(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년08월19일
(11) 등록번호 10-2145999
(24) 등록일자 2020년08월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) *A61K 38/17* (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
G01N 33/569 (2017.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/395 (2013.01)
A61K 38/17 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-7003970
(22) 출원일자(국제) 2013년07월18일
심사청구일자 2018년06월27일
(85) 번역문제출일자 2015년02월13일
(65) 공개번호 10-2015-0047489
(43) 공개일자 2015년05월04일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2013/065245
(87) 국제공개번호 WO 2014/013036
국제공개일자 2014년01월23일
(30) 우선권주장
12176974.9 2012년07월18일
유럽특허청(EPO)(EP)
(56) 선행기술조사문헌
US20030170244 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
아포게닉스 아게
독일 69120 하이델베르그 임 노이엔하이머 펠트 584
(72) 발명자
프리케 하랄드
독일 68169 만하임 젠트쉬트라쎄 12
퐁트니 미카엘라
프랑스 에프-75013 파리 뤼 귀통 드 모르보 3
클라우디아 쿤쯔
독일 67363 루슈타트 슈파이어러 쉬트라쎄 1
(74) 대리인
리앤목특허법인

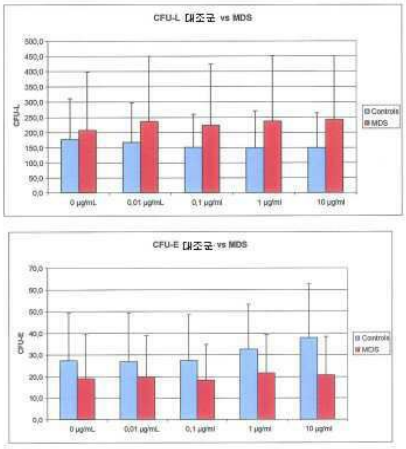
전체 청구항 수 : 총 7 항 심사관 : 김정태

(54) 발명의 명칭 **MDS 치료를 위한 CD95 신호전달 경로의 억제제**

(57) 요 약

본 발명은 골수이형성 증후군(MDS)의 치료에서 사용하기 위한 CD95 신호전달 경로의 억제제로서, 상기 MDS는 IPSS 저위험 MDS 서브그룹 및/또는 IPSS 중간-1(int-1) 위험 MDS 서브그룹으로부터 선택되는 것인 CD95 신호전달 경로의 억제제 및 MDS를 진단하는 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도7



(52) CPC특허분류
C07K 14/70575 (2013.01)
C07K 14/70578 (2013.01)
C07K 16/2875 (2013.01)
C07K 16/2878 (2013.01)
G01N 33/569 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

CD95 수용체 리간드 (CD95L)에 결합하는 CD95 신호전달 경로의 억제제를 포함하는, 골수이형성 증후군(MDS) 치료용 약학 조성물로서,

상기 MDS는 IPSS 저위험 MDS 서브그룹 및 IPSS 중간-1(int-1) 위험 MDS 서브그룹으로부터 선택되고,

상기 억제제는 APG101이고, APG101은 서열번호 1의 아미노산 26번 내지 172번을 갖는 CD95 도메인 및 서열번호 1의 아미노산 172번 내지 400번을 갖는 IgG1-Fc 도메인을 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 MDS 집단은 적혈구 생성 동안 증가된 아폽토시스를 특징으로 하는 것인 약학 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 MDS 집단은 과다한 모세포(blast) 없는 적혈구 생성의 중증 결함을 특징으로 하는 것인 약학 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 MDS 집단은 적혈구 생성 자극제(ESA) 또는 콜로니 자극 인자에 내성인 것을 특징으로 하는 것인 약학 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 담체, 희석제, 아쥬반트, 또는 이들의 임의의 조합을 더 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 적혈구 생성 자극제 및 아폽토시스 억제제에서 선택된 하나 이상의 추가적인 활성 성분을 더 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 50 내지 400 mg/주의 총량으로 투여되는 것인 약학 조성물.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 골수이형성 증후군(MDS)의 치료에서 사용하기 위한 CD95 신호전달 경로의 억제제로서, 상기 MDS는 IPSS 저위험 MDS 서브그룹 및/또는 IPSS int-1(intermediate-1) 위험 MDS 서브그룹으로부터 선택되는 것인 억제제 및 MDS 진단 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 골수이형성 증후군(Myelodysplastic syndrome, MDS)은 혈구 감소증, 특히, 빈혈을 초래하고, 종종 급성 골수성 백혈병(AML)으로 진행되는, 비정상적인(ineffective) 조혈을 특징으로 하는 클론성 조혈 줄기 세포 질환(clonal hematopoietic stem cell disorder)이다. 구체적으로, MDS는 결함있는 적혈구 전구세포(erythroid progenitor) 증식을 특징으로 한다. 따라서, MDS는 일반적으로 형태 및 혈액 및 골수 중 모세포(blast cell) 비율에 근거하여 분류된다 (French American British (FAB) and WHO classifications) (Bennett et al, 1982; Vardiman et al, 2009).

