al medio del compartimento inferior el anticuerpo anti-EPO y, aunque en menor medida, cuando las células se transfectan con EPO-ARNip. Por lo tanto, se puede concluir que el tratamiento "anti-EPO" no interfiere con las células de microglía quiescentes, sino que bloquea la activación y migración de las mismas, como resultado de un poderoso estímulo inflamatorio. El tratamiento con ARNip tiene efectos positivos, aunque se observan mayores efectos beneficiosos con el anticuerpo "anti-EPO". Por lo tanto, como ya se vio en el uso del anticuerpo anti-EPOR, donde incluso en ese caso hubo efectos positivos pero parciales en comparación con lo que se encontró después de usar anti-EPO policlonal anti AA. 28-189, se puede suponer que el objetivo de esta molécula no es solo capturar y reducir los niveles de EPO impidiendo la unión al receptor, sino que dentro de la mezcla hay moléculas con acción independiente farmacológicamente activa, o que la EPO modula las funciones mostradas en los experimentos, no solo a través del su enlace al receptor.

Ejemplo 11: Análisis con tinción con hematoxilina y eosina del efecto del tratamiento con migración anti-EPO y EPO-ARNip de una línea comercial de microglía después del estímulo inflamatorio

- 45 **[0076]** La Figura 30 muestra el análisis de la membrana de las placas multipocillos utilizadas para el ensayo de quimiotaxis después de la tinción con hematoxilina y eosina. Los septos se retiraron del soporte, se volcaron, se colocaron sobre un objeto de soporte de vidrio y se tiñeron con hematoxilina y eosina para resaltar las células que habían migrado a través de la membrana. Posteriormente, se adquirieron 4 imágenes de microscopio EVOS con objetivo 4x. El análisis de las imágenes mostró un incremento en el número de células que habían pasado a través de la membrana en presencia de LPS en el pozo inferior. Sorprendentemente, cuando se añadió "anti-EPO" al pozo inferior, el número de células migratorias se redujo significativamente a valores comparables al control de microglía inactivado. Del análisis cualitativo, los septos procesados por el CTR y las condiciones "anti-EPO" tienen una marca casi idéntica.

Ejemplo 12: Análisis del efecto del tratamiento con anti-EPO individualmente y en combinación con FTY720 sobre la proliferación de una línea comercial de microglía

[0077] Se sembraron células microgliales N9 en placas de pocillos múltiples a una concentración de $1,5 \times 10^4$ durante 24 horas. Al día siguiente, las células recibieron los siguientes tratamientos durante 24 horas:

- 55 - LPS
- Anticuerpo anti-EPO administrado solo;
 - Anticuerpo anti-EPO en combinación con LPS.

[0078] Las células N9 se separaron con enzima, y una alícuota de volumen conocido se marcó con azul de tripano y se observó bajo el microscopio para contar. Considerando que el número de células en el control de cultivo es de 100, sin ningún tratamiento, se calculó el porcentaje de proliferación de las N9 cultivadas en presencia de LPS, anticuerpo anti-EPO, combinación de LPS y anticuerpo anti-EPO. Los datos muestran (Figura 31) que el estímulo LPS aumenta notablemente la proliferación celular en respuesta al estímulo inflamatorio y, por el contrario el tratamiento con anti-EPO, es capaz de detener la proliferación de microglía después de un estímulo inflamatorio, manteniendo la microglía en un estado de reposo, previniendo la cascada inflamatoria descendente, como la liberación de citocinas inflamatorias, muerte de células nerviosas e inflamación crónica. Sorprendentemente, se observó que incluso después de la activación de la microglía con LPS, el resultado final es un arresto de la proliferación con valores comparables a los de la microglía quiescente. A partir de un análisis morfológico de las N9 después de la estimulación con LPS, se observa un cambio de microglía a partir de una morfología ramificada, típica del estado de reposo, adquiere morfología ameboidea, índice de actividad fagocítica. Asombrosamente la microglía, después del tratamiento con células "anti-EPO" recupera o mantiene una morfología ramificada, así como después de haber sido trasfectada con EPO-ARNip. Este resultado enfatiza aún más el efecto que tiene el anticuerpo anti-EPO contra la neuroinflamación, a saber, el de detener la proliferación de la microglía no cuando está en un estado de reposo sino más bien cuando se activa.

Ejemplo 13: Análisis del efecto del tratamiento sobre el número de células infiltrantes de una línea comercial de adenocarcinoma de colon, Caco-2

[0079] Las células Caco-2, células de adenocarcinoma de colon, se siembran en una cámara Boyden separada por un tabique de silicona. Una vez que se alcanza la confluencia celular, se elimina el tabique y se mide el tiempo que tardan las células en invadir el espacio vacío que queda después de la extracción del tabique. Las células que ocupan este espacio se cuentan para el análisis necesario.

[0080] Las células fueron expuestas a los siguientes tratamientos:

- Anticuerpo anti-EPO (H-162) (el medio de cultivo se reemplaza en el momento 0 con medio de cultivo nuevo que contiene anticuerpo anti-EPO).
- Anticuerpo receptor de anti-eritropoyetina (EPOR; el medio de cultivo se reemplaza en el momento 0 con medio de cultivo nuevo que contiene anticuerpo anti-EPOR a una concentración de 3 µg/ml).
- Control (reemplazo del medio de cultivo en el momento 0 con medio de cultivo nuevo).

[0081] Se observa (Figura 32) que el anticuerpo anti-EPO (H-162) puede restablecer el número de células infiltrantes. El anticuerpo anti-EPOR también es capaz, aunque con menos eficacia, de disminuir la migración, confirmando una vez más la eficacia superior de la mezcla de anticuerpos anti-EPO (H-162) en relación con el bloque de EPO, lo que indica que la acción terapéutica también incluye diferentes mecanismos además de la modulación negativa de EPO al bloquear su receptor.

Ejemplo 14: Análisis del efecto del tratamiento sobre la viabilidad de una línea comercial de adenocarcinoma de colon, Caco-2

[0082] El análisis de la viabilidad celular de Caco-2 muestra que a las 24 horas después del tratamiento con anti-EPO, solo aproximadamente el 40% de las células inicialmente en placa todavía están vivas y este porcentaje disminuye aún más a las 48 horas de tratamiento (Figura 33). Cuando las células Caco-2 se tratan con el anticuerpo EPOR, la proliferación celular disminuye en comparación con el control, aunque, en este caso también, en menor medida en comparación con el tratamiento con el anticuerpo anti-EPO. El tratamiento con EPO-ARNip muestra que a las 24 horas solo el 60% de las células siguen vivas y este porcentaje disminuye a las 48 horas. Por lo tanto, se obtienen resultados positivos con diferentes moduladores negativos de EPO (anti-EPOR, ARNip), pero una vez más, los mejores efectos se logran usando el anticuerpo policlonal anti AA 28-189 anti-EPO.

Ejemplo 15: Análisis del efecto del tratamiento sobre varias células infiltrantes de una línea comercial de cáncer de pulmón de células no pequeñas, A549

[0083] Las células A549, línea celular de cáncer de pulmón de células no pequeñas, se siembran en una cámara Boyden separada por un tabique de silicona. Una vez que se alcanza la confluencia celular, se elimina el tabique y se mide el tiempo que tardan las células en invadir el espacio vacío que queda después de la extracción del tabique. Las células que ocupan este espacio se cuentan para el análisis necesario.

[0084] Las células fueron expuestas a los siguientes tratamientos:

- Control (reemplazo del medio de cultivo en el momento 0 con medio de cultivo nuevo);
- Anticuerpo anti-EPO (H-162) (el medio de cultivo se reemplaza en el momento 0 con medio de cultivo nuevo que contiene anticuerpo anti-EPO);
- Receptor anti-eritropoyetina (EPOR; el medio de cultivo se reemplaza en el momento 0 con medio de cultivo nuevo que contiene anticuerpo anti-EPOR).

[0085] Se observa (Figura 34) que el anticuerpo anti-EPO (H-162) puede disminuir significativamente el número de células infiltrantes. El anticuerpo anti-EPOR también es capaz, aunque con menos eficacia, de reducir la migración.

Ejemplo 16: Análisis del efecto del tratamiento sobre la viabilidad de una línea comercial de cáncer de pulmón de células no pequeñas, A549

5 **[0086]** El análisis de la viabilidad de la célula A549 muestra que a las 24 horas después del tratamiento con anti-EPO, solo aproximadamente el 45% de las células inicialmente en placa todavía están vivas y este porcentaje disminuye ulteriormente a las 48 horas de tratamiento. Cuando las células A549 se tratan con el anticuerpo anti-EPOR, la proliferación celular disminuye en comparación con el control, aunque menos en comparación con el tratamiento con el anticuerpo anti-EPO. El tratamiento con EPO-ARNip muestra que a las 24 horas solo el 60% de las células aún están vivas y este porcentaje disminuye a las 48 horas (Figura 35).

Ejemplo 17: Análisis de los tratamientos sobre la viabilidad celular de las células del glioblastoma SC02.

10 **[0087]** Las Figuras 36 y 37 muestran el análisis de la viabilidad celular de las células madre de glioblastoma sometidas a los siguientes tratamientos, respectivamente, durante 48 y 72 horas:

- Control (reemplazo del medio de cultivo en el momento 0 con medio de cultivo nuevo);
- Administración de esfingosina-1-fosfato (S1P), 200 nM como estímulo para la supervivencia y la proliferación (control positivo);
- 15 - Administración de Temozolomide (TMZ), el medio de cultivo se reemplaza en el momento 0 con medio de cultivo nuevo que contiene TMZ a una concentración de 100 μ M;
- Anticuerpo anti-EPO (H-162) (el medio de cultivo se reemplaza en el momento 0 con medio de cultivo nuevo que contiene anticuerpo anti-EPO a una concentración de 3 μ g / ml);
- Administración de FTY720. El medio de cultivo se reemplaza en el tiempo 0 con medio de cultivo nuevo que contiene FTY720 a una concentración de 1 μ M;
- 20 - Administración combinada de anti-EPO y FTY720 (el medio de cultivo se reemplaza en el momento 0 con medio de cultivo nuevo que contiene anticuerpo anti-EPO y FTY720);
- Administración combinada de anti-EPO y temozolomide (el medio de cultivo se reemplaza en el momento 0 con medio de cultivo nuevo que contiene anticuerpo anti-EPO y TMZ);
- 25 - Administración conjunta de anti EPO, FTY720 y TMZ.

[0088] Anti-EPO, un péptido que se une a EPO y/o un modulador funcional negativo de los niveles de expresión de EPO, demuestran ser moléculas efectivas para su uso en el tratamiento de tumores malignos. El tratamiento anti-EPO, en combinación con FTY720 es mejorado y sinérgico, también el tratamiento anti-EPO en combinación con TMZ (agente alquilante utilizado en el tratamiento de tumores neurológicos, a los que las células madre cancerosas son normalmente resistentes) hace que las células madre neoplásicas sean nuevamente sensibles a la temozolomide (las células madre del glioblastoma y otros cánceres son resistentes a la radio y quimioterapia, con el agente alquilante TMZ).

Ejemplo 18: Análisis de los tratamientos con anti-EPO individualmente y en combinación con FTY720 en células endoteliales aisladas de la membrana sinovial de pacientes hemofílicos.

35 **[0089]** La Figura 38 muestra el análisis de la viabilidad celular de las células endoteliales aisladas de la sinovial de pacientes con hemofilia con casos moderados/severos de la enfermedad. Las células endoteliales se cultivaron en medio de cultivo apropiado y se sometieron a los siguientes tratamientos:

- Control (CTR), reemplazo del medio de cultivo en el tiempo 0 con medio de cultivo nuevo.
- Administración de anti-EPO, reemplazo del medio de cultivo en el momento 0 con medio de cultivo nuevo que contiene anti-EPO a una concentración de 3 μ g/ml.
- 40 - Administración de anti-EPO en combinación con FTY720, reemplazo del medio de cultivo en el momento 0 con medio de cultivo nuevo que contiene anti-EPO a una concentración de 3 μ g/ml y FTY720 (1 μ M).

[0090] Cuando las células endoteliales se tratan con el anticuerpo anti-EPO, la proliferación celular disminuye significativamente en comparación con el CTR placebo, donde las células se mantienen en su medio de cultivo. Además, el tratamiento combinado con anti-EPO y FTY720 reduce aún más la supervivencia de las células endoteliales sinoviales de pacientes con hemofilia.

Ejemplo 19: Análisis de los tratamientos con anti-EPO individualmente y en combinación con FTY720 en células endoteliales aisladas de sinovial de controles sanos y de pacientes con hemofilia.

50 **[0091]** Como se muestra en la Figura 39, el tratamiento con anticuerpos anti-EPO disminuye significativamente la proliferación de células endoteliales de la sinovial de pacientes con hemofilia en comparación con la proliferación de células endoteliales aisladas de la sinovial de sujetos de control sanos (SANO).

[0092] Se observa que el tratamiento con anti-EPO y la combinación de este último con el inhibidor de S1P, FTY720, son efectivos para reducir la viabilidad celular de las células endoteliales de la membrana sinovial patológica.

Ejemplo 20: Análisis de los niveles intracelulares de ceramida y esfingosina-1-fosfato en las células endoteliales de sinovial tomadas de controles sanos y pacientes patológicos.

[0093] Nuestros estudios recientes sobre el aislamiento de células endoteliales de pacientes con sinovial de hemofilia por primera vez demostraron, sorprendentemente, un aumento de la angiogénesis con estabilización reducida y maduración de los vasos (tipo tumor) a nivel sinovial, especialmente en comparación con sus respectivos controles. Las muestras patológicas también mostraron un marcado aumento en los niveles de S1P intracelular, capaz de promover la angiogénesis patológica y dar lugar a un fenómeno inflamatorio intrínseco que luego involucra toda la articulación y que es común tanto a la artropatía hemofílica como a la artritis reumatoide. Para los fines de la presente invención, se han aislado y caracterizado las células endoteliales de biopsias sinoviales de 3 sujetos sanos y 5 pacientes con hemofilia con patologías moderadas/graves (Figuras 40-41). Las células endoteliales se han utilizado para estudiar el metabolismo de los esfingolípidos, en particular la esfingosina-1-fosfato y la ceramida, mediante la administración de un precursor radiomarcado de S1P y ceramida. Se observó (Figura 41) que las células endoteliales de sinovial tomadas de pacientes patológicos tenían niveles intracelulares altos de S1P (los niveles intracelulares altos de S1P contribuyen a la angiogénesis y desencadenan un proceso inflamatorio intrínseco) y niveles más bajos de ceramida (para pro acción apoptótica y diferenciación hacia un fenotipo celular más maduro) (Figura 40). El tratamiento con anti-EPO incrementó, extraordinariamente los niveles de ceramida dentro de las células endoteliales de la membrana sinovial patológica, que tiene una función pro-apoptótica. De hecho, los niveles de ceramida aumentan hasta llegar a un valor similar al de los sujetos sanos, y luego a un estado fisiológico, que muestra niveles intracelulares de S1P de valores comparables a los de las células endoteliales sinoviales de sujetos sanos. Por lo tanto, es posible contemplar el uso del anticuerpo anti-EPO, como en el tratamiento intraarticular directo en forma de gel o suspensión, en asociación o no con "factores de coagulación y sus derivados" y que también comprende FTY720 y moduladores negativos de la vía esfingosina-1-fosfato.

Ejemplo 21: Análisis con el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de los niveles de VEGF presentes en los medios condicionados de células endoteliales aisladas de la membrana sinovial de controles sanos y pacientes con hemofilia

[0094] La Figura 42 muestra los resultados obtenidos por ensayo inmuno enzimático Quantikine® ELISA para VEGF (R&D System, cod. DVE00) sobre los sobrenadantes de cultivos de células endoteliales aislados de sinovial de sujetos control y pacientes con hemofilia. Las células se colocaron en placas a una concentración de 3×10^4 células/cm² durante 24 horas a 37°C y 5% de CO₂. Después de la incubación, los sobrenadantes acondicionados se recogieron, se centrifugaron y se congelaron para su análisis. Los resultados, sorprendentemente, muestran una mayor liberación en los niveles de VEGF por las células endoteliales de pacientes con hemofilia de aproximadamente el doble (932 ± 100 pg/ml) con respecto a los sujetos de control (545 ± 115 pg/ml). De esto se deduce que, en la artropatía hemofílica, junto con un componente inflamatorio, el proceso angiogénico juega un papel crucial y relevante en el desarrollo de la condición patológica. Por lo tanto, las terapias que interfieren con la angiogénesis y el proceso inflamatorio inherente que se produce, pueden interrumpir el círculo vicioso de sinovitis-sangrado-inflamación.