[0003] 조혈(erythropoiesis)은 골수 적아구성 집합(erythroblastic island) 중 가용성 인자와 세포-세포 상호작용의 관여를 보여주는 양성 신호와 음성 신호 간의 균형에 의해 제어된다. 조혈에 대한 개요가 도 1에 도시된다. $CD34^+$ 조혈 줄기 세포(HSC)의 적혈구 계통(erythroid lineage)으로의 결정(commiment)은 GATA-1과 같은 중요한 전사 인자 및 줄기 세포 인자(SCF), c-Kit 리간드와 같은 사이토카인의 제어 하에 있다. 적혈구 구획(erythroid compartment)의 크기는 CFU-E 및 전구-적아세포(pro-erythroblast)의 성숙을 촉진하고 그들의 아폽토시스를 방지하는 에리트로포이에틴에 의해 상향조절된다. 적혈구 세포는 막 CD71(transferring 수용체) 발현 및 뒤이어 보다 성숙한 세포 상에서 글리코포린(glycophrin) A(GPA)를 획득한다(도 1).

[0004] 적혈구 생성의 음성 조절은 성숙한 적혈구 전구 세포 상에서 발현되는 FasL과의 상호작용(De Maria et al, 1999) 및 분화의 동일한 단계에 적아세포의 자가조절(Socolovski et al, 2008)에 의해 Fas를 발현하는 미성숙 적아세포의 아폽토시스에 기여하는 Fas/FasL에 의존적이다. 정상적인 적혈구 전구체의 성숙은 카스파아제(caspase)-3의 활성화를 요구하나, 카스파아제-8 활성은 입증되지 않는다 (De Maria et al, 1999; Zermati et al, 2001). 카스파아제-3 기질의 절단은 제한된다. 예를 들면, GATA-1은 에리트로포이에틴 결핍의 조건에서 카스파아제-3의 기질이나, Epo의 존재 하에, GATA-1은 세포질로부터 핵으로 이동하는 Hsp70과의 상호작용에 의해 절단으로부터 보호된다 (Ribeil et al, 2007).

[0005] MDS 적혈구 이형성(dyserythropoiesis)은 Fas 하류의 카스파아제-8의 이소성 활성화(ectopic activation)와 연관된다. 출원인의 그룹 및 다른 그룹들은 이전에 Fas가 CD34+ 미성숙 전구 세포의 표면 및 적혈구로 정해진 전구세포(erythroid committed progenitor)에서 과발현된다는 것을 입증했다. GPA-양성 적혈구 전구세포에서 Fas 리간드 발현의 개시와 함께 적혈구 분화에 따라 Fas 발현이 증가되어, 적혈구 계통(erythroid lineage)에서 카스파아제-8의 이소성 활성화를 초래한다. 이는 새로운(fresh) 골수 세포(Bouscary et al, 1997) 및 2-단계 액체 배양에서 유래된 적혈구(erythroid cell) (Claessens et al, 2002)에서 관찰되었다. 어댑터 FADD의 렌티바

이러스에 의해 발현된(lentivirally expressed) 우성 음성 돌연변이체의 이소성 발현에 의한 Fas 신호전달의 억제는 카스파아제-8 활성화를 감소시켰고, MDS 적혈구 전구세포에서, 아폽토시스를 억제했다 (Claessens et al, 2005). Fas/FasL은 정상적인 적혈구 분화를 방지하고 MDS 적혈구에서 아폽토시스를 유도하는데 기여할 수 있다.

[0006] 최근 데이터는 적혈구 성숙이 저 등급 MDS에서 심각하게 손상된다는 것을 입증했다. 적혈구 전구세포는 Socolovski et al (2007)에 의해 기술된 CD71/GPA 표지화에 의해 정량되었다. 7일 후에, 정상 배양물 대비, MDS 세포 배양물에서 $CD71^{high}/GPA^{low}$ 세포의 비율은 증가되고 $CD71^{int}/GPA^{high}$ 비율은 감소되는 것으로 관찰되었다. 14일차 적혈구 전구세포의 전사체 연구(transcriptomic study)는GPA(glycophorin A)를 코딩하는 GYPA의 2배 감소된 발현을 보여주었다. 또한, 여러 다른 적혈구 유전자가 하향조절되었다.

[0007] MDS는 희귀 질환(rare disease) (발생율 3 내지 5/100,000명/년) 이고, 노인층(elderly)(연령 중앙값 65 내지 70세)에서 우세하다

[0008] 통상적으로, MDS는 고전적인 적혈구생성 자극제(ESA)의 투여에 의해 치료된다.

[0009] 그러나, 본 발명 이전에는, ESA에 내성인 MDS 환자는 치료하기 어려웠다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 따라서, 본 발명의 목적은 MDS에 대한 새로운 치료 옵션, 구체적으로, ESA에 내성인 MDS 환자의 치료를 위한 새로운 치료 옵션을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 제1 양태는 IPSS 저-위험 골수이형성 증후군(MDS) 서브그룹 및/또는 IPSS 중간 위험 서브그룹(int-1 risk MDS subgroup)으로부터 선택된, MDS의 치료에서 사용하기 위한 CD95 신호전달 경로의 억제제에 관한 것이다.

[0012] 본 발명에 따르면, 용어 CD95, CD95R 및 CD95-수용체는 호환가능하게 사용될 수 있다. 본 명세서에서 호환가능하게 사용될 수 있는 추가적인 동의어는 Apo-1 또는 Fas이다. 또한, 용어 CD95L, CD95-리간드 및 상응하는 동의어 FasL, Apo-1L, CD178 또는 TNF-SF6이 호환가능하게 사용될 수 있다.

[0013] 본 발명의 측면에서 "CD95 신호전달 경로의 억제제(inhibitor of the CD95 signalling pathway)"는 CD95 신호전달 경로를 적어도 부분적으로 방해하거나 또는 차단하는 화합물일 수 있다. 바람직한 구체예에 따르면, "CD95 신호전달 경로 억제제"는 CD95 신호전달 경로를 차단한다. CD95 신호전달 경로 활성을 결정 및/또는 평가하는 방법이 당해 기술 분야에서 당업자에게 알려져 있고, 예를 들면, Lavrik 등 (Cell Death Differ. 2012 Jan;19(1):36-41 Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC)에 의해 개시된다.

[0014] 본 발명에 따른 억제제는 단백질 수준 및/또는 핵산 수준에 작용할 수 있다. 단백질 수준에 작용하는 억제제는 항체, 단백질 및/또는 소형 분자로부터 선택될 수 있다. 핵산 수준에 작용하는 억제제는 예를 들면, 안티센스 분자, RNAi 분자 및/또는 리보자임(ribozyme)이다.

[0015] 특히 바람직한 구체예에 따르면, 상기 억제제는 CD95 수용체 (CD95) 및/또는CD95 리간드 (CD95L)에 결합한다. 다른 구체예에서, CD95/CD95L 상호작용이 억제될 수 있다.

[0016] 바람직한 구체예에서, 본 발명에 따른 억제제는 항체 또는 그의 기능성 단편(functional fragment)이다. 항체인 억제제는 CD95에 결합하나, 물론, CD95L에도 결합할 수 있다. CD95L에 결합하는 항체의 예는 Nok-1이다.

[0017] 항체는 예를 들면, 단일클론 항체, 다중클론 항체, 재조합 항체, 인간화 항체, 인간 항체, 키메라 항체, 다중-특이적(multi-specific) 항체, 또는 그의 항체 단편 (예를 들면, Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')2 단편, Fv 단편, 디아바디(diabody), 또는 단쇄 항체 분자)일 수 있다. 항체는 IgG1-, IgG2-, IgG3- 또는 IgG4-타입일 수 있다.

[0018] 항체는 변형되거나 또는 변형 없이 이용될 수 있고, 공유결합에 의해 또는 비-공유적으로(non-covalently), 예를 들면, 리포터 그룹 또는 효능자 그룹(effector group)으로 표지될 수 있다.

[0019] 본 발명에 따른 "항체 단편(antibody fragment)"은 상응하는 항체와 본질적으로 동일한 에피토프 결합 부위를 제시하고 및/또는 상응하는 항체와 실질적으로 동일한 CD95 및/또는 CD95L 억제 활성을 갖는다.

[0020] 본 발명의 항체 제조 방법은 당업자에게 알려져 있다.

[0021] 본 발명에 포함되는, 한 종류의 억제제는 CD95-리간드 억제제일 수 있다. 예를 들면, CD95-리간드 억제제는 (a) 전술된 바와 같은 억제성 항-CD95 리간드 항체 또는 그의 단편; (b) 가용성 CD95 수용체 분자 또는 그의 CD95-리간드 결합 부분; 및 (c) FLINT, DcR3 또는 그의 단편으로부터 선택된 CD95-리간드로부터 선택될 수 있다.

[0022] 가용성 CD95 수용체 분자, 예를 들면, 막관통 도메인(transmembrane domain)이 없는 가용성 CD95 수용체 분자가 EP-A-0 595 659 및 EP-A-0 965 637에 기재되거나 또는 CD95 수용체 펩티드가 WO 99/65935에 기재된다.

[0023] Fas 리간드 억제제 FLINT 또는 DcR3 또는 단편, 예를 들면, 그의 가용성 단편, 예를 들면, 선택적으로 이종 기원(heterologous) 폴리펩티드, 특히, Fc 면역글로불린 분자에 융합된 세포외 도메인이 WO 99/14330 또는 WO 99/50413에 기재된다. FLINT 및 DcR3은 CD95 리간드에 결합할 수 있는 단백질이다.

[0024] 다른 구체예에서, 억제제는 구체적으로, CD95L에 결합하는 융합 단백질이다.

[0025] 일 구체예에서, CD95L 억제제는 CD95R 분자의 세포외 도메인, 예를 들면, 미국특허 제5,891,434호에 따른 성숙 CD95 서열의 1번 내지 172번 아미노산(MLG . . . SRS)을 포함한다. 이 CD95R 분자의 세포외 도메인은 이종 기원 폴리펩티드 도메인, 특히, 힌지 영역(hinge region), 예를 들면, 인간 IgG1 분자로부터의 힌지 영역을 포함하는 Fc 면역글로불린 분자에 융합될 수 있다. 세포외 CD95 도메인 및 인간 Fc 도메인을 포함하는 융합 단백질이 WO 95/27735에 기재된다.

[0026] 따라서, 바람직한 구체예에 따르면, CD95L에 결합하는 작용제는 세포외 CD95 도메인 및 Fc 도메인, 특히, 인간 Fc 도메인을 포함하는 융합 단백질이다.

[0027] 특히 바람직한 구체예에 따르면, CD95L에 결합하는 작용제는 APG101 또는 그의 기능성 단편, 이소형, 및/또는 유도체이다. APG101은 도메인 CD95R (아미노산 26-172; ECD 세포외 도메인) 및 IgG1-Fc (서열번호 1의 아미노산 172-400)를 포함한다. APG101 및 그의 유도체가 WO95/27735 및 WO2004/085478에 개시된다.