REIVINDICACIONES

1. Moduladores funcionales negativos de la eritropoyetina (EPO) para su uso en el tratamiento del glioblastoma multiforme, donde dichos moduladores son moléculas que se unen a la EPO seleccionada del grupo que consiste en:
 - (i) anticuerpos anti-EPO, que reconocen y se unen al AA 28-189 de la EPO humana (SEC ID N.º 2);
 - 5 (ii) anticuerpos anti-receptor de EPO (EPOR) que reconocen la porción citoplasmática C-terminal de EPOR; y
 - (iii) péptidos o péptidos miméticos que reconocen y se unen al AA 28-189 de la EPO humana.
2. Moduladores funcionales negativos de la EPO para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho modulador es un anticuerpo policlonal anti-EPO o es una inmunoglobulina monoclonal purificada específica, preferiblemente diseñada o humanizada, contenida en dicha mezcla de anticuerpo policlonal anti-EPO, o es un péptido purificado de
 10 dicha mezcla de anticuerpo policlonal anti-EPO por escisión proteolítica de una o más de las inmunoglobulinas de la misma mezcla.
3. Moduladores funcionales negativos de la EPO para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde dichos moduladores son péptidos o anticuerpos que tienen un efecto sobre la modulación de la esfingosina-1-fosfato (S1P).
4. Composición farmacéutica terapéuticamente efectiva para su uso en el tratamiento del glioblastoma multiforme, que comprende uno o más de los compuestos según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y excipientes
 15 farmacéuticamente aceptables.
5. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, comprendiendo además una cantidad terapéuticamente efectiva de una o más moléculas naturales o sintéticas que actúan sobre los receptores de S1P, y/o sobre el metabolismo de S1P directa o indirectamente, y/o moléculas antiblásticas-citotóxicas y/o antivirales, y/o
 20 moléculas antiangiogénicas, y/o agentes inmunoterapéuticos, donde dicha molécula que actúa sobre los receptores S1P, y/o sobre el metabolismo de S1P directa o indirectamente, es FTY720 o sus análogos.
6. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, donde FTY720 se administra en combinación con anti-EPO y/o anti-EPOR o derivados de péptidos y una o más moléculas seleccionadas de antagonistas de S1P que comprenden FTY720-P, SW-2871, VPC24191, AUY954, SEW2871 (5-[4-fenil-5-(trifluorometil)-
 25 2-tienil]-3- [trifluorometil]fenil]-1,2,4-oxadiazol), VPC23153, DS-GS- 44, VPC01091.
7. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, formulada como comprimidos, polvo, gránulos, cápsulas, agentes líquidos, inyecciones, supositorios o agentes de liberación lenta generalmente usados para la producción de preparación farmacéutica, donde dicha composición farmacéutica se administra preferiblemente oral o
 30 parenteralmente: preferiblemente, tópicamente, rectalmente, intravenosamente, subcutáneamente, intramuscularmente, intranasalmente, intravaginalmente, a través de la mucosa oral, la mucosa pulmonar o mediante administración transocular, o mediante la incorporación a liposomas o mediante el direccionamiento funcional de objetivos o compartimentos específicos, uniéndose a portadores moleculares o en combinación con moléculas que permiten la apertura temporal de la barrera hematoencefálica, moléculas antiinflamatorias, anticuerpos monoclonales o fármacos con actividad inmunosupresora.

Fig. 1

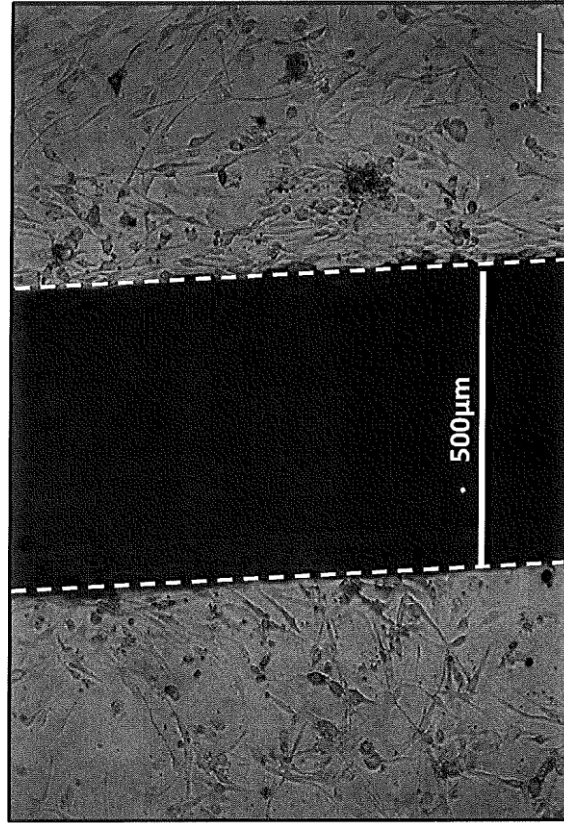
SEC. 2

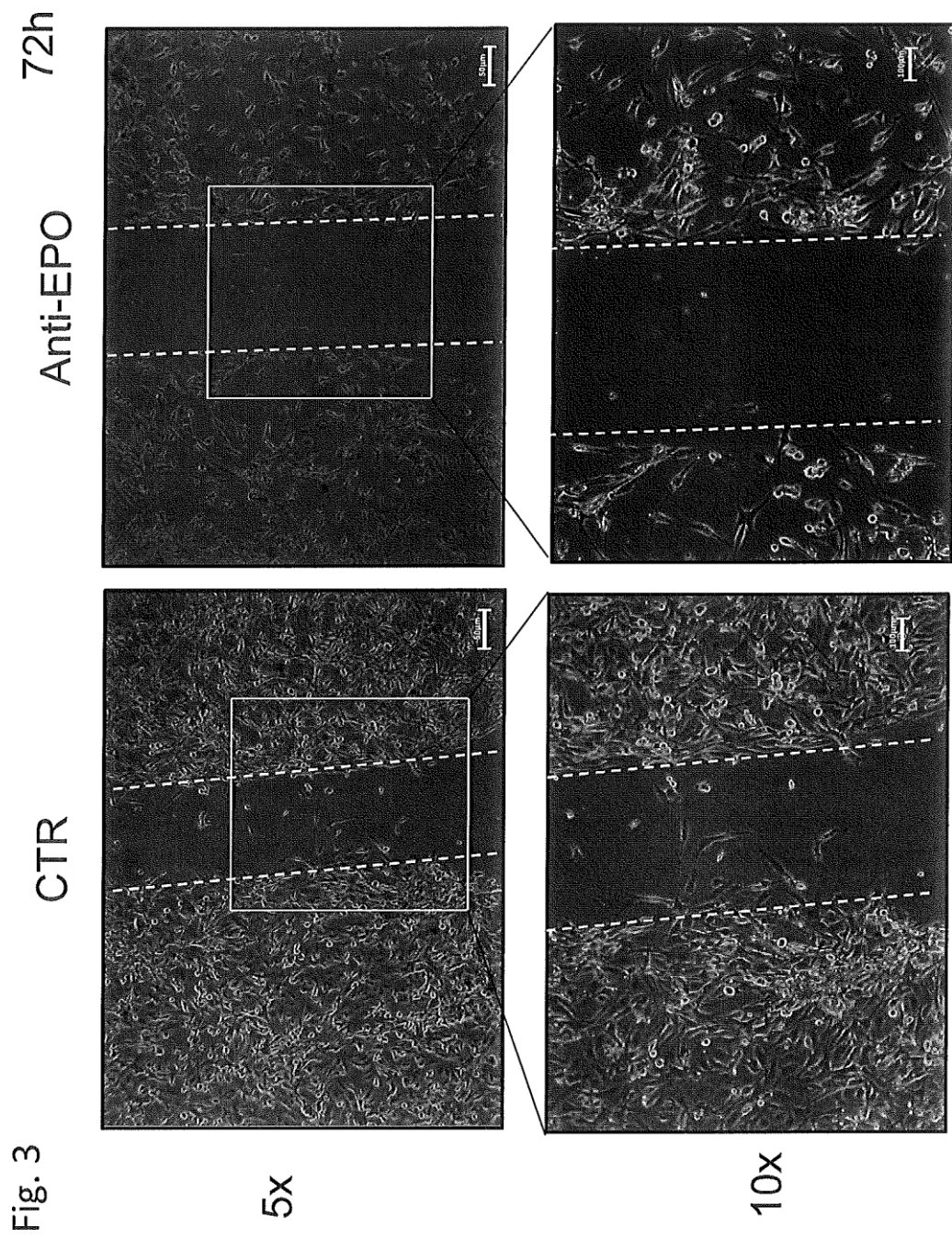
28 app rlicdsrvle rylleakeae nittgcaehc
61 slnenitvpd tkvnfyawkr mevgqqavev wqglallsea vlrqqallvn ssqpweplql
121 hvdkavsglr sltllralg aqeaisppda asaaplr tit adtfrklfrv ysnflrgklk
181 lytgeacrtgdr