[0028] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 억제제는 핵산 효능자 분자(nucleic acid effector molecule)이다. 핵산 효능자 분자는 DNA; RNA, PNA 또는 DNA-RNA-하이브리드일 수 있다. 이는 단일가닥이거나 또는 이중가닥일 수 있다. 레트로바이러스, 아데노바이러스, 헤르페스 또는 백시니아 바이러스로부터 또는 다양한 박테리아 플라스미드로부터 유래된 발현 벡터가 표적 기관, 조직, 또는 세포 집단으로의 뉴클레오티드 서열의 전달을 위해 이용될 수 있다. 이러한 구조체(construct)는 비번역(untranslatable) 센스 또는 안티센스 서열을 세포 내로 도입하기 위해 이용될 수 있다. DNA로의 통합(integration)의 부재 시에도, 이러한 벡터는 그들이 내생 뉴클레아제(endogenous nuclease)에 의해 불능화될 때까지, RNA 분자를 지속적으로 전사할 수 있다. 일시적 발현은 비-복제 벡터(non-replicating vector)에 의해 1개월 이상 지속될 수 있고, 적절한 복제 요소가 벡터 시스템의 일부인 경우, 훨씬 더 긴 기간 동안 지속될 수 있다.

[0029] 핵산 효능자 분자는 구체적으로, 바람직하게는 CD95R 및/또는 CD95L 유전자의 발현을 억제할 수 있는 안티센스 분자, RNAi 분자 및 리보자임으로부터 선택될 수 있다.

[0030] 전술된 바와 같이, 본 발명은 구체적으로, IPSS(International Prognostic Scoring System) 저위험 MDS(Myelodysplastic Syndrom) 서브그룹 및/또는 IPSS int-1(intermediate-1) 위험 MDS 서브그룹으로부터 선택된, 골수이형성 증후군(MDS)의 치료에 관한 것이다.

[0031] IPSS는 당업자에게 잘 알려져 있다. AML로의 진행 및 생존율에 대한 MDS의 주요한 예후 인자는 혈구감소의 수 및 중요성, 골수 모세포(marrow blast)의 비율 및 골수 세포유전학적 이상(cytogenetic abnormalities)을 포함한다. 각 지표는 그의 중증도에 따라 평가되고, 그 평가(rating)가 "점수(score)", IPSS로 통합된다.

[0032] IPSS는 AML로의 진행 및 생존율의 유의성 있게 상이한 위험에 따라 4개의 서브그룹으로 구분된다: 저(low)위험, 중간-1(int-1) 위험, 중간-2(int-2) 위험 및 고위험. 저위험 및 int-1 위험 서브그룹은 종종 함께 ≪유리한(favourable)≫ 또는 저위험 MDS로 그룹핑되고, int-2 위험 및 고위험 서브그룹은 ≪불리한(unfavourable)≫ 또는 고위험 MDS이다 (Greenberg et al, 1997).

[0033] 저위험 MDS (저 IPSS 또는 int-1 IPSS)는 주로 혈구 감소증을 초래하는 골수 전구세포(marrow progenitor)의 증가된 아폽토시스를 특징으로 한다. 대부분의 환자에서, 적혈구(erythroid cell)는 손상된 분화 및 증가된 아

폽토시스를 보인다.

[0034] 따라서, 본 발명에 따라 치료될 MDS 서브그룹, 즉, 저위험 또는 int-1 IPSS를 갖는 MDS 서브그룹은 적혈구 생성 동안 증가된 아폽토시스를 특징으로 할 수 있다.

[0035] 추가적인 구체예에 따르면, MDS 서브그룹은 또한 과량의 모세포 없는 적혈구 ㅅ새생성의 심각한 결함을 특징으로 할 수 있다.

[0036] 치료될 MDS 그룹을 규정하는 또 다른 특징은 고전적인 ESA(erythropoiesis stimulating agent) 및/또는 콜로니 자극 인자에 대한 내성일 수 있다. 본 발명에 따른 적혈구생성 자극제는 적혈구 생성을 자극하는 화합물일 수 있다. ESA 및/또는 콜로니 자극 인자의 예는 에르트로포이에틴(Epo), 에포에틴 알파(Procrit/Epogen), 에포에틴 베타(NeoRecormon), 다르브에포에틴 알파(Darbepoetin alfa)(Aranesp), 메톡시 폴리에틸렌 글리콜-에포에틴 베타 (Mircera) 및/또는 IL-3 또는 IL-9와 같은 일부 사이토카인을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0037] 치료 대상 MDS 서브그룹은 낮은 BFU-E(burst forming unit-erythroid) 값 및/또는 낮은 CFU-E(colony-forming unit-erythroid) 값을 특징으로 할 수 있다.

[0038] 물론, 앞서 검토된 특징들은 치료 대상 MDS 서브그룹을 기술하기 위해 임의의 조합으로 결합될 수 있다.

[0039] 앞서 기술된 MDS 서브그룹을 염두에 두고, 본 발명의 추가적인 구체예는 BFU-E의 숫자를 증가시키고, CFU-GM(colony-forming-unit-granulocyte monocyte)에 영향을 미치지 않고 및/또는 백혈병 세포 확장(leukemic cell expansion)의 위험을 증가시키지 않는 억제제의 용도에 관한 것이다. 바람직하게는, 상기 억제제는 적혈구 전구 세포의 증식(성장)을 개선하는 화합물일 수 있다.

[0040] 본 발명에 따라 사용되는 CD95 신호전달 경로의 억제제는 약제학적 조성물로제공될 수 있다. 이 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체, 희석제, 및/또는 아쥬반트 등을 포함할 수 있다.

[0041] 제제 및 투여에 관한 기법에 대한 추가적인 세부사항은 Remington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing Co., Easton, Pa.)의 최근 판에서 확인할 수 있다.

[0042] 본 발명에서 이용되는 약제학적 조성물은 경구, 정맥내, 근육내, 동맥내, 수질내(intramedullary), 경막내(intrathecal), 뇌실내(intraventricular), 경피, 피하, 복강내(intraperitoneal), 비강내(intranasal), 장관(enteral), 국부, 설하, 또는 직장 수단을 포함하나, 이에 한정되지 않는 다수의 경로에 의해 투여될 수 있다.

[0043] 본 발명에서 사용하기에 적합한 약제학적 조성물은 활성 성분이 의도된 목적을 달성하기 위한 유효량으로 포함된 조성물을 포함한다. 유효량의 결정은 당해 기술 분야에서 당업자의 능력 내에 충분히 속한다. 치료적으로 유효한 용량(therapeutically effective dose)은 특정한 질환을 치료하기에 충분한, 활성 성분, 예를 들면, 본 발명의 핵산 또는 단백질, 또는 항체의 양을 의미한다. 정확한 용량은 치료를 필요로 하는 개체와 관련된 인자들을 고려하여, 임상의에 의해 결정될 것이다.

[0044] 용량 및 투여는 활성 모이어티(moiety)의 충분한 수준을 제공하거나 또는 원하는 효과를 유지하도록 조정된다. 당해 기술 분야의 당업자는 활성 모이어티의 충분한 수준을 제공하고 및/또는 원하는 효과를 유지하는 추가적인 방법을 알고 있다. 고려될 수 있는 인자들은 질병 상태의 중증도, 개체의 전반적 건강, 개체의 연령, 체중 및 성별, 식생활(diet), 투여 시간 및 빈도, 약물 조합, 반응 민감도, 및 치료에 대한 내성(tolerance)/반응을 포함한다. 바람직한 구체예에서, MDS를 앓는 환자에게 투여되는 본 발명에 따른 CD95 신호전달 경로의 억제제의 총량은 약 50 내지 약 400 mg/주, 보다 바람직하게는 약 100 내지 약 200 mg/주이다. 바람직한 주당 투여량은 단일 투여량 또는 복수 투여량으로 투여될 수 있다. 특히 바람직한 것은 단일 투여량, 구체적으로, 단일 투여량으로 정맥내로 투여되는 100 내지 200 mg/주이다.

[0045] 치료는 수주 동안 지속될 수 있다. 각각의 개별적인 경우에, 치료의 지속기간(duration)은 주치의(supervising doctor)에 의해 결정되고, 예를 들면, 치료의 성공률, 부작용의 발생률 등에 기초한다.

[0046] 본 발명의 추가적 양태에 따르면, 이 약제학적 조성물은 하나 이상의 추가적 활성 성분, 예를 들면, MDS의 치료를 위해 통상적으로 사용되는 작용제, 예를 들면, 5-아자시티딘, 데시타빈, 또는 레날리도마이드(Lenalidomide), 적혈구 생성 자극제 및/또는 아폽토시스 억제제를 포함할 수 있다.

[0047] 적혈구 생성 자극제의 예는 앞서 특정되었다.

[0048] 아폽토시스 억제제의 예는 카스파아제 억제제, 예를 들면, xIAP, c-IAP-1, c-IAP2, 수비빈(Survivin), TNF-α

억제 화합물, 예를 들면, 레블리미드(Revlimid), 포말리도마이드(Pomalidomide), Bcl-2 패밀리 단백질 억제제 등을 포함한다.

[0049] 본 발명의 추가적 양태는 본 발명의 측면에서 억제제를 포함하고, 적혈구생성 자극제, 특히, 앞서 정의된 바와 같은, 적혈구 생성 자극제를 더 포함하는 약제학적 조성물이다.

[0050] 본 발명의 추가적 양태는 시료 중 CD95L 발현을 결정하는 단계를 포함하는, MDS 진단 방법으로서, CD95L 과발현은 MDS를 예측하는 것인 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법의 추가적 단계는 특히, 결정된 CD95L 발현 값을 MDS가 아닌 기원의 빈혈을 앓는 환자의 시료로부터의 값과 같은 대조값과 비교하는 것일 수 있다.

[0051] 물론, 본 발명의 진단 방법은 IPSS 시스템과 같은 공지된 방법과 결합될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0052] **도 1**: 적혈구 생성의 개요. HSC: 조혈 줄기 세포(hematopoietic stem cell). BFU-E: 적아군 형성 단위(burst forming unit-erythroid), CFU-E: 적혈구 콜로니 형성 단위(colony forming unit-erythroid), PER: 전 적혈구 모세포(proerythroblast), ERB: 호염기성 적모세포(basophilic erythroblast), ERP: 다염성 적모세포(polychromatophilic erythroblast), ERA: 호산성 적모세포(acidophilic erythroblast), reticulo: 망상 적혈구(reticulocyte), RBC: 적혈구(red blood cell), SCF: 줄기 세포 인자(stem cell factor), EPO: 에리트로포이에틴(erythropoietin).

도 2: 정상 적혈구 생성 및 MDS 적혈구 생성의 음성 조절. 정상 적혈구 생성은 FasL-발현 성숙 세포에 의해 매개되는 미성숙 전구 세포(immature progenitor)의 Fas-의존성 아폽토시스를 통한 증식의 음성 조절에 의해 제어된다(청색 화살표). MDS에서, Fas 및 FasL은 과발현되어 과다하고 부적합한 아폽토시스를 초래한다(적색 화살표).