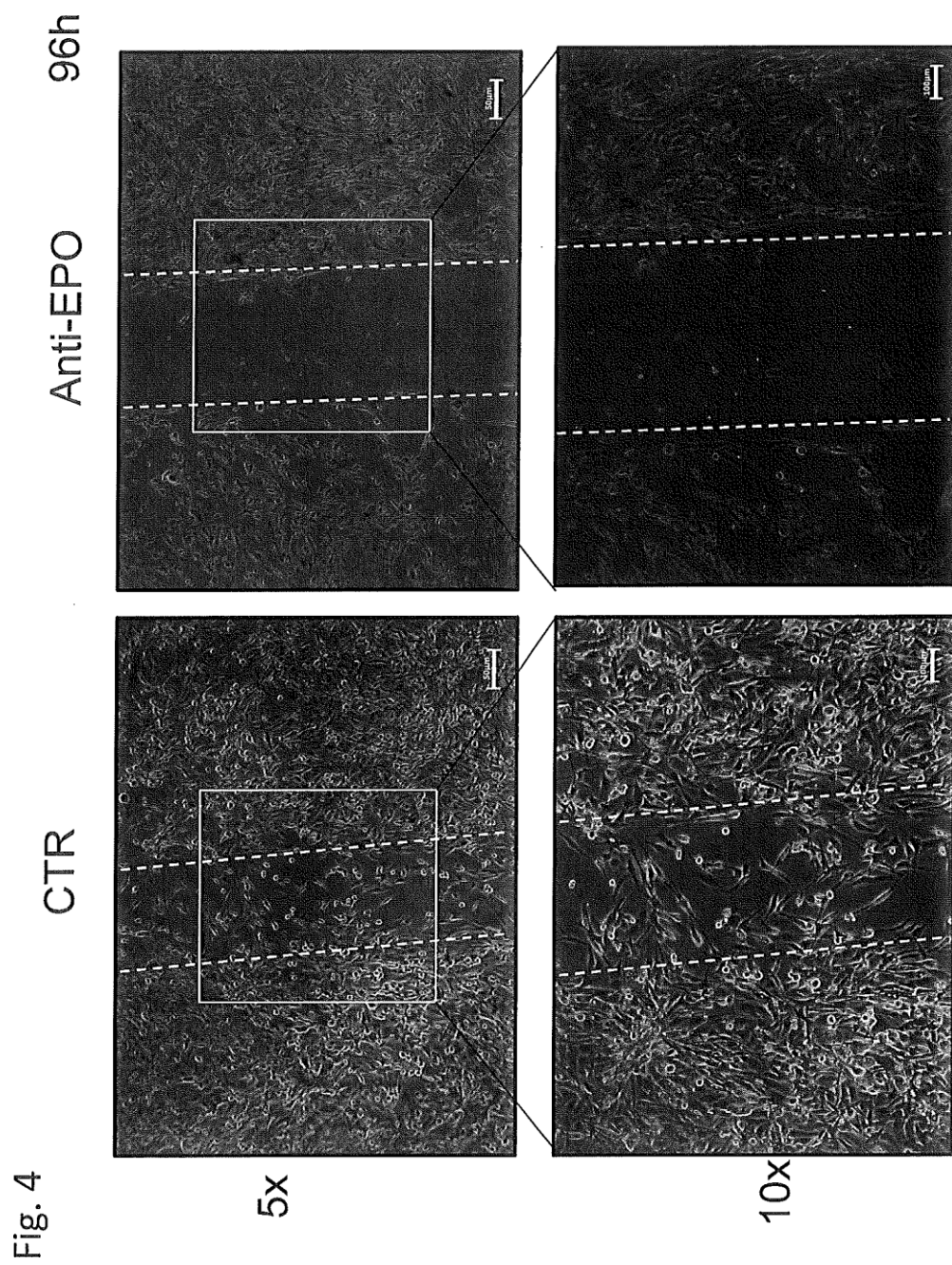
Ensayo de invasión

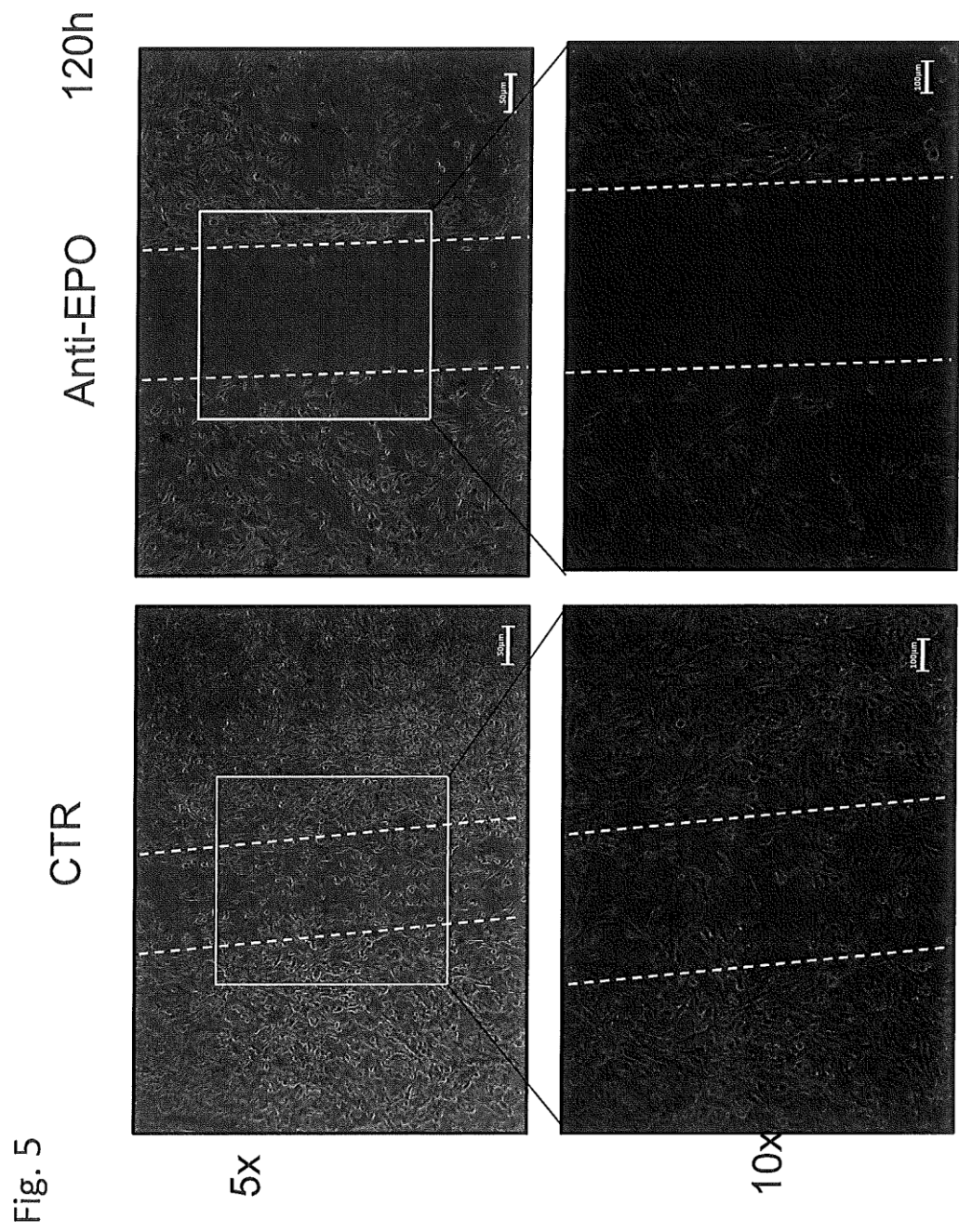
Fig. 2

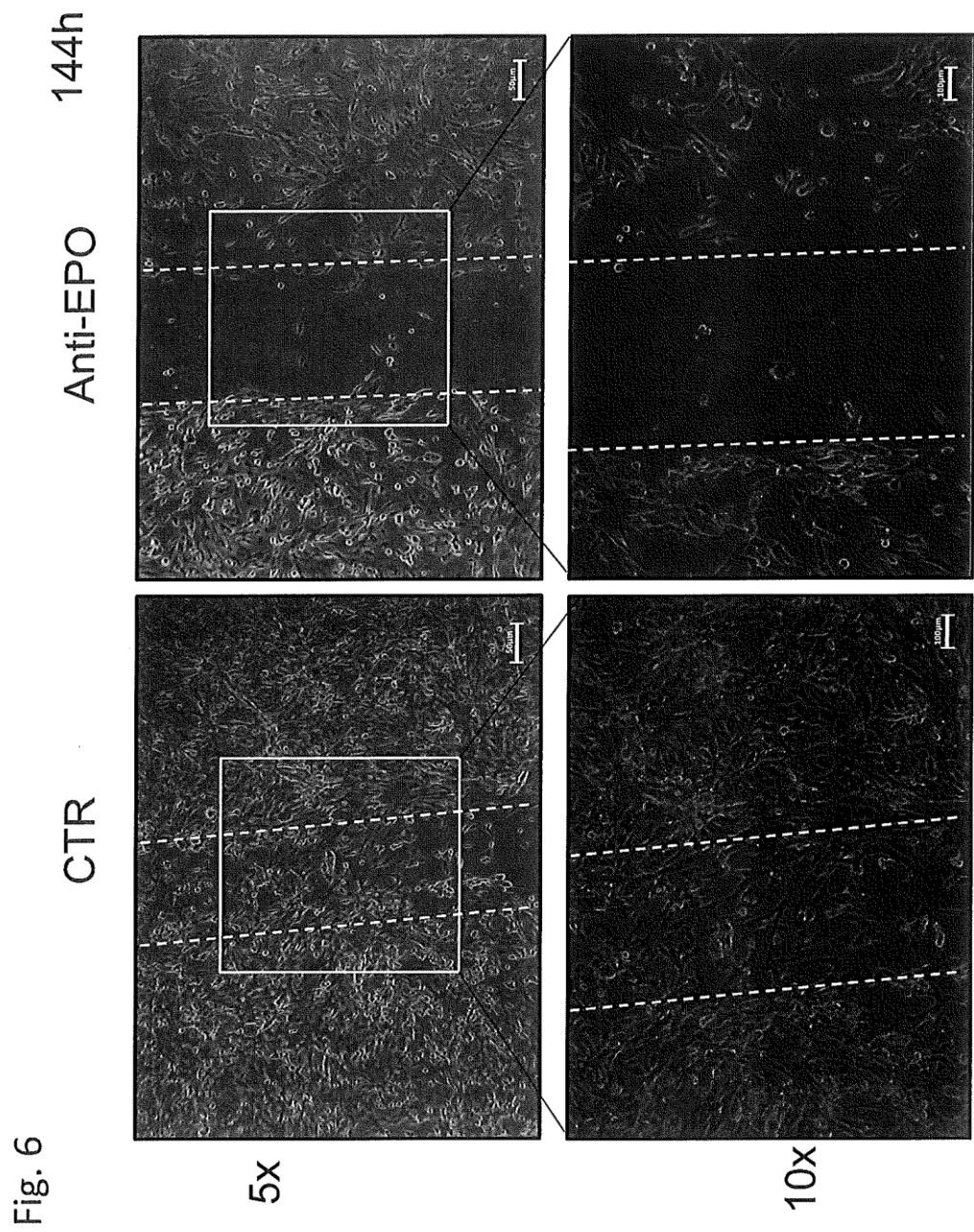
T0

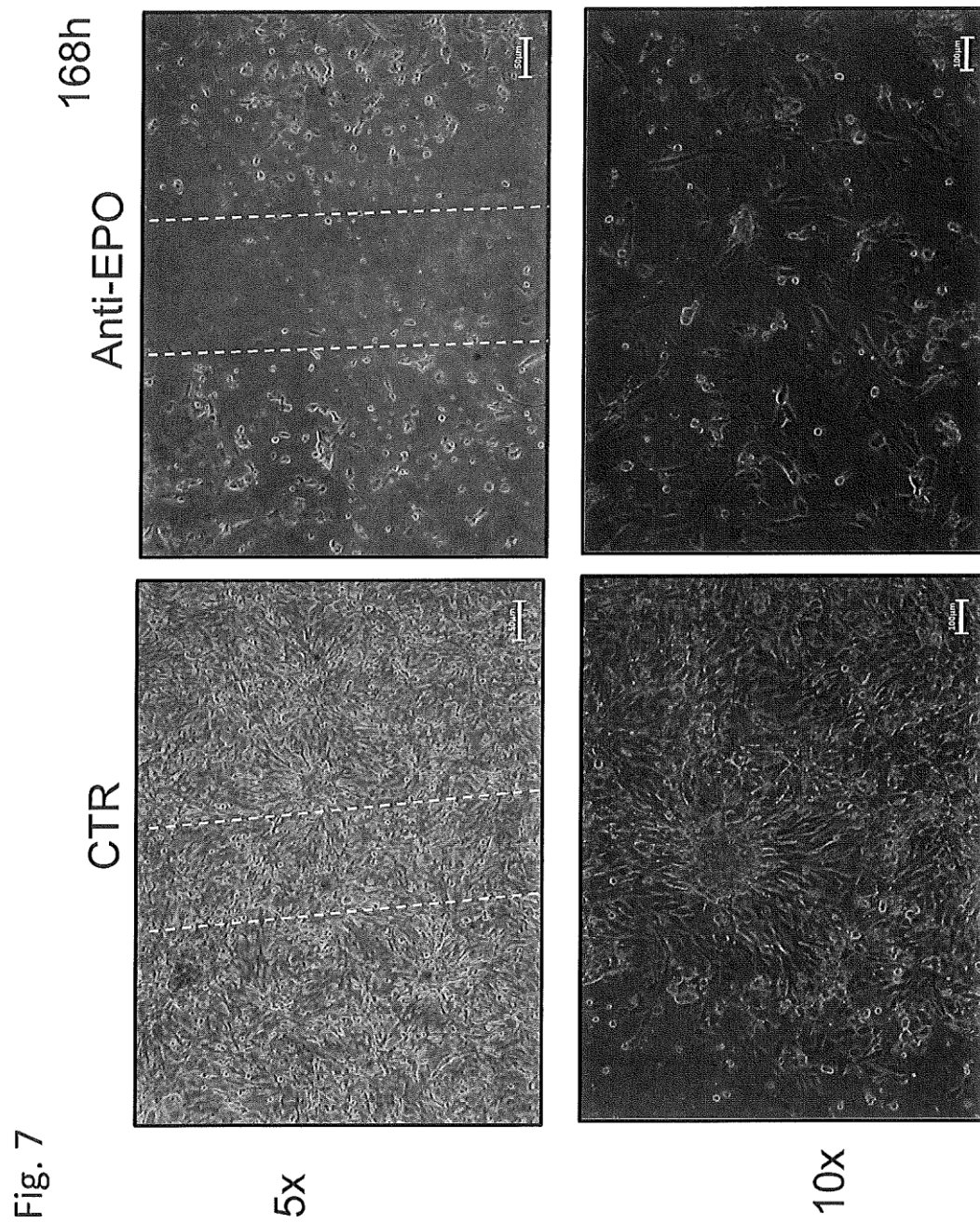


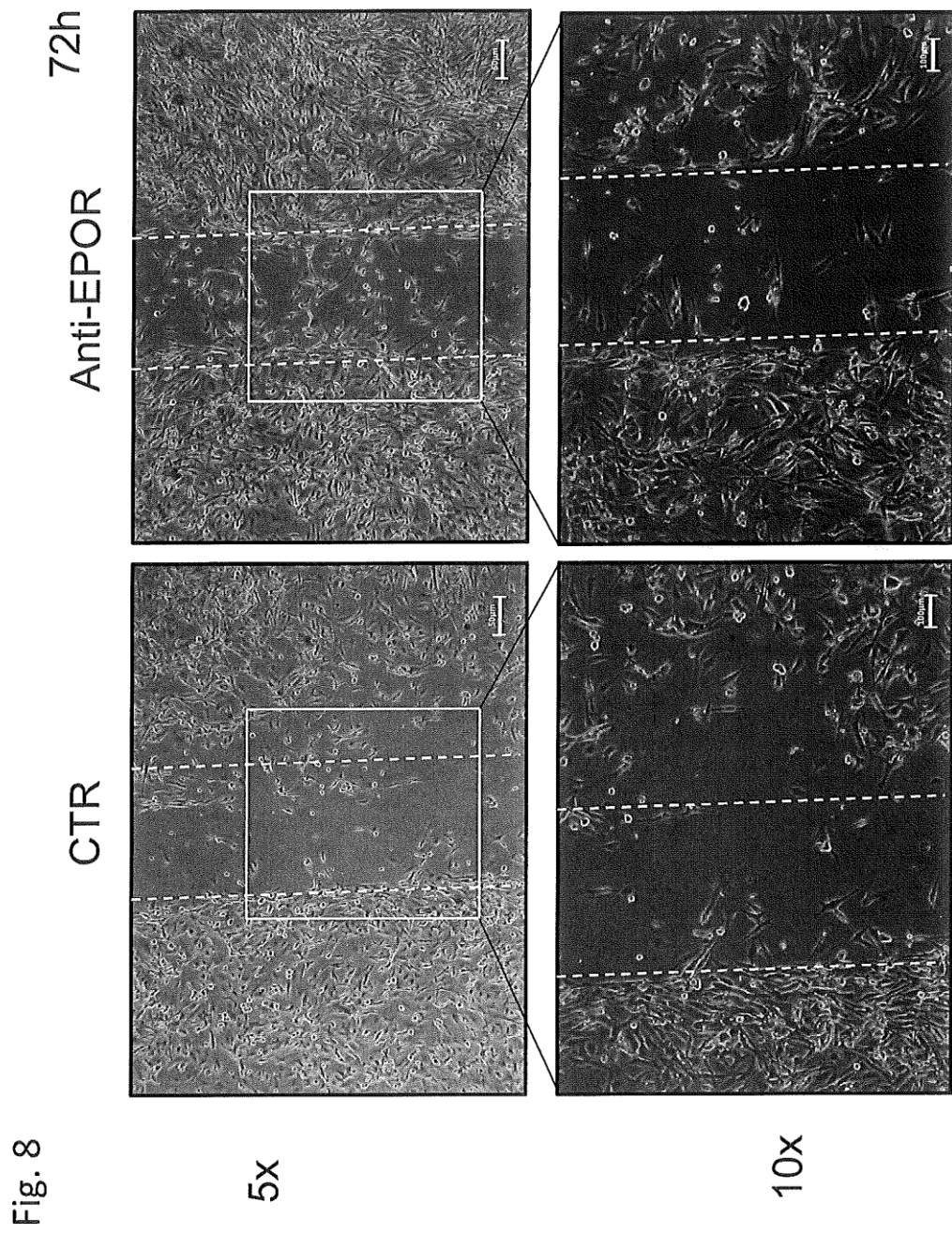


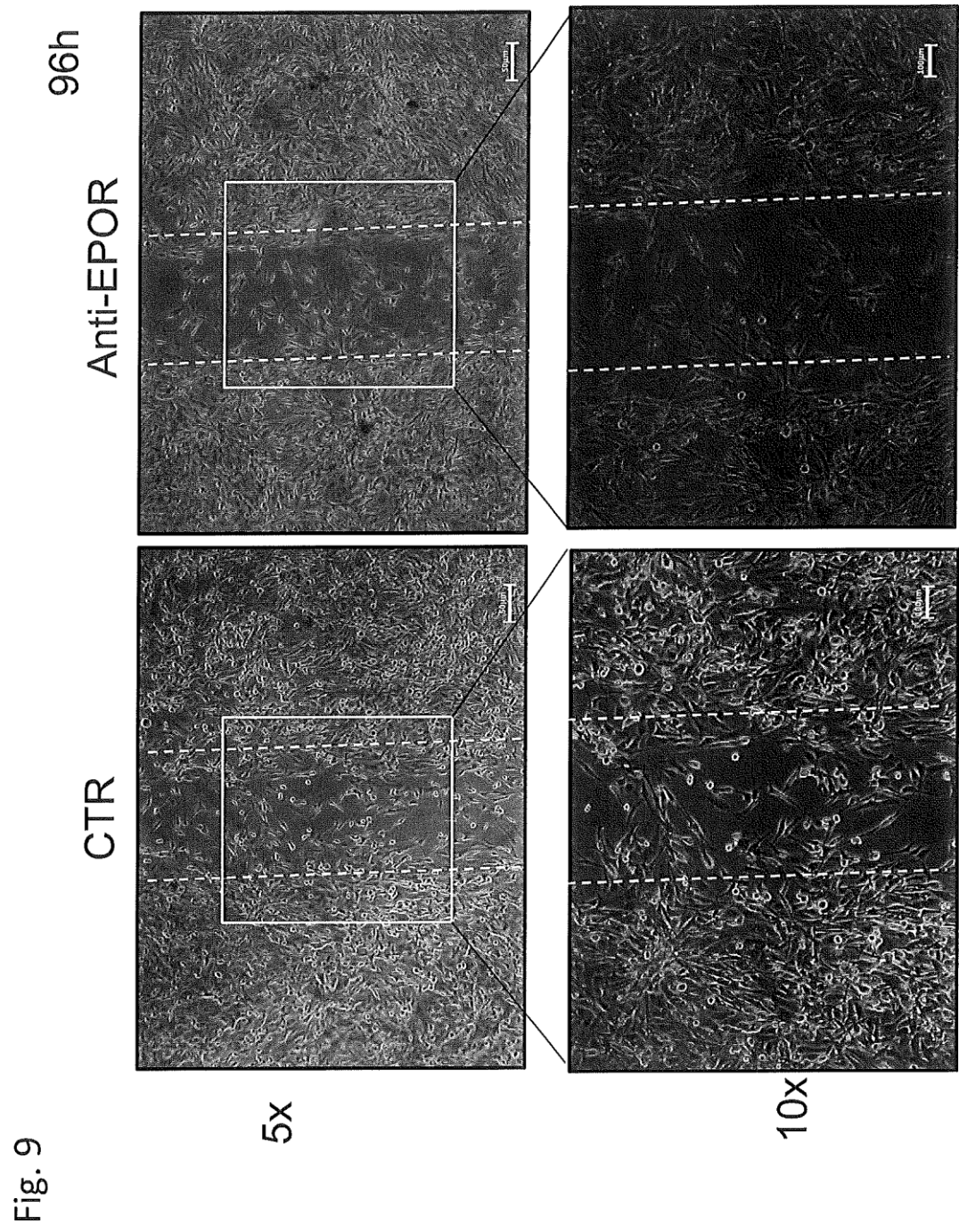