도 3: 적혈구 생성 동안 Fas 및 FasL의 역할/농축

도 4: MDS, sAML 및 대조군(control)에서 FasL 발현. 4a. FasL RFI의 분포. 4b. MDS를 대조군과 비교한 ROC 분석.

도 5: 전체 생존율(overall survival)에 대한 진단시 $CD45^{lo}/CD34^{+}$ 세포에서의 Fas 발현의 영향.

도 6: 메틸셀룰로오스 배양의 14일차에 BFU-E 및 CFU-GM 성장에 대한 APG101의 효과.

도 7: 메틸셀룰로오스 배양의 7일차에 CFU-E 및 CFU-L 성장에 대한 APG101의 효과.

도 8: 5일차에 액체 배양물로부터 유래된 BFU-E 및 CFU-GM 성장에 대한 APG101의 효과.

도 9: 적혈구 전구 세포의 액체 배양에서 분화기(differentiation phase)에 첨가된 APG101의 효과.

도 10: 적혈구 세포 분화에 대한 APG101의 효과. 상단: MGG 착색된 사이토스핀(coloured cytospin). 하단: CD71/GPA 이중 표지화(double labelling)의 유동 세포측정법 분석.

도 11: BFU-E 성장에 대한 APG101의 효과. Fas-양성 MDS와 Fas-음성 MDS 간의 비교.

도 12: CD45low 세포에 대한 FasL 발현에 따른 APG101의 효과.

도 13: 기준시점(baseline)에 CFU-L 및 BFU-E 성장에 따른 BFU-E에 대한 APG101의 효과.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0053] **재료 및 방법**

[0054] 랩 재료(**Lab Materials**)

표 1

[0055]

설명	로트(Lot)	공급자
CD95리간드 (CD95L-T4)의 안정한 정제된 삼량체(trimer) APG101		Apogenix

사이토카인 SCF, IGF-1	SCF 02630 IGF-1	Promega SIGMA
메틸셀룰로오스	04100	Stem Cell technologies
배양 배지 IDMD glutamax	31980-022	Invitrogen
형광색소-표지된 항체 및 단백질	CD95 클론 UB2 IM1506 CD235a (GPA) 클론 11E4B IM2212 CD71 클론 YDJ1.2.2 IM0483	Beckman Coulter

[0056] **골수 시료**

[0057] 정상 및 MDS 골수 시료를 파리, 코친(Cochin) 병원의 환자 및 Prof. M. Fontenay에 의해 조직화된 다기관 생물연구(multicenter biological study)와 연관된 관련 부서들로부터 흉골 흡인에 의해 수집하였다. 환자들은 지역 윤리 위원회의 권고에 따라 골수 흡인 전에 세포 생물학 및 유전학 연구에 대한 사전 동의서를 제출했다.

[0058] **기구**

표 2

[0059]

명칭	내부 식별 번호(Internal Identification Number)
MIDI Macs 컬럼	Milteny Biotech
FC 500 유동 세포측정기	Beckman Coulter
인큐베이터 (5% CO_2, 37℃)	Jouan
현미경	Zeiss

[0060] **방법**

[0061] 관련 **SOP**

[0062] 랩의 현재의 SOP는 200년에 M. Fontenay 및 C. Lacombe에 의한 Guide de Bonne Execution des Aanlyses de Bioloige medicale를 참조하고 인증된다.

표 3

[0063]

SOP	Nr.	발표 일자
CD34+ 세포 단리	GBEA2v1	01/02/2002
적혈구 전구 세포 배양	GBEA2v1	01/02/2002
메틸셀룰로오스 분석	GBEA1v1	01/02/2002

[0064] **도구 및 플랫폼**

[0065] - APG101 Fas-Fc 키메라 (Apogenix): Fas-의존성 아폽토시스의 억제제; Apogenix GmbH에 의해 제공됨.

[0066] - CD95L-T4: Apogenix에 의해 제공된 Fas의 삼량체 리간드(trimeric ligand)

[0067] - 적혈구 세포 배양을 기술된 바와 같이 수행했다: 골수 $CD34^+$ 세포를 MIDI Macs 컬럼에서 단리하고, $CD34^+$ 세포의 적혈구 계통(erythroid lineage)으로의 결정(commitment)을 유도하고 적혈구 세포 증식을 표적화하기 위해, SCF, Epo, IGF-1, 및 덱사메타손에서 배양하였다. 10일 후에, 세포를 Epo 및 인슐린 함유 배지로 전환시키는 것에 의해 적혈구 세포 말단 성숙(terminal maturation)을 수득한다.

[0068] - 인 비트로 액체 배양 동안 적혈구 성숙을 정량하기 위해 유동 세포측정법(flow cytometry)을 이용했다.