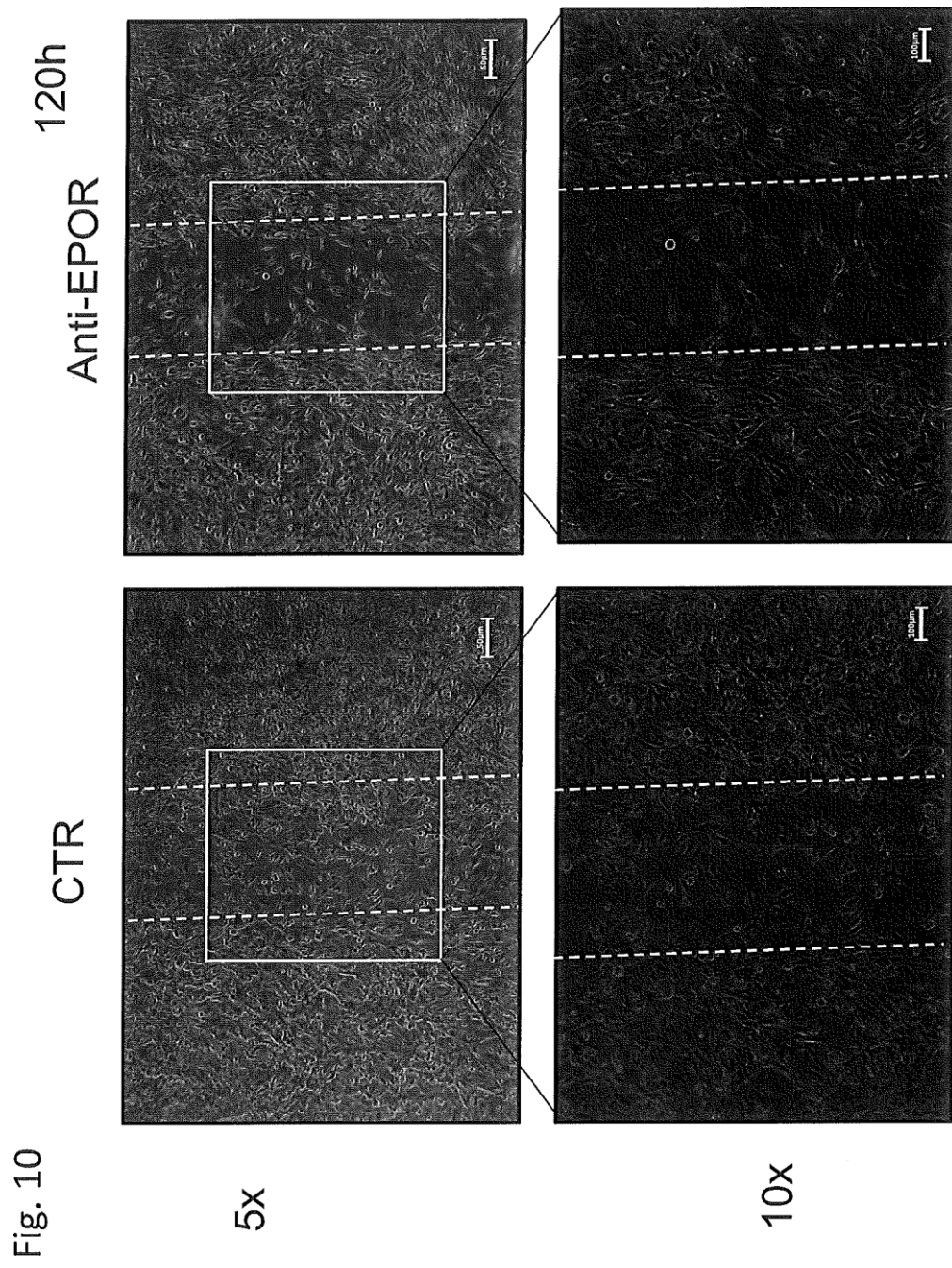


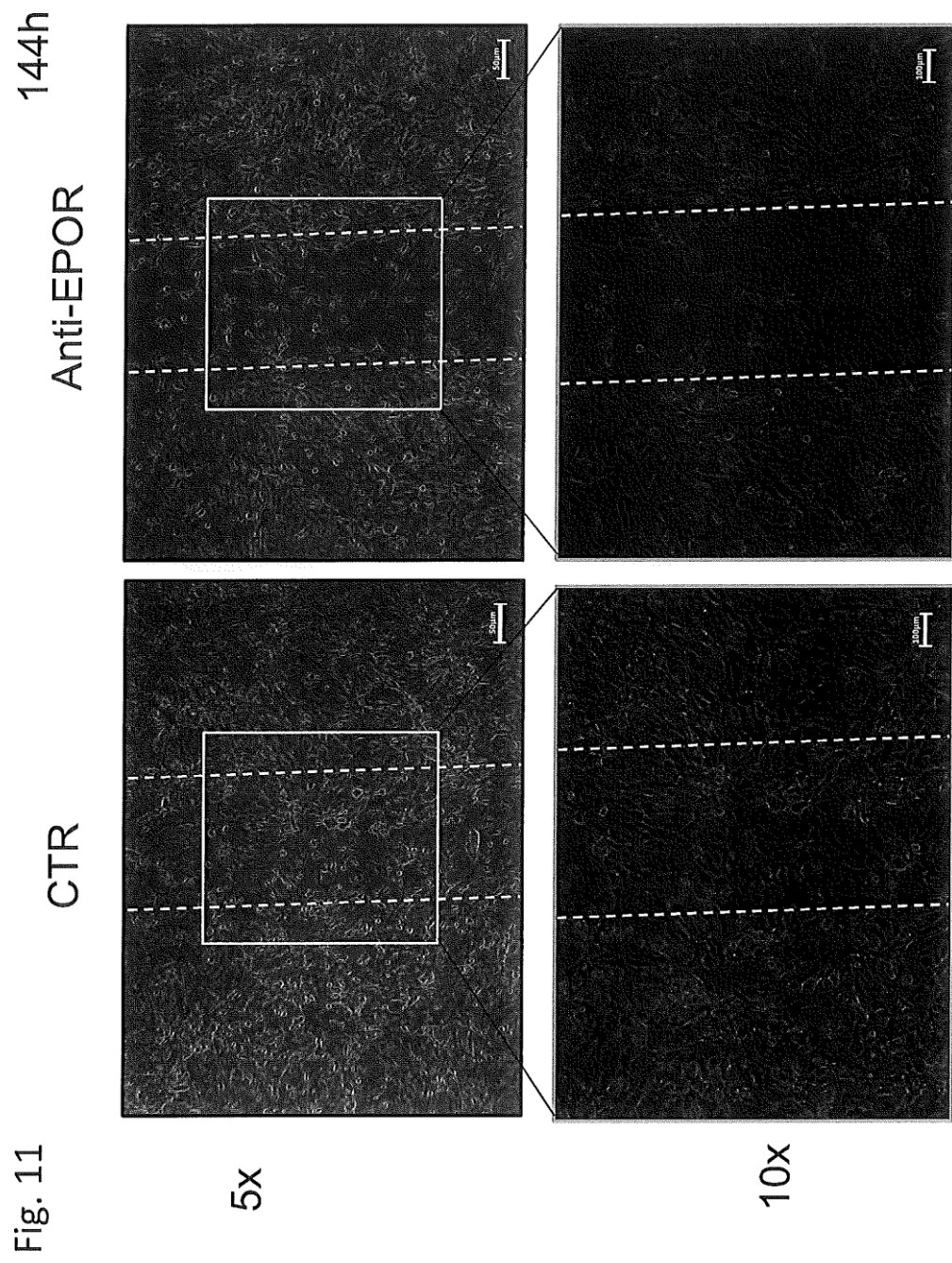












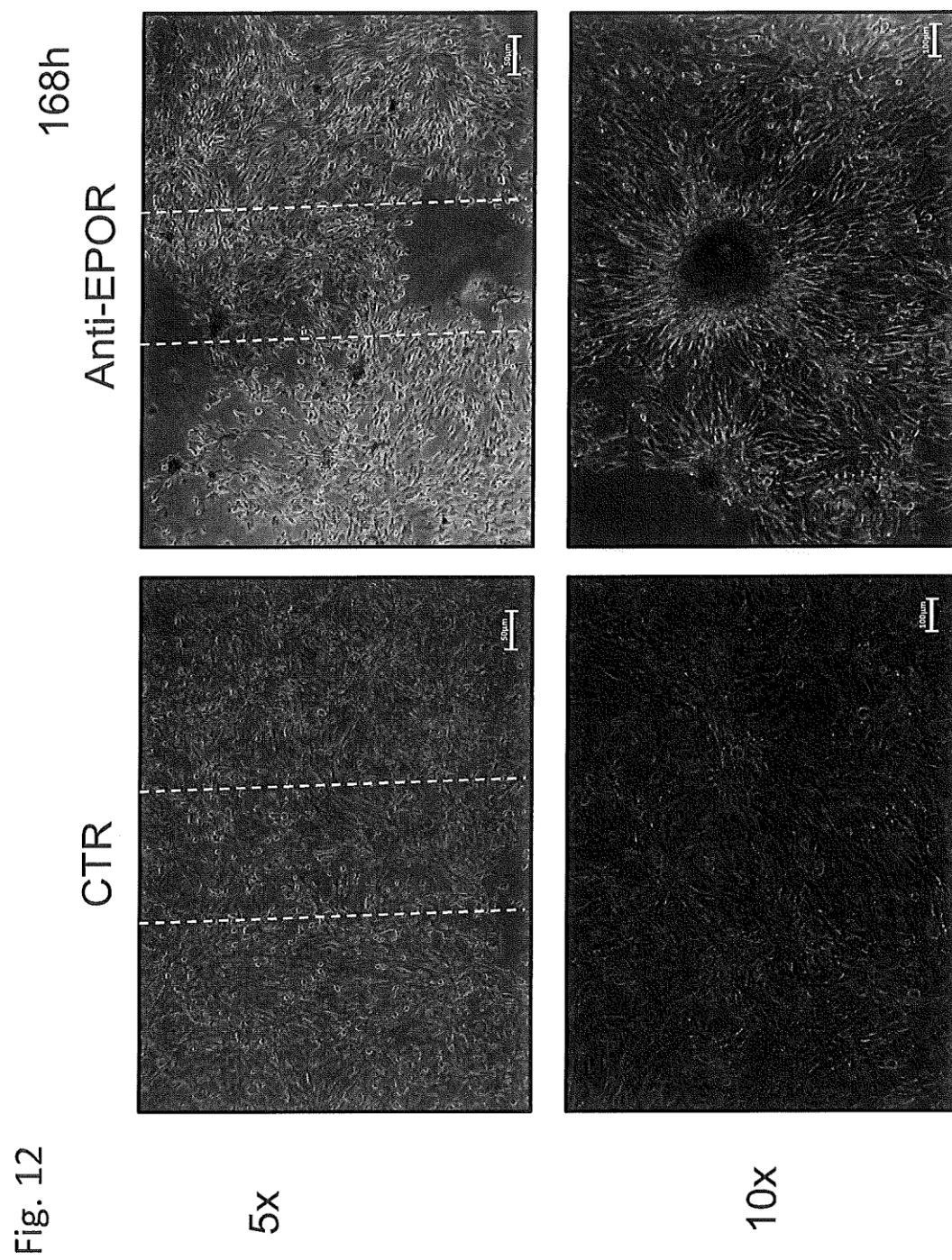


Fig. 13

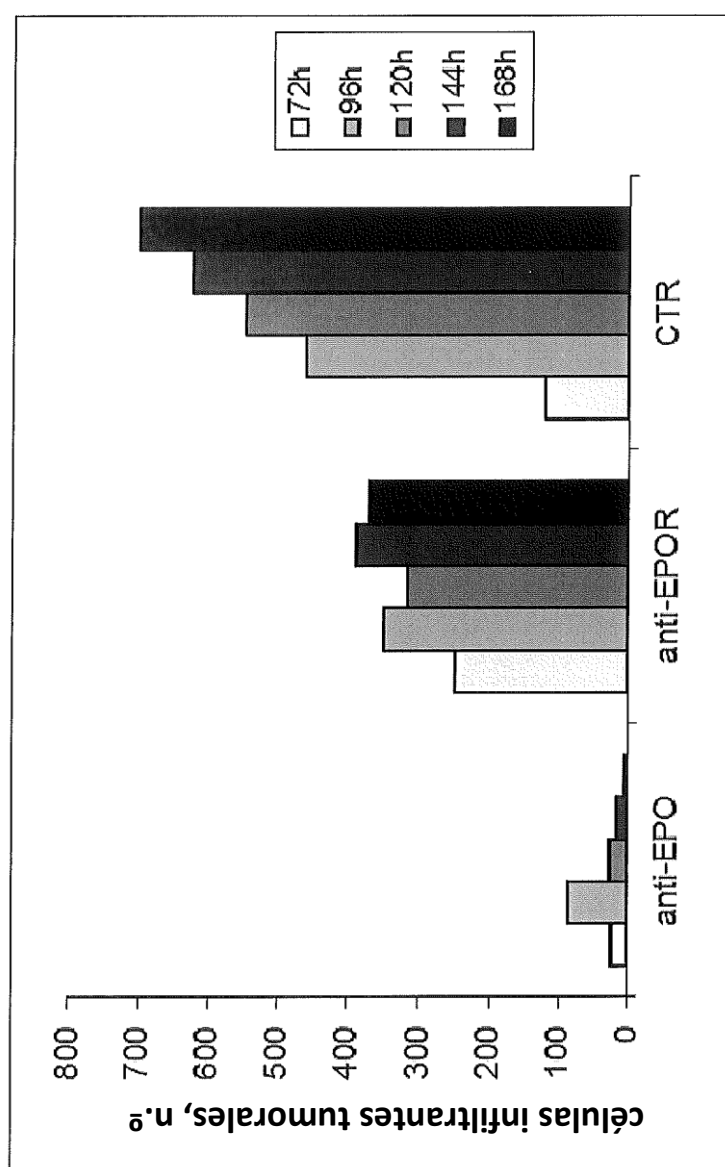
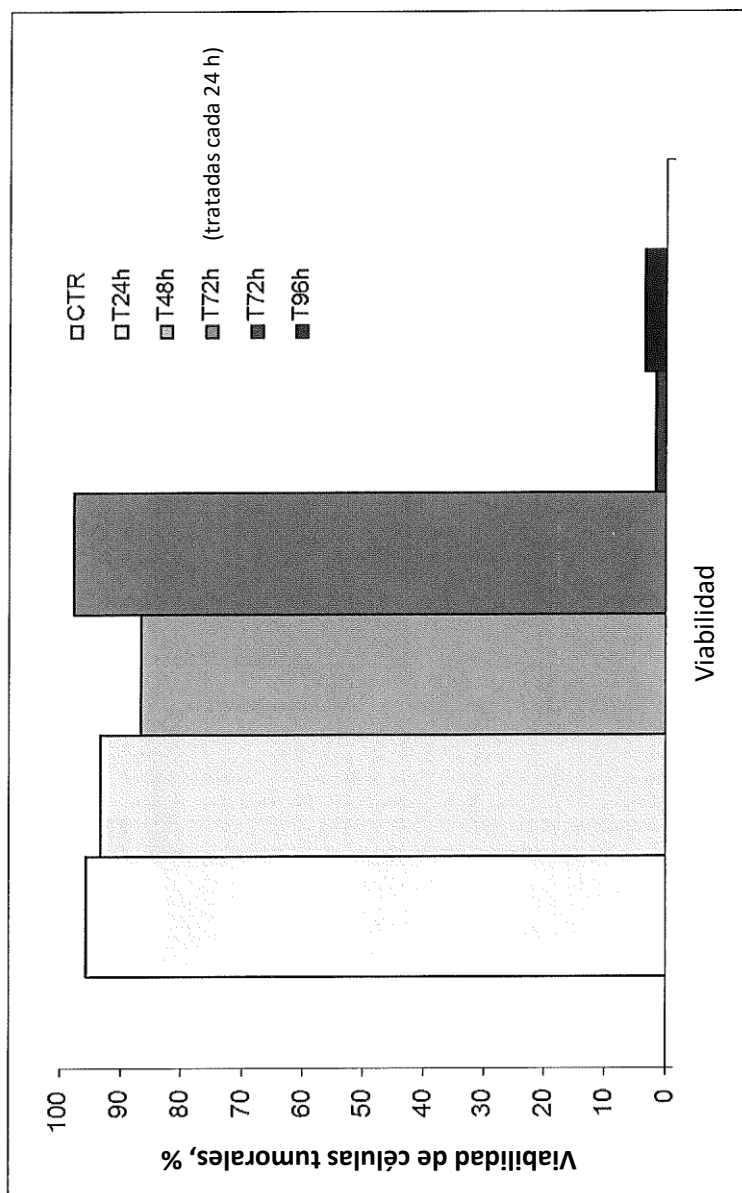
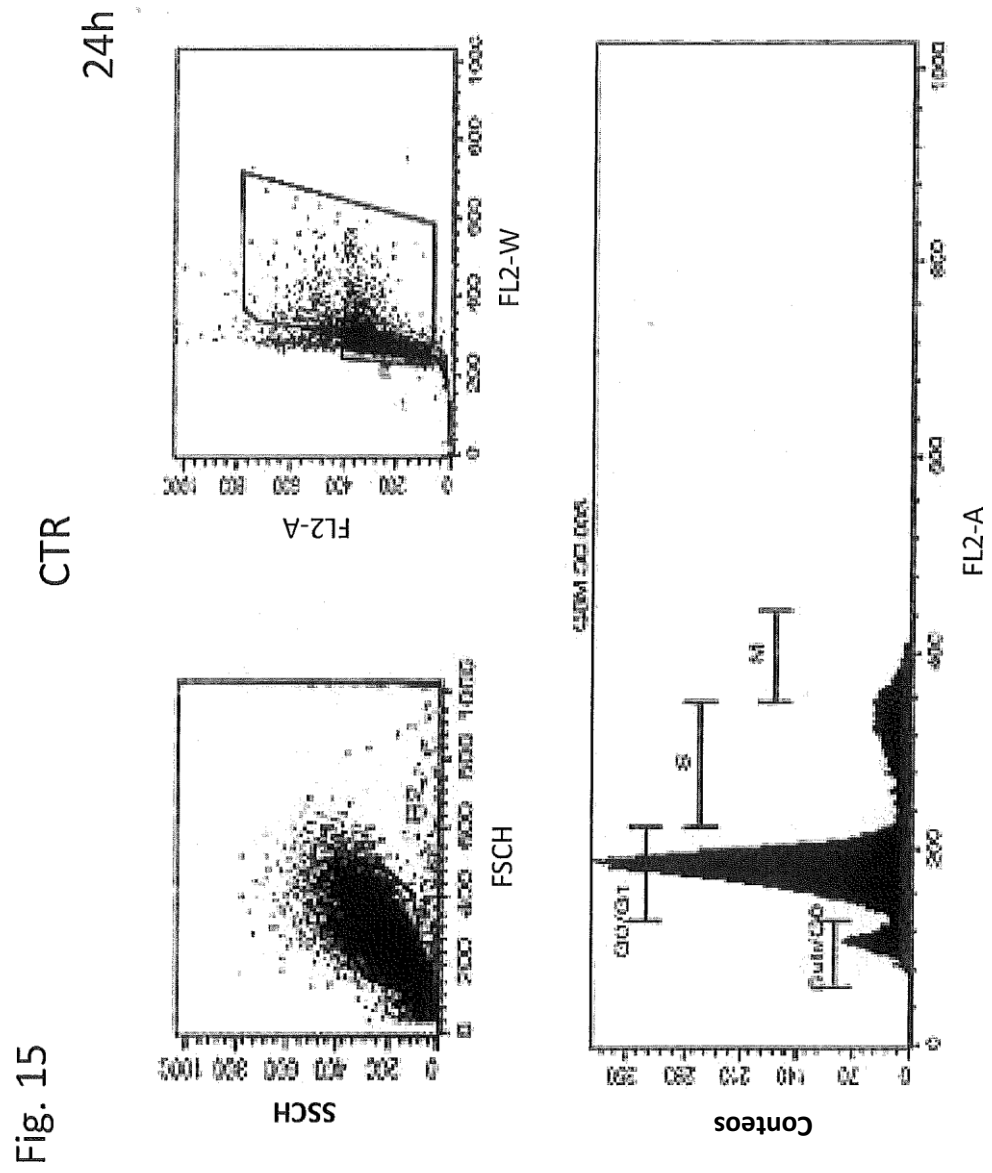


Fig. 14





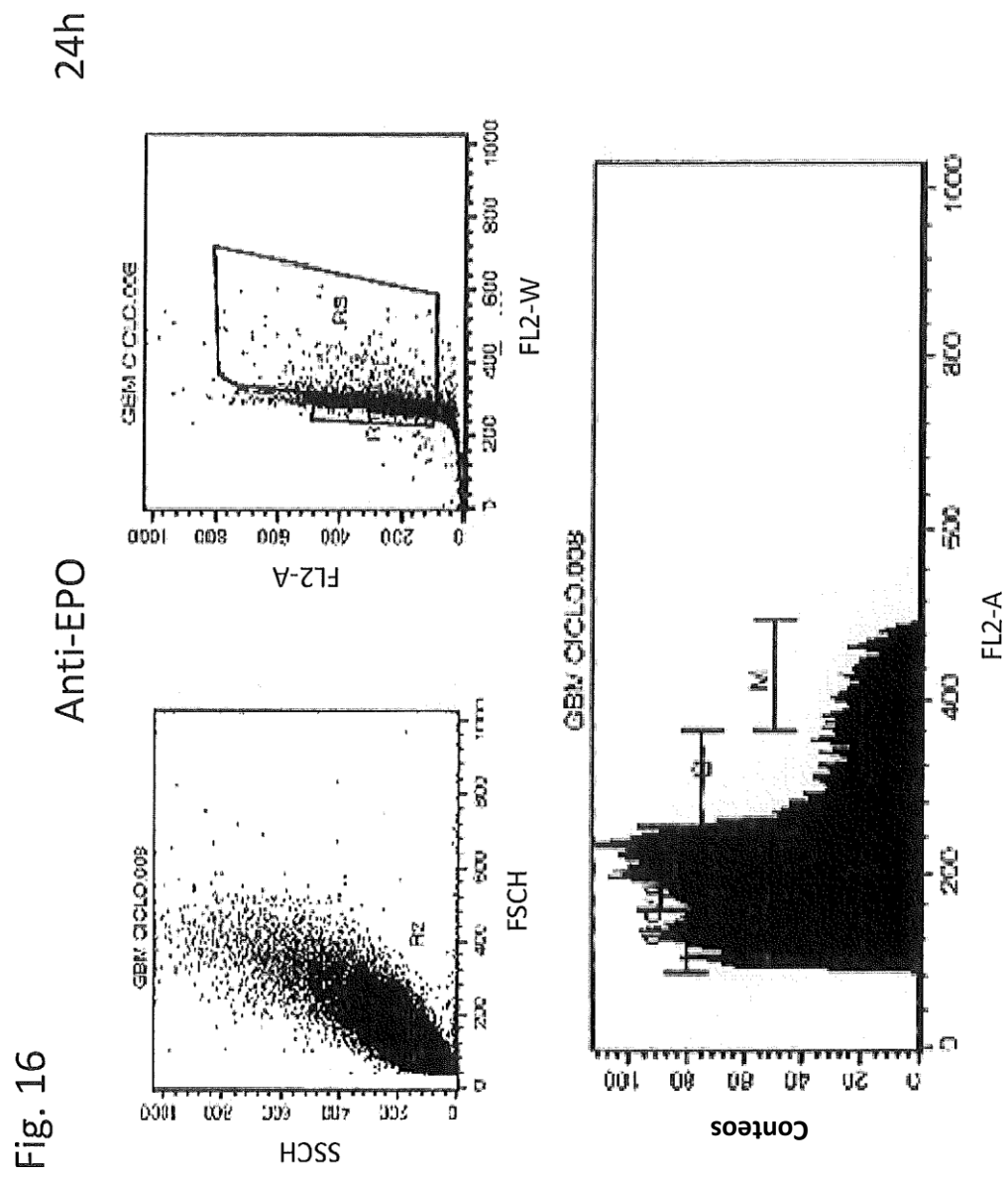


Fig. 17

CASPASA-9

45 kDa forma inactiva

35 kDa forma activa

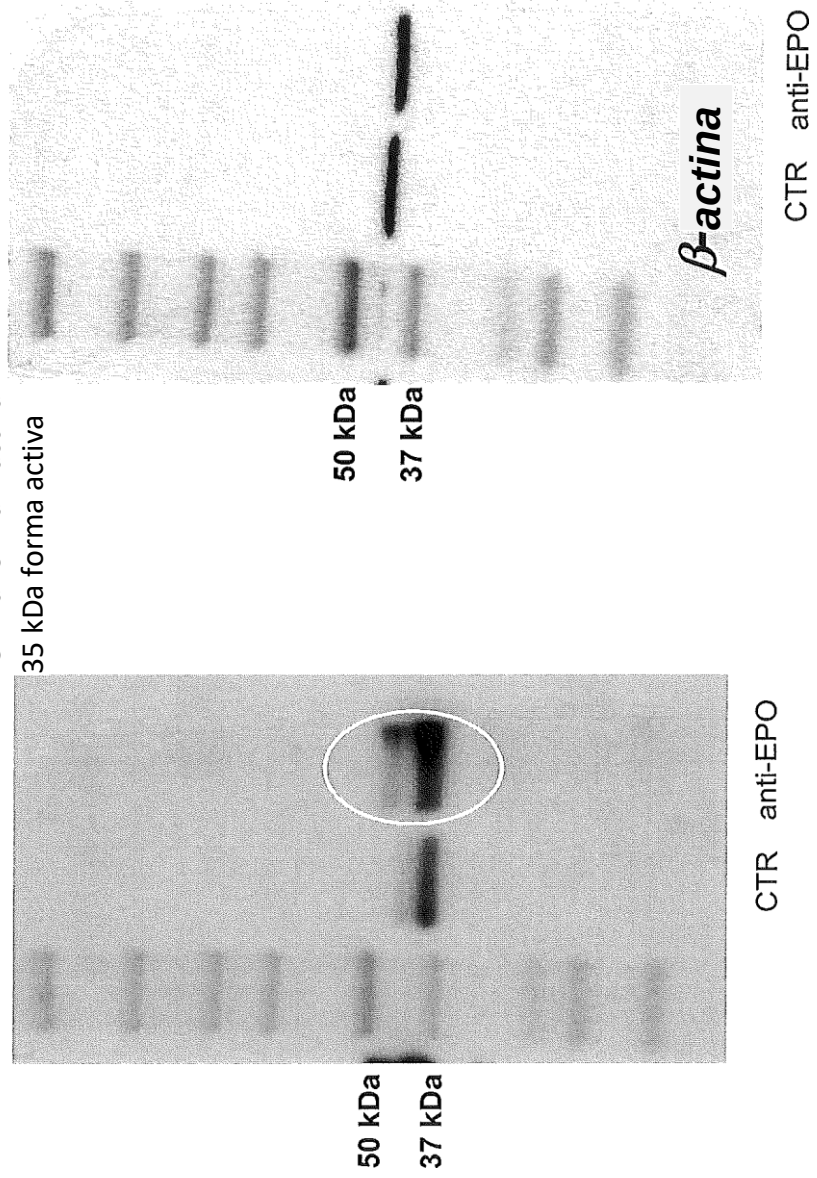
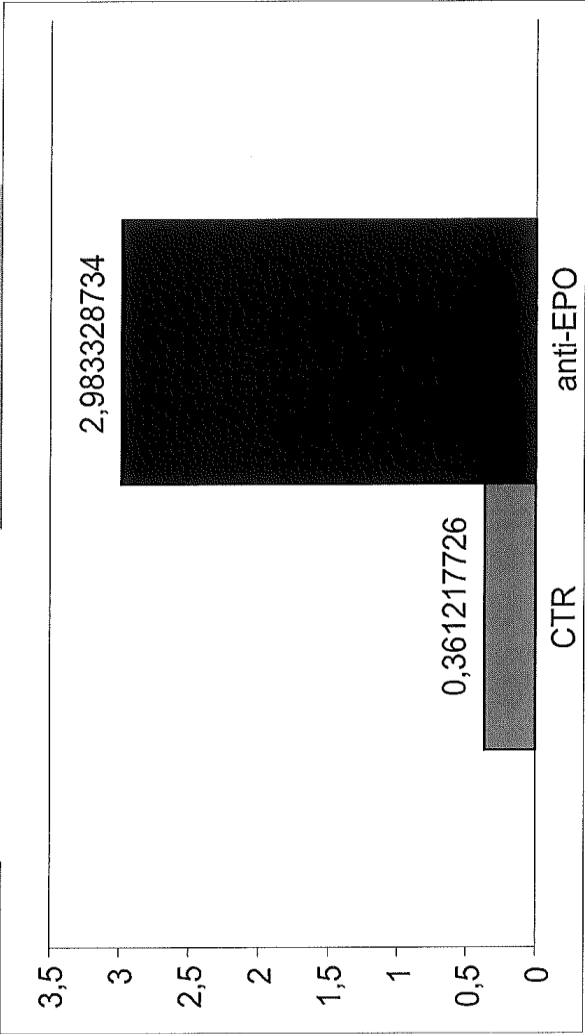


Fig. 18

CASPASA-9

	área	
	línea1	línea2
blot rif	23434	183782
Caspasa-9 forma activa	64875	61603
βActina	0,361218	2,983329
Normalización		



Incremento de 8,28 veces

Fig. 19

CASPASA-3

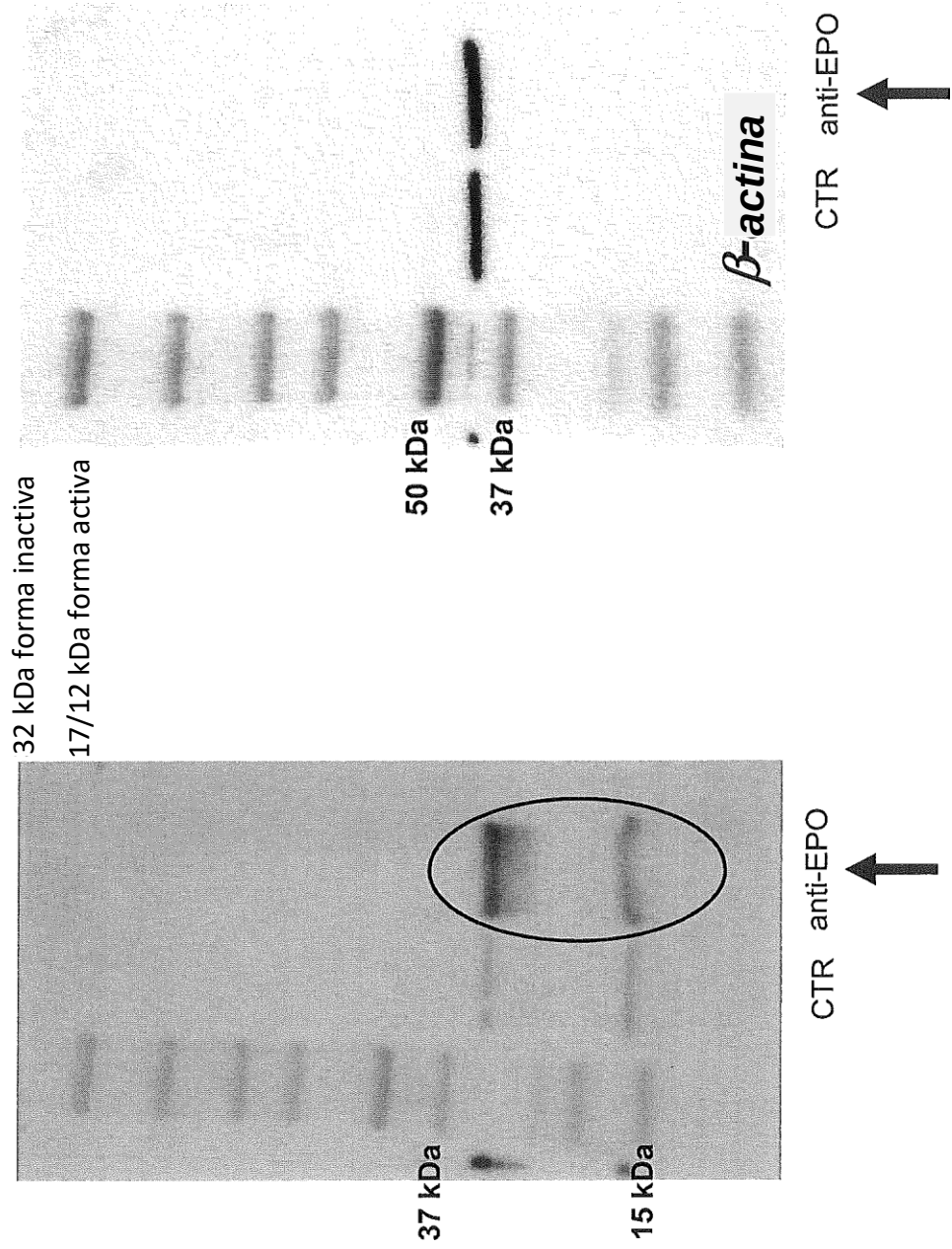
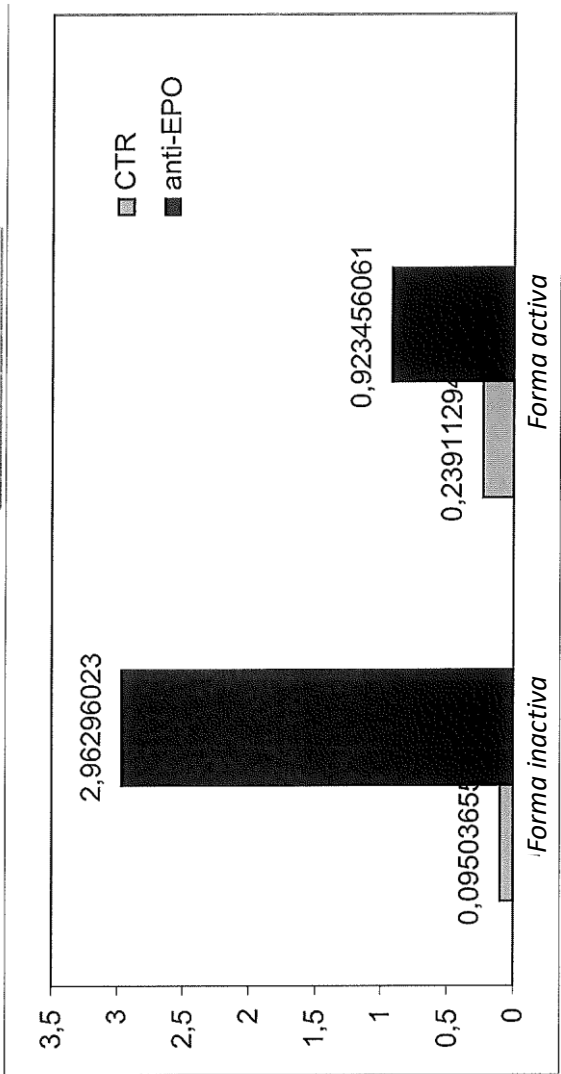


Fig. 20

CASPASA-3

blot rif	área	
	línea1	línea2
Caspasa-3 forma inactiva	5434	200785
Caspasa-3 forma activa	13672	62578
βActina	57178	67765
Norm1(inact)	0,095037	2,96296
Norm2(act)	0,239113	0,923456



Incremento de 32,8

Fig. 21

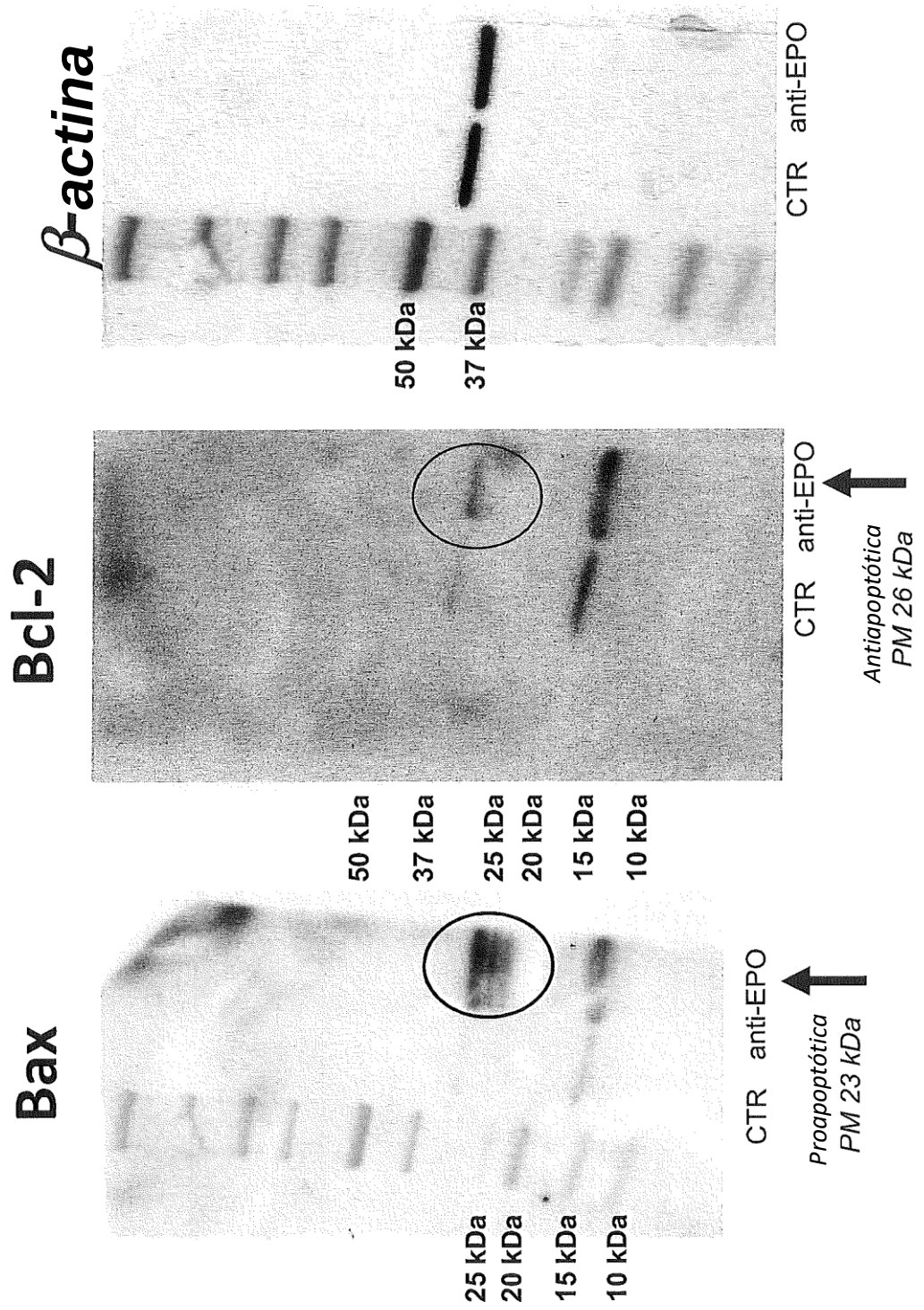
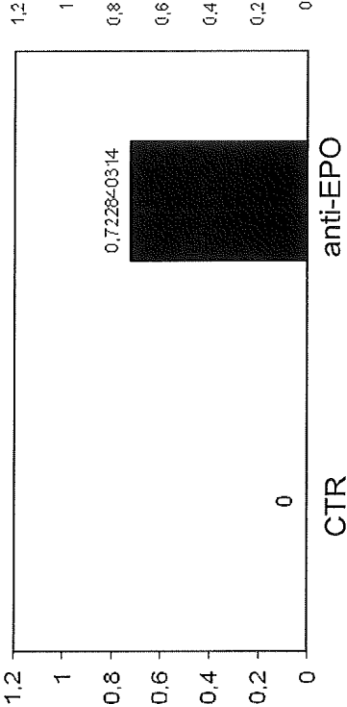


Fig. 22

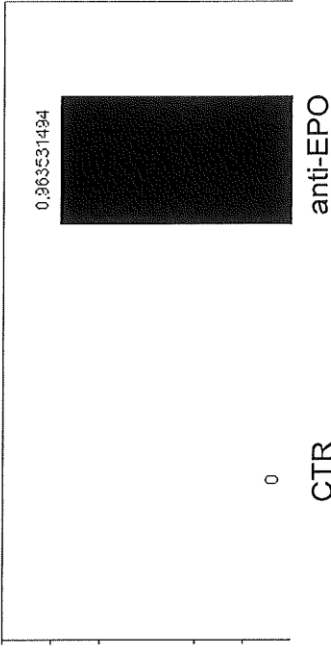
Bcl-2

blot rif	área	
	línea1	línea2
Bcl-2	0	39762
βActina	50664	55008
Normalización	0	0,72284



Bax

blot rif	área	
	línea1	línea2
Bax	0	63146
βActina	55534	65536
Normalización	0	0,963531