[0069] **프로토콜**

[0070] **유동 세포측정법(Flow cytometry)**

[0071] 세포의 소집단(subpopulation)을 CD71 (트랜스페린 수용체) 및 글리코포린(glycophorin) a (GPA CD235a)에 대한 단일클론 항체를 이용하여 이중 표지화하는 것에 의해 식별하였다. 성숙의 상이한 단계는 CD71-/GPA-, CD71+/GPA-, CD71+/GPA+ 세포 및 마지막으로 CD71-/GPA+ 세포였다. 막 Fas 발현을 CD95 표지화 및 동형 대조(isotypic control) 대비 중앙(median) 형광 강도의 비(RFI)로서의 표현에 의해 정량하였다. 컷오프 값의 범위에 대한 진정한 양성 비와 위 양성 비 간의 관계의 그래프 표현인 ROC(receiver operating curve) 분석을 이용하여 132명의 MDS를 25명의 대조군에 비교하여, 양성도(positivity)의 역치(threshold)가 1.8의 RFI라는 것을 입증했다. 아폽토시스는 아넥신(Annexin) v/7-AAD 표지화에 의해 측정했다. 시료를 FC500 장치(Beckman Coulter)에서 분석하였다.

[0072] **세포 단리 및 배양**

[0073] 환자 및 건강한 대조군 개체로부터의 골수 시료를 흉강 흡인에 의해 수집하고 CD34+ 세포를 MIDI-MACS 면역친화도 컬럼(Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) (Claessens et al, 2002)에서 정제하였다(> 85% CD34+ 세포) . 정제된 CD34+ 세포를 20% BIT (bovine serum albumin, insulin, holotransferrin), 및 적합한 사이토카인: 50 ng/mL 줄기 세포 인자 (SCF), 1 IU/mL 에리트로포이에틴 (Epo), 40 ng/mL 인슐린-유사 성장 인자 1 (IGF-1), 및 10^{-6} M 덱사메타손 배양의 10일차까지, 및 그 후, 1 IU/mL Epo 및 10^{-6} M 인슐린을 포함하는 DMEM(Dulbecco modified Eagle medium)에서 배양하였다. 배양 단계의 개요가 도 3에 표시된다. 세포들은 10일차까지 활발하게 분열하고 적혈구 성숙은 거의 보이지 않았다. 사이토카인을 교체한 후, 대부분의 세포는 14일차까지 적모세포(erythroblast)로 분화되었다.

[0074] **정상 적혈구에서 CD95L-T4에 의한 아폽토시스의 유도**

[0075] 정상 적혈구를 CD95L-T4의 증가되는 농도로 처리하였다. 주어진 농도에서, 적혈구 결정(erythroid cell commitment)의 초기 단계에 첨가된, CD95L-T4의 적혈구 증식(적혈구 전구 세포의 BFU-E 및 전체 증식)에 대한 영향을 측정하였다. 적혈구 성숙(erythroid maturation)에 선행하는 카스파아제-3 활성화의 개시(onset) 전에 첨가된 CD95L-T4의 영향을 테스트하였다. 카스파아제-3 및 표적을 유동 세포측정법 및 웨스턴 블롯 분석에 의해 추적하였다.

[0076] 사람에서 11 nM 결합 친화도를 갖는 CD95L-T4/APG101 복합체의 1/1 화학량론(stoechiometry)을 고려하여, 배양물 중 테스트되는 CD95L-T4 및 APG101의 농도는 동일한 범위에 있었다 (0.01 내지 10 ㎍/ml).

[0077] **정상 적혈구에서 APG101에 의한 CD95L-T4-유도 아폽토시스의 억제**

[0078] 정상 적혈구을 적혈구 증식의 초기 또는 분화의 후기 또는 양자 모두에 CD95L-T4의 이전에 정해진 농도에 의한 처리 전에, 증가되는 농도의 APG101로 사전-처리하였다. 중요하게, 기준시점에 아폽토시스의 높은 수준을 갖는 시료에서 CD95L-T4 첨가를 피했다. 전체 적혈구 증폭, BFU-E 증가, 아폽토시스, 카스파아제-3 활성, 카스파아제-3 표적 절단, 및 분화 (GPA, cytology)에 대한 APG101의 효과를 평가했다.

[0079] **APG101에 의한 MDS 적혈구 아폽토시스의 억제**

[0080] 증가되는 농도의 APG101 (0.001 내지 100 ㎍/ml)을 하기에 대해 테스트했다:

[0081] - 클론원성 분석(clonogenic assay)에서 BFU-E의 수

[0082] - 증폭의 속도

[0083] - 아폽토시스 (카스파아제-3 활성, 포스파티딜세린 노출, 카스파아제-3 표적)

[0084] - 적혈구 분화 (GPA/CD71, 세포학적 검사, 마이크로어세이 중 적혈구 유전자 발현).

[0085] Fas는 골수 $CD34^+$ 세포 분획에서 과발현되는 것으로 이전에 확인되었다. 따라서, 각 계통에 대해 특정한 배양 조건에서 MDS 시료 중 적혈구와 과립구 전구 세포(granulocytic progenitor cell)간의 비교를 수행했다. APG101에 의한 처리가 카스파아제-3 활성의 정상 동역학(kinetics)을 회복하고 카스파아제-3 표적 절단(cleavage)을 예방하는지 여부를 테스트했다.

[0086] **메틸셀룰로오스 분석(Methylcellulose Assay)**

[0087] Ficoll 구배 후 골수 흡인물(bone marrow aspirate)로부터 단리된 단핵 세포를 우태아혈청, BSA 및 사이토카인(10^6 세포/ml의 농도에서 IL3 0.1 UI/ml, IL6 10 ng/ml, GM-CSF 5 ng/ml, EPO 1 UI/ml, 및 SCF 20 ng/ml)을 포함하는 0.8% 메틸셀룰로오스에 접종하였다. 배양 7일차에 CFU-E 및 CFU-L을 계수하고, 14일차에 BFU-E 및 CFU-GFM을 계수하였다. 증가되는 농도의 APG101을 첨가했다.