Bcl-2

Vía antiapoptótica



Bax

Vía proapoptótica



Fig. 23

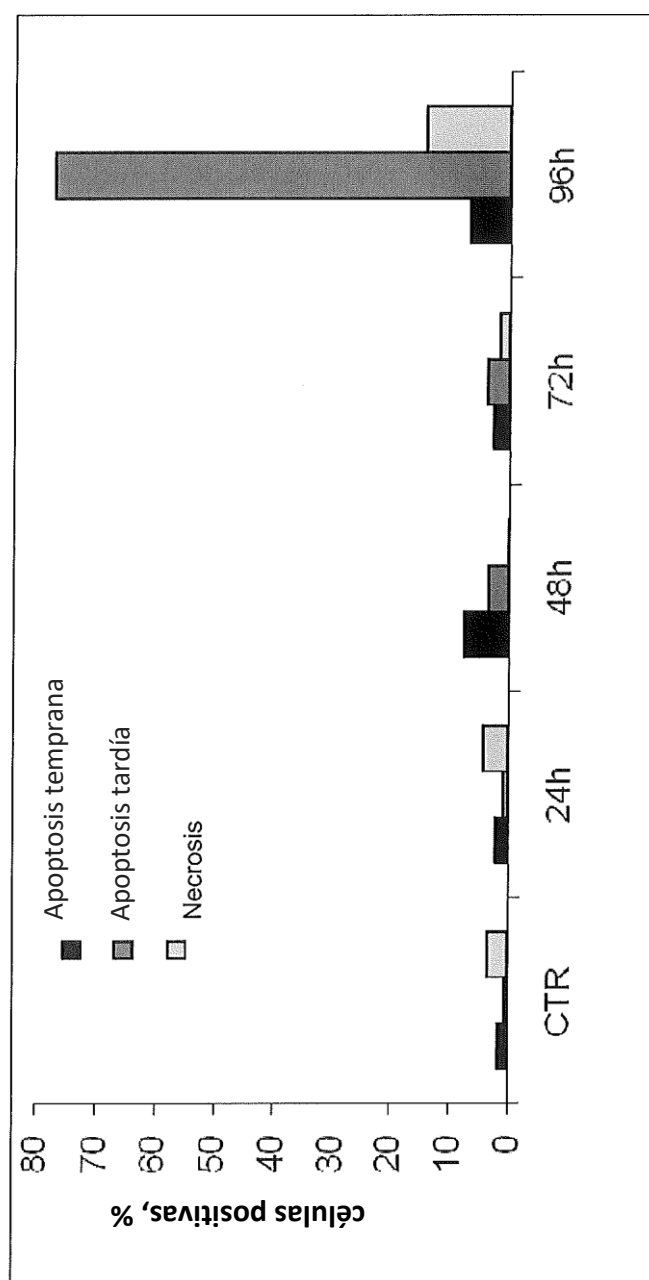


Fig. 24

Análisis de PCNA

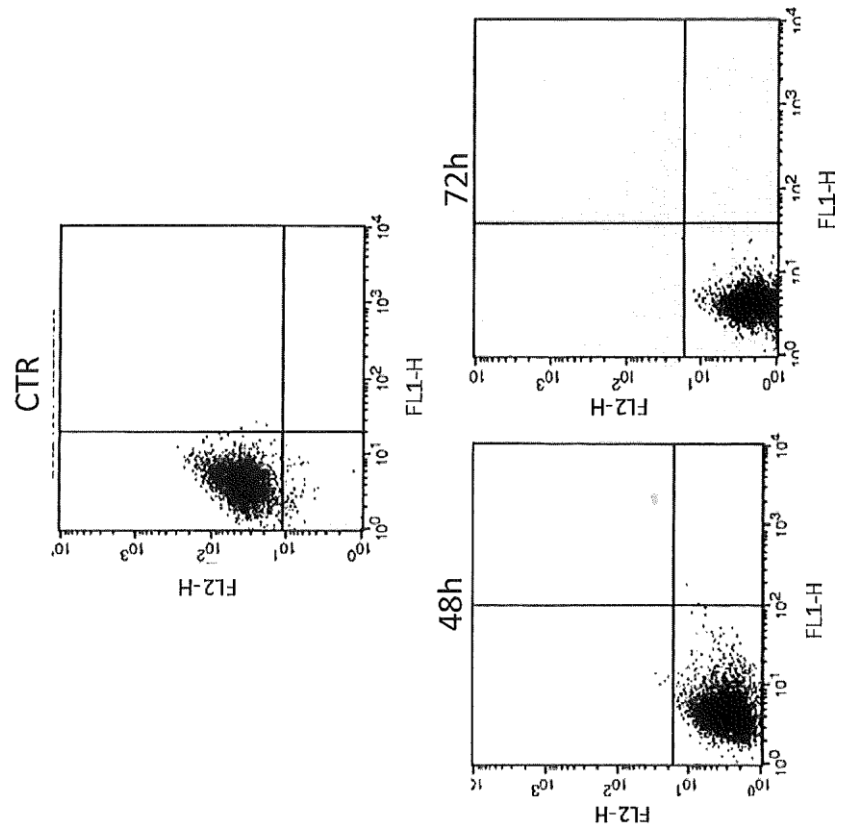


Fig. 25

SK1

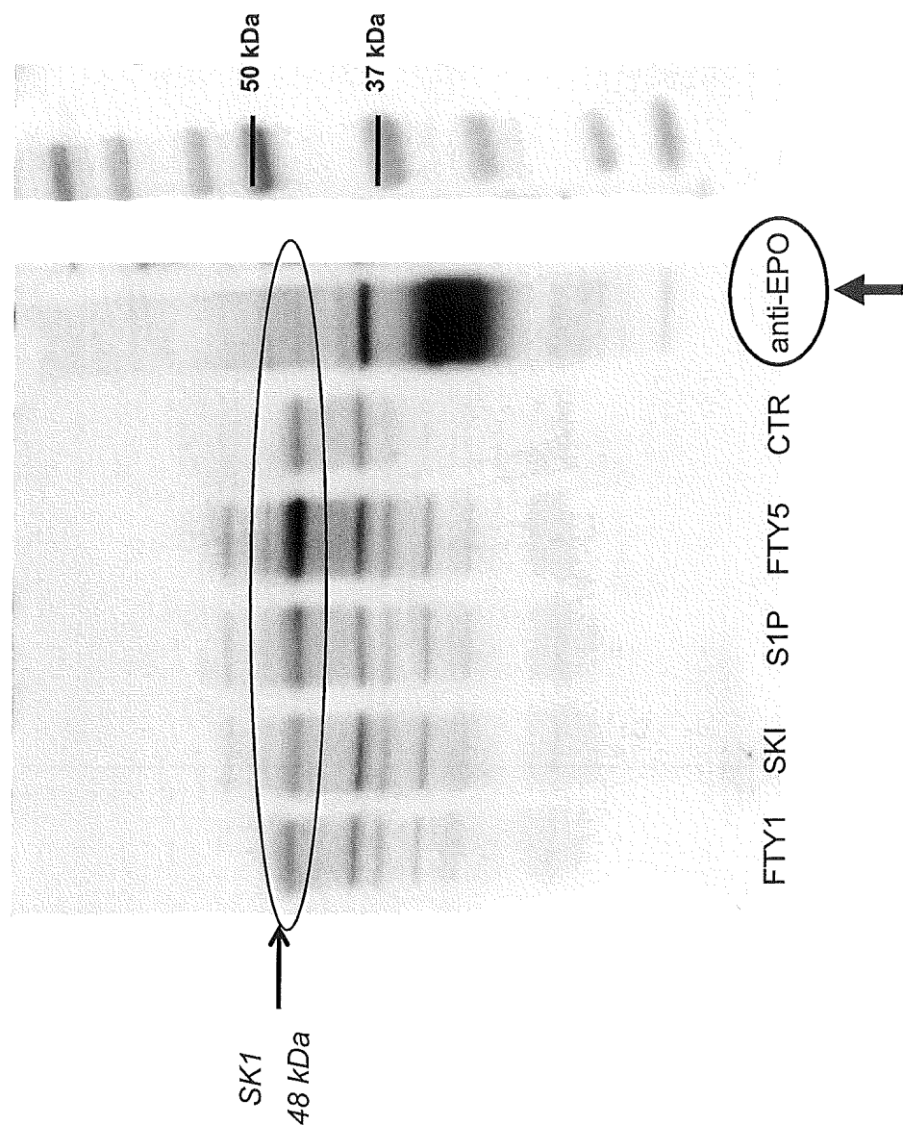


Fig. 26

SK2

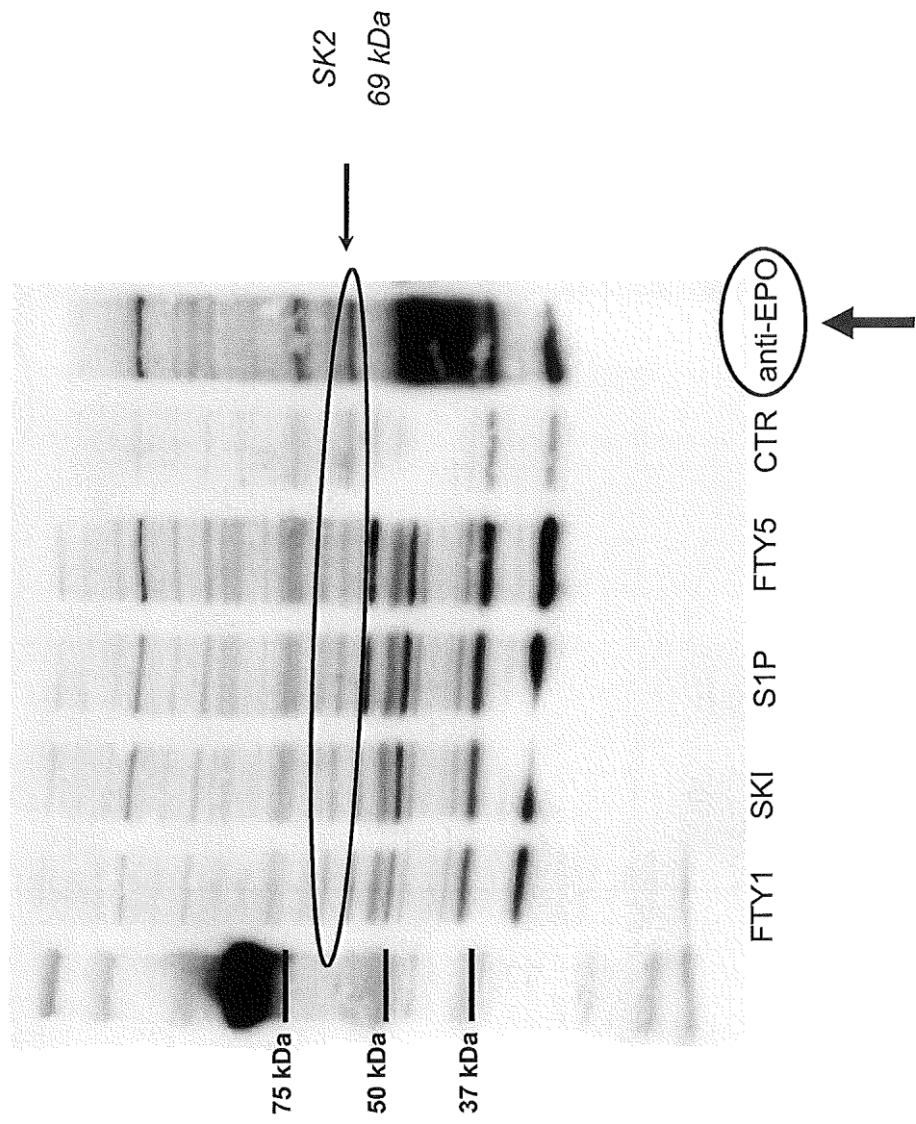


Fig. 27

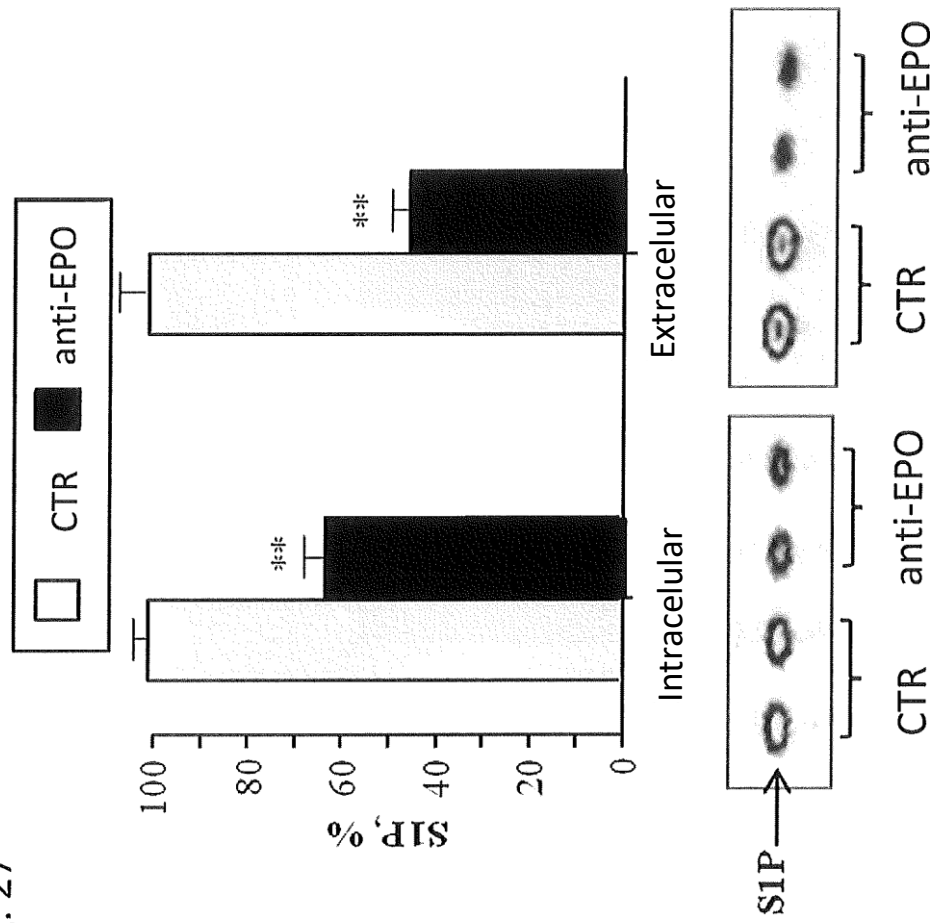
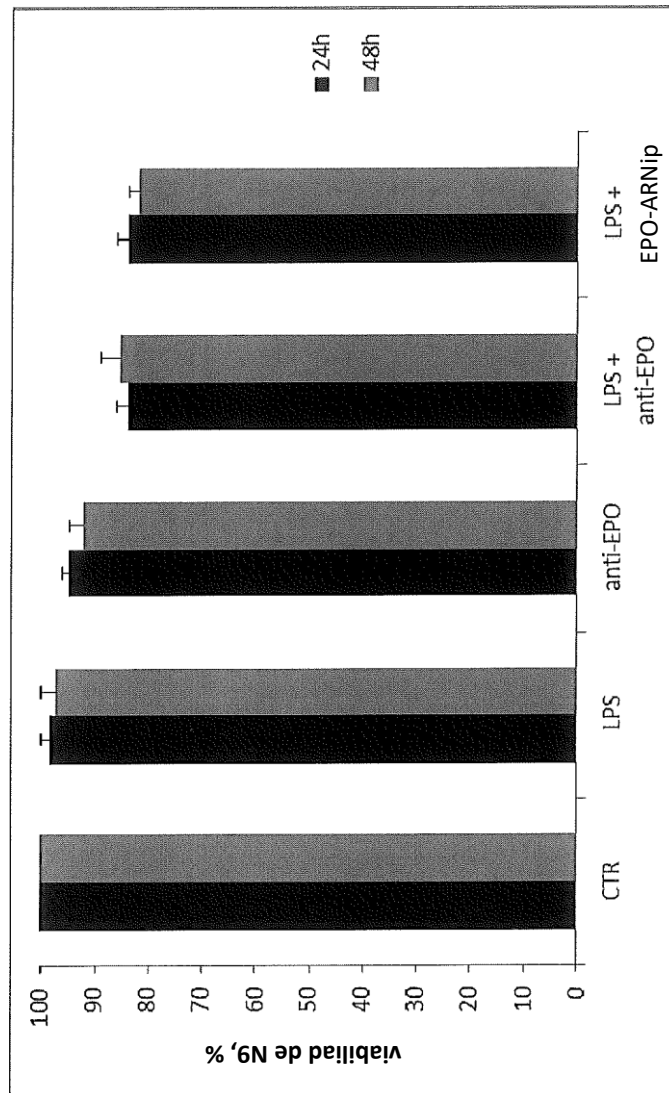


Fig. 28



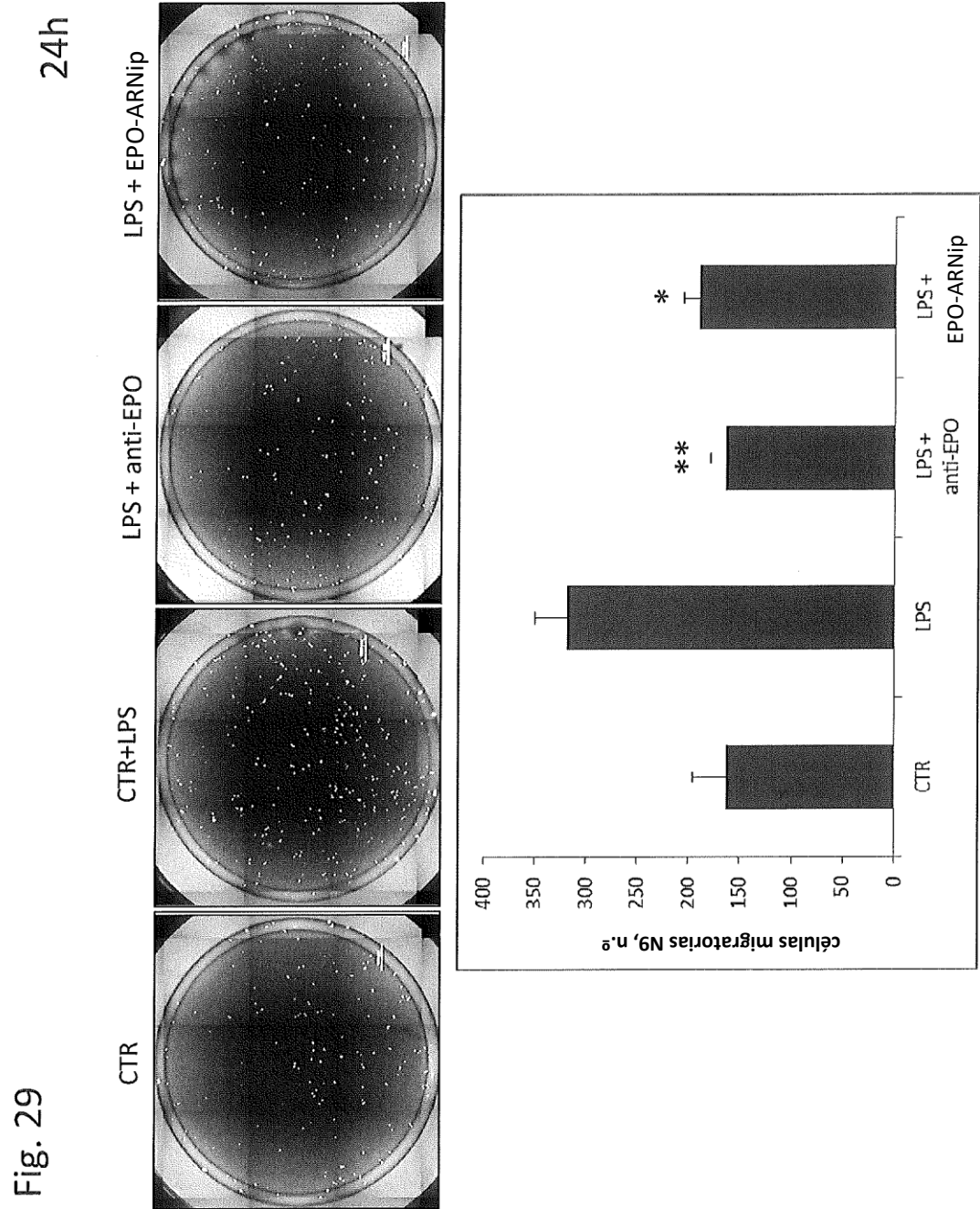


Fig. 30

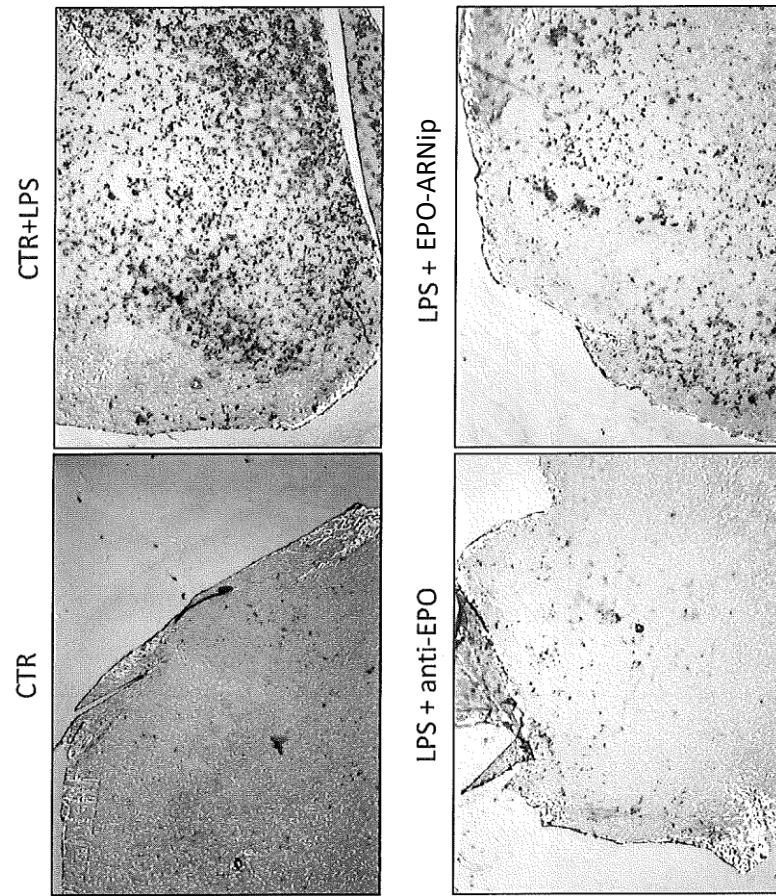


Fig. 31

24h

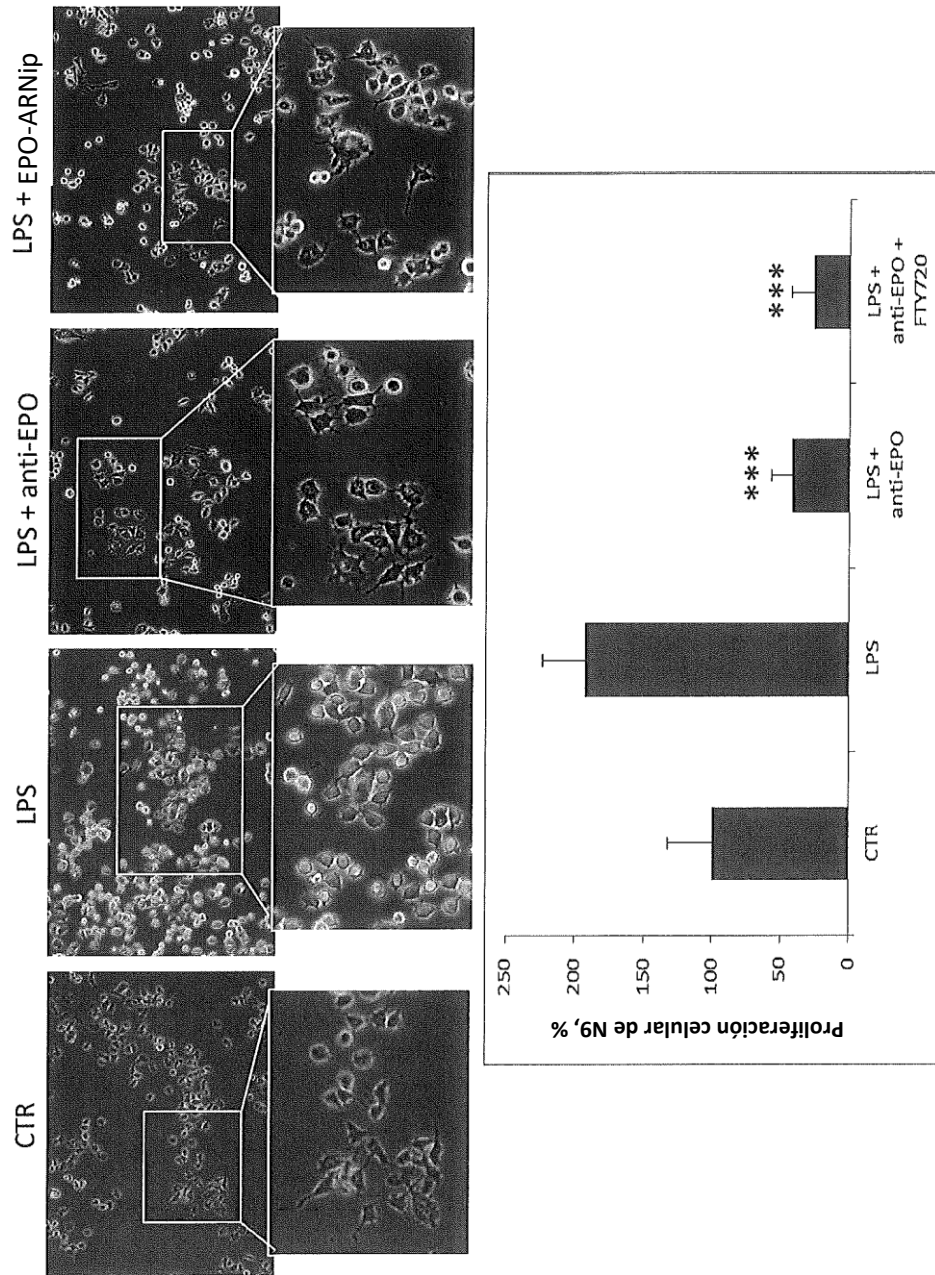


Fig. 32

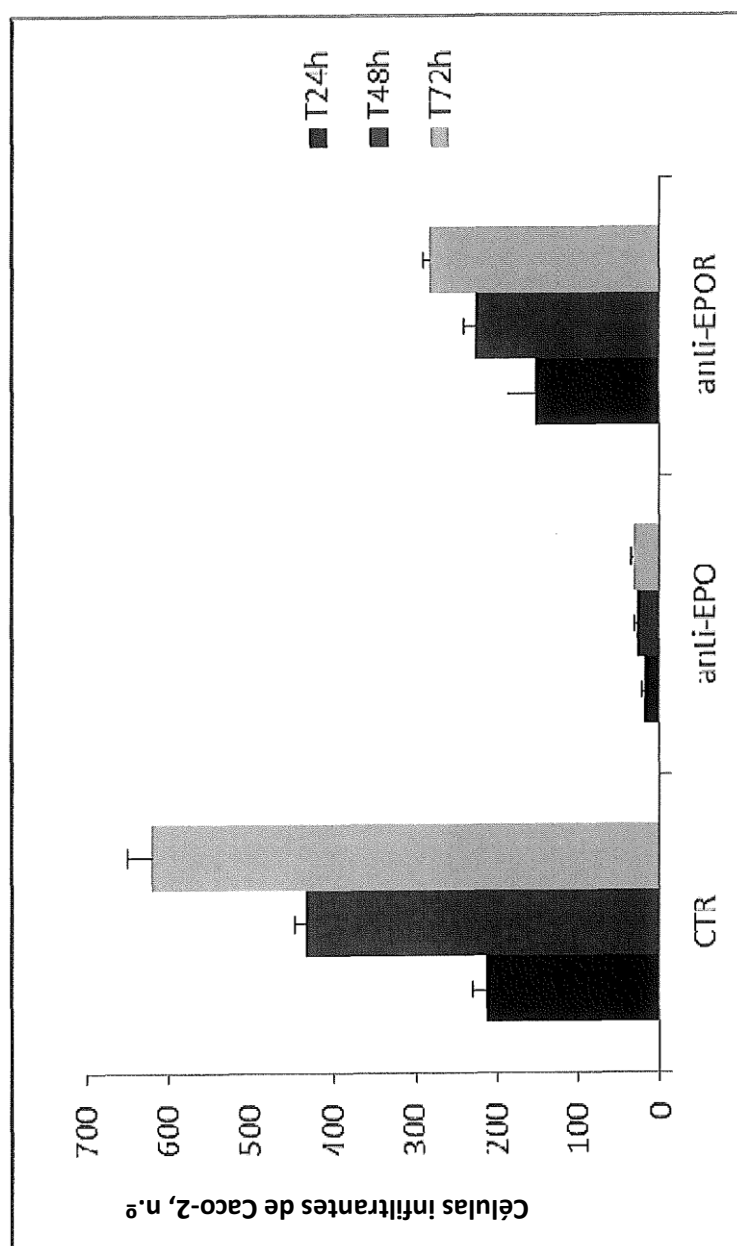


Fig. 33

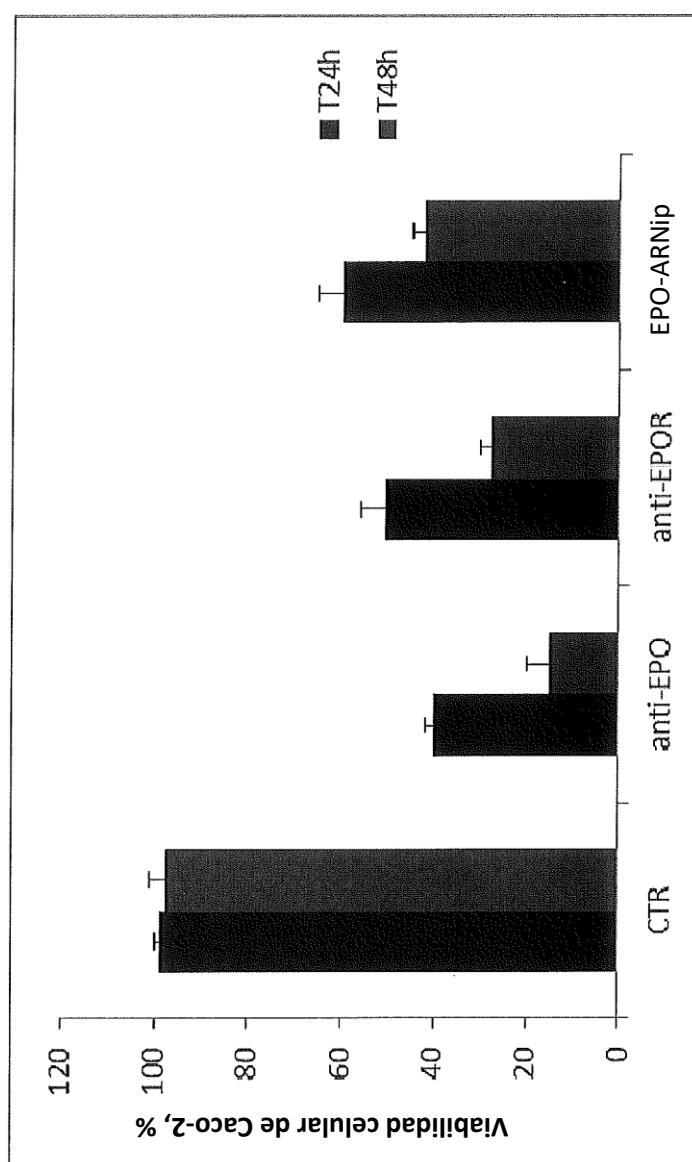


Fig. 34

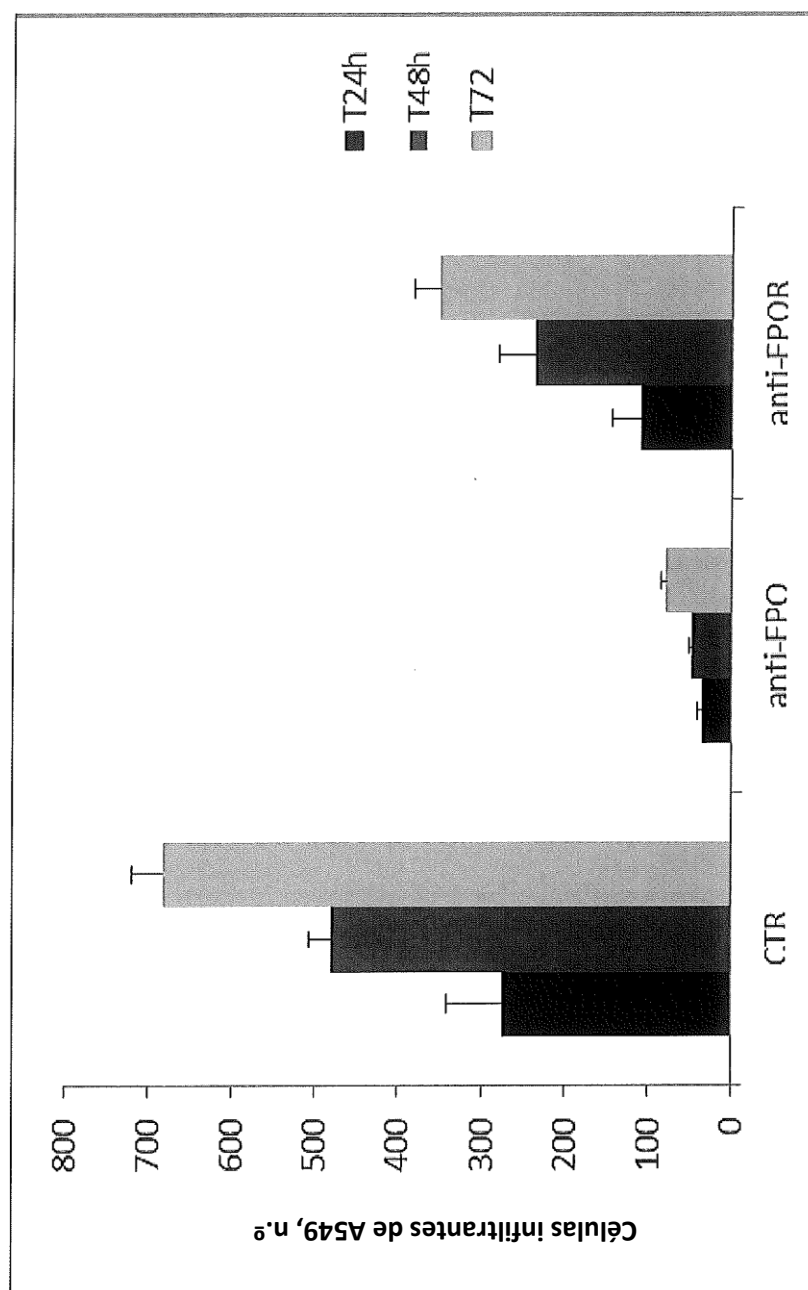


Fig. 35

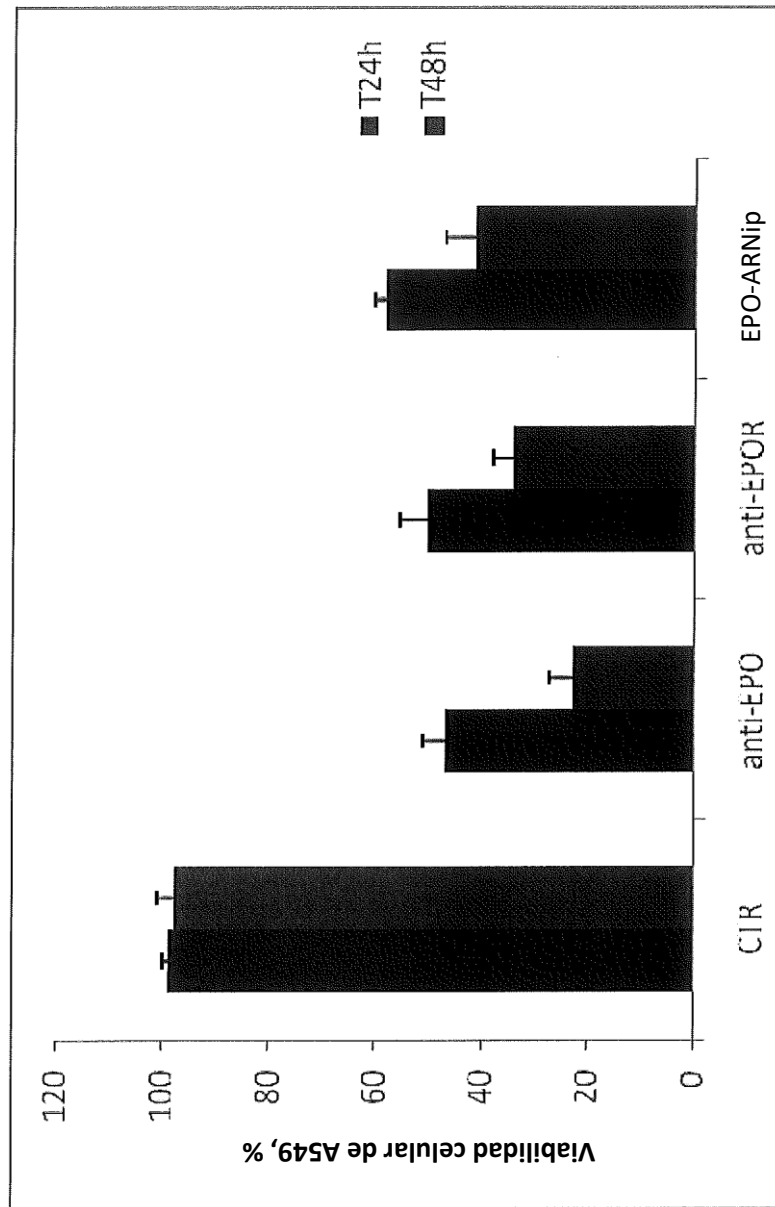


Fig. 36

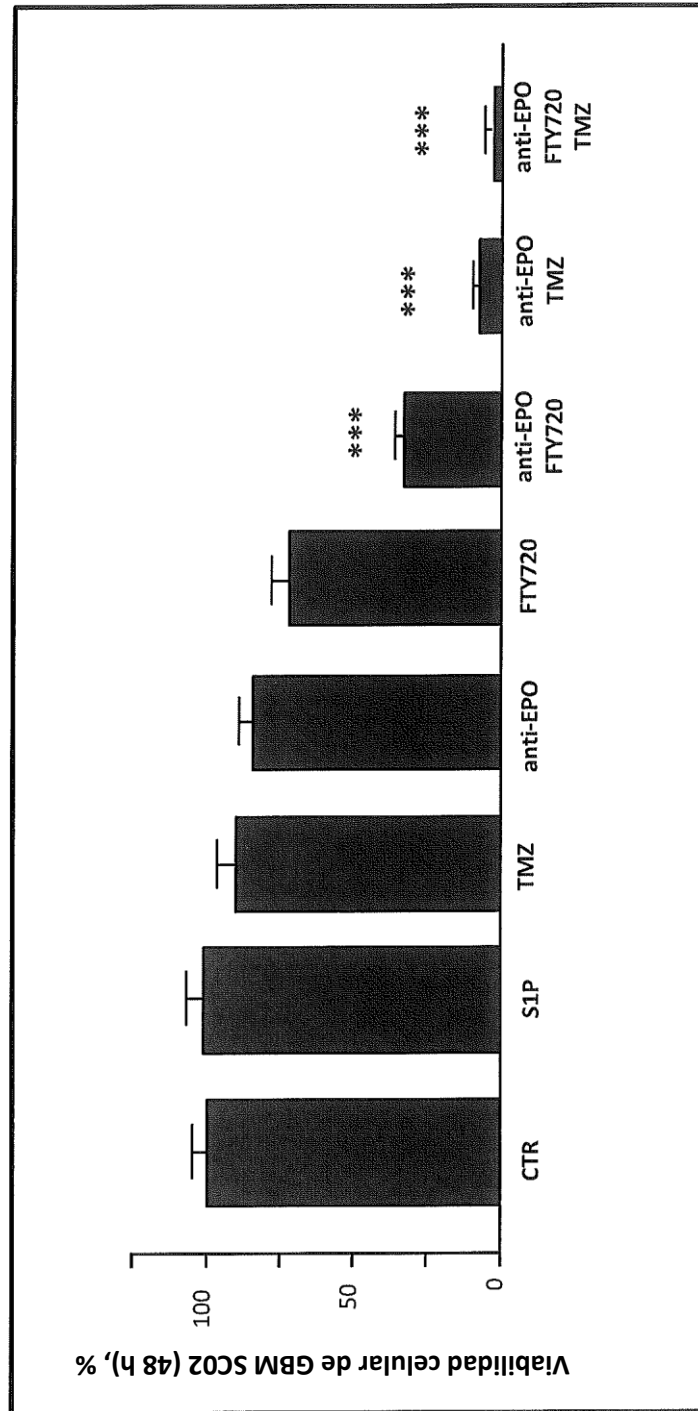


Fig. 37

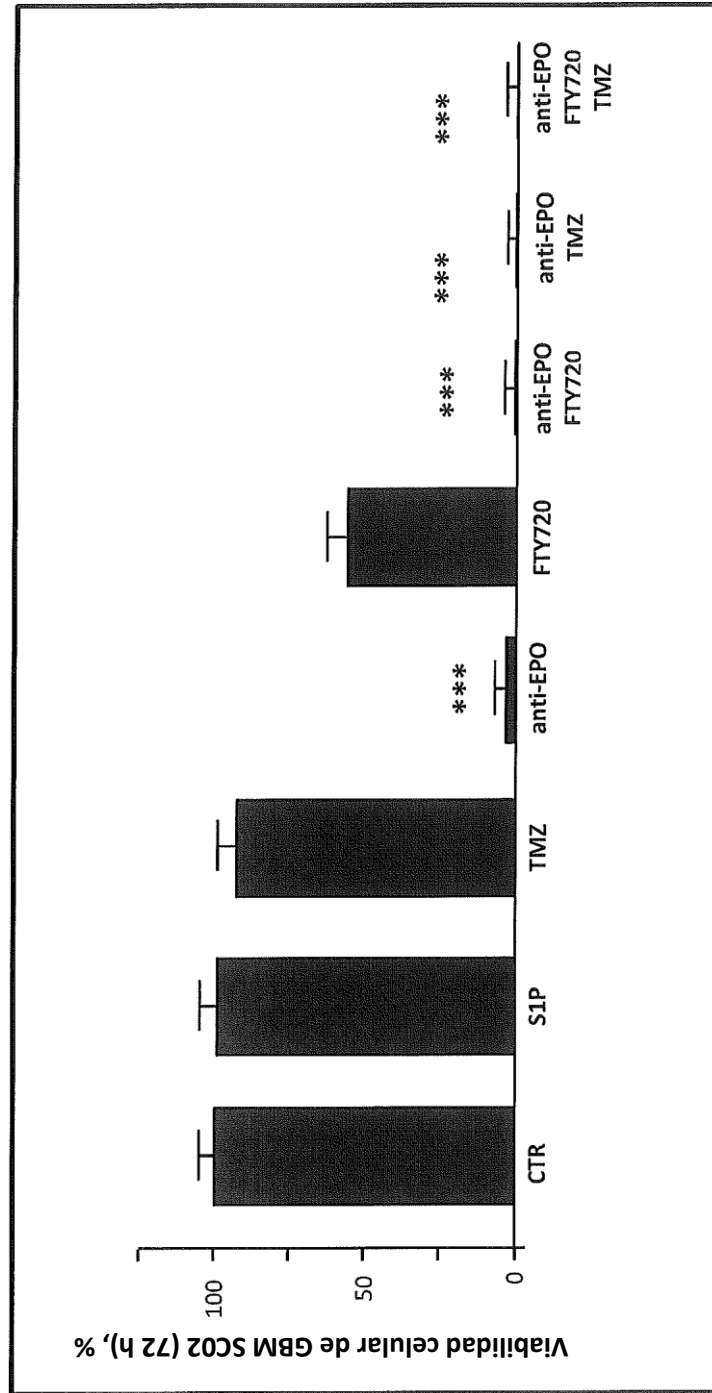


Fig. 38

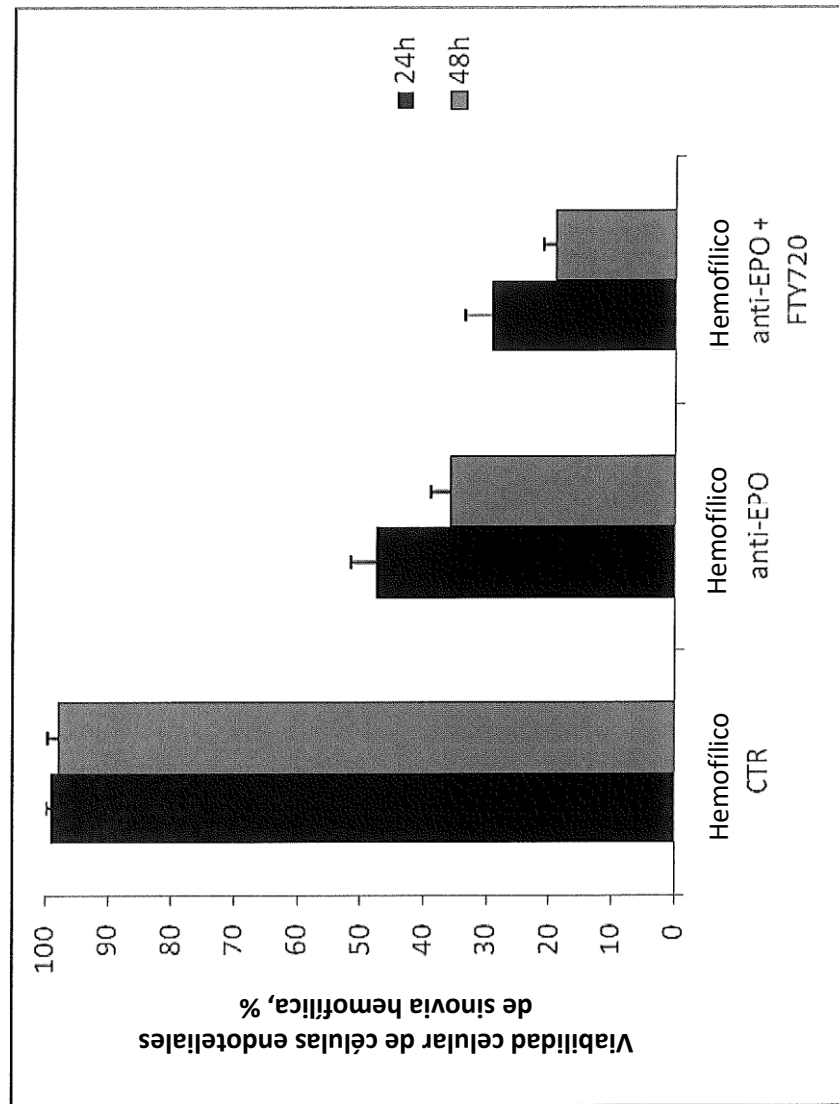


Fig. 39

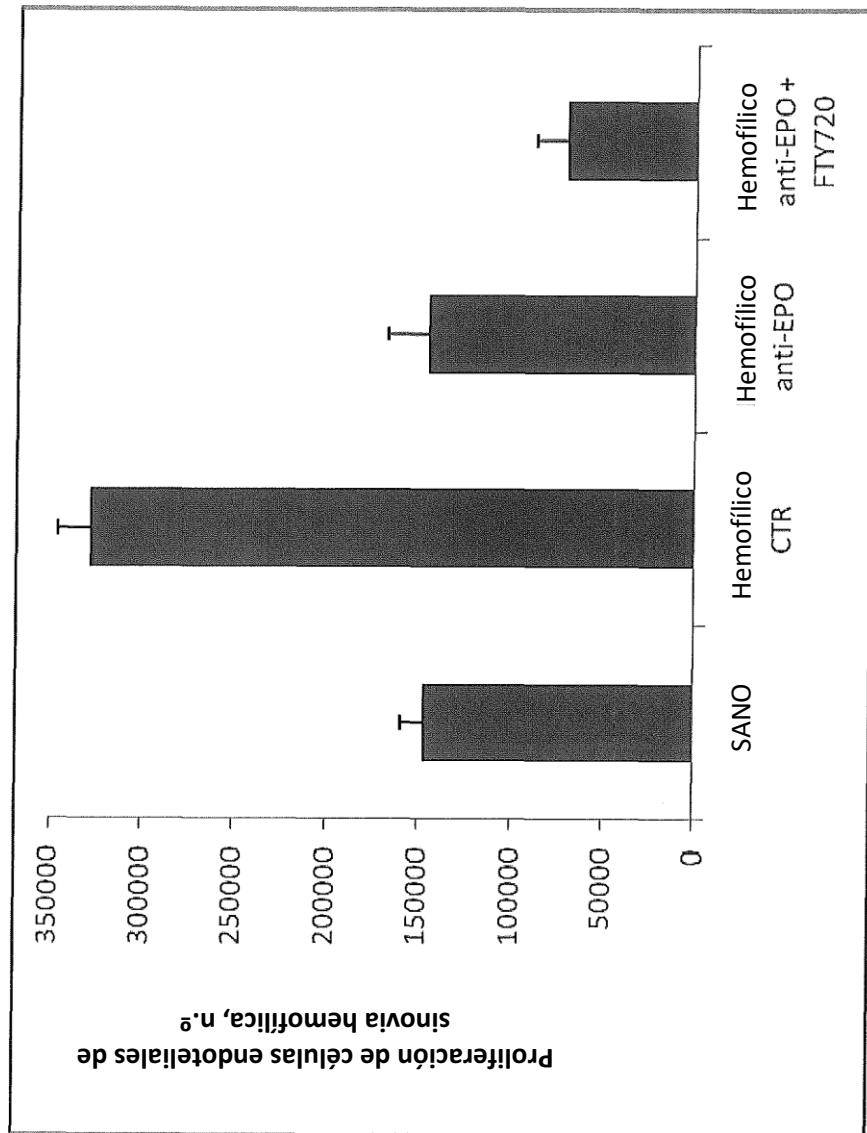


Fig. 40

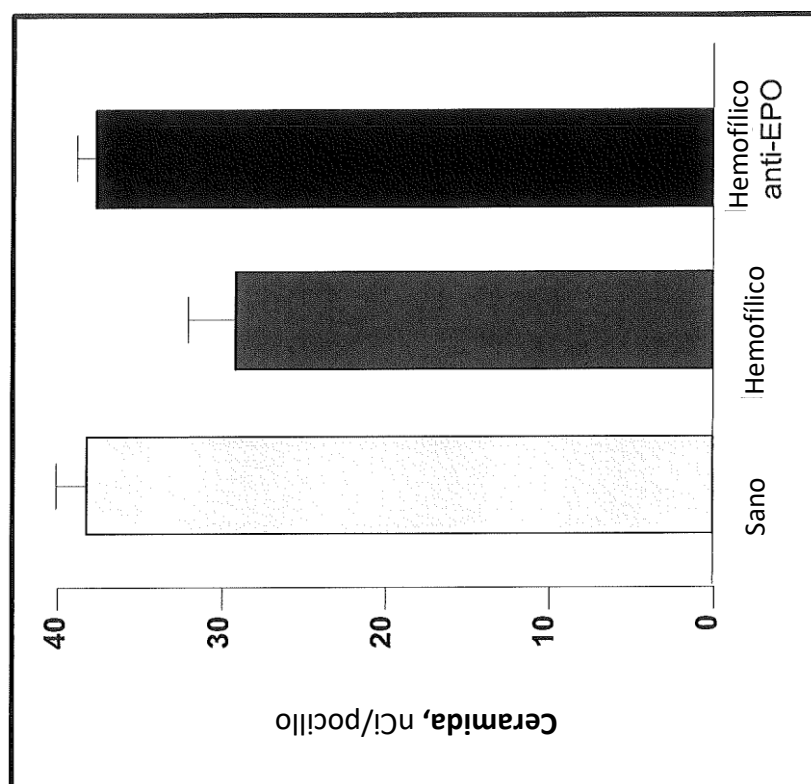


Fig. 41

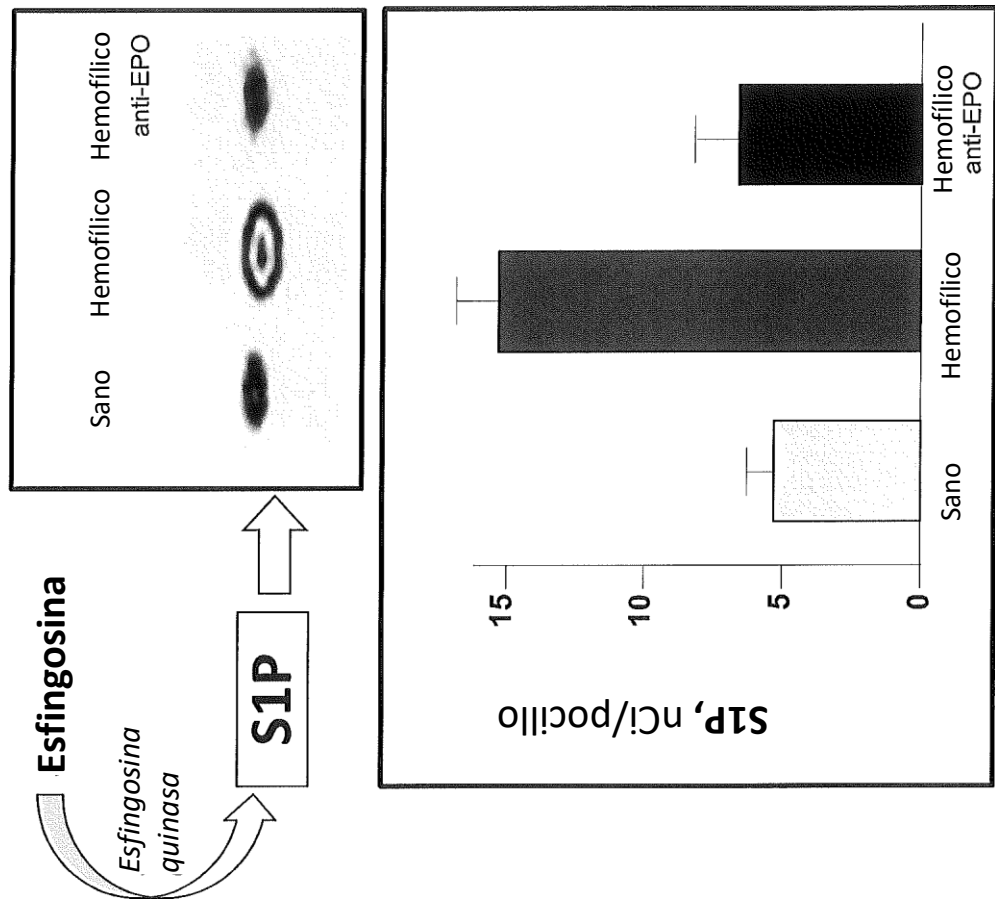


Fig. 42