[0088] **통계치**

[0089] 생물학적 데이터를 중앙값(median value) ± 평균의 표준 오차로 분석하였다. Fas 및 FasL에 대한 유동 세포측정법의 민감도(sensitivity) 및 특이성(specificity)을 ROC(Receiver Operating Curve)로 평가하고 역치 값을 추론했다. 연속 변수(continuous variable)를 Student t-검정으로 비교했다(Excel 2003 software, Microsoft). 연구 대상 집단의 2개의 서브 그룹에서, 시간의 경과에 따른 전체 생존율(overall survival)에 대한 Fas 및 FasL의 영향을 평가하기 위해 Kaplan-Meier 추정량(estimator)을 이용하고, Log-Rank 검정으로 비교했다. 모든 통계 분석은 양측(2-sided)이었고, 0.05 미만의 P-값을 유의한 것으로 간주하였다. GraphPad 소프트웨어를 이용하여 통계 분석을 수행했다.

[0090] **결과**

[0091] **FasL 발현 및 MDS 진단**

[0092] 84명의 MDS, 21명의 sAML 및 17명의 대조군에서 CD45low/CD34+ 및 CD71+ 골수 세포 집단 모두에서 FasL의 발현을 측정했다. FasL은 sAML이나 대조군보다 MDS에서 훨씬 더 많이 상승되고(도 4a), ROC에 따르면, 양성도(positivity)의 역치는 6이었다. MDS를 대조군에 비교할 때, MDS와 대조군을 구별하기 위한 FasL 발현의 예측값(predictive value)은 우수했다(곡선하 면적(area under the curve):0.73; P=0.002; 도 4b).

[0093] Fas 또는 Fas 발현의 예후에 대한 영향을 분석하기 위해, 진단시 Fas 발현의 알려진 값을 갖는 166명의 MDS 또는 sAML 환자 및 진단시 FasL의 알려진 값을 갖는 42명의 MDS/sAML 환자에 대해 임상 정보를 수집하였다. 166명의 MDS 환자 그룹에서, 41%가 Fas에 대해 양성이었고, 연령, 성별, 혈액상(hemogram) 파라미터, % 골수 모세포(bone marrow blast), 다계통 형성이상(multilineage dysplasia), 핵형, IPSS 및 치료의 측면에서 어떠한 차이도 보이지 않았다. Fas 발현은 전체 생존율에 대한 영향이 없었다(도 5). 또한, Fas 발현은 EPO에 대한 반응에 대해 예측적이지 않았다.

[0094] MDS/sAML을 갖는 42명의 환자의 그룹에서, 18명의 환자는 FasL에 대해 양성이었다(RFI≥5). Hb 수준 및 전체 생존율(overall survival)의 중앙값이 FasL-양성 및 FasL-음성 환자에서 동등했다 (각각, P=0.57 및 P=0.97). 또한, 환자의 작은 코호트(cohort)(n=22)에서 FasL 발현은 치료에 대한 반응에 대해 예측적이지 않았다.

[0095] 요약하면, 이러한 데이터는 Fas 및 FasL이 MDS에서 과발현되고, FasL 과발현이 MDS에 대해 예측적이라는 것을 보여준다. Fas-발현이나 FasL-발현 중 어느 것도 전체 생존율에 대한 예후적 파라미터(prognostic parameter)가 아니다.

[0096] **조혈 전구세포 성장에 대한 APG101의 효과**

[0097] 연구는 과량의 가용성 Fc(Fas: Fc)에 의한 FasL의 차단 및 어댑터 FADD의 우성 음성 형태(dominant negative form)의 이소성 발현을 통한 Fas 신호전달의 중단이 BFU-E 성장을 구제했다는 것을 보여주었다. 메틸셀룰로오스 분석에서 적혈구 및 과립구-단핵구 전구세포(erythroid and granulo-monocytic progenitor)에 대한 증가되는

농도의 APG101(0, 0.01, 0.1, 1, 10 ㎍/ml)의 효과를 분석했을 때, APG101은 CFU-GM 성장을 자극하지 않았으나, BFU-E에 대한 적당한(moderate) 양성 효과가 검출되었다는 것이 명백해졌다(도 6).

[0098] 또한, 성숙 적혈구 전구 세포 성장(CFU-E) 및 백혈병 모세포(leukemic blast)의 반응에 대한 APG101의 효과를 메틸셀룰로오스 배양의 7일차에 CFU-L(50개 이상의 비-적혈구 클러스터)의 수를 계수하는 것에 의해 분석하였다(도 7). 심지어 RAEB2 환자(진단시 10%보다 높은 모세포를 갖는 MDS)로부터의 시료에서도 APG101이 CFU-E 성장을 구제하지 않고 CFU-L의 수를 증가시키지 않는다는 것을 확인하였고, 이는 APG101이 백혈병 모세포(leukemic blast)의 성장을 자극하지 않는다는 것을 시사했다.

[0099] MDS 적혈구 생성에 대한 APG101의 효과에 대한 추가적인 이해를 얻기 위해, CD34+ 골수 세포를 MDS 환자로부터 단리하고 결정(commitment)를 위한 "적혈구 조건(erythroid condition)" 하에 접종하였다. BFU-E 및 CFU-GM의 수를 평가하기 위해, 세포를 액체 배양의 5일 차에 회수하고 메틸셀룰로오스에 접종하였다. 도 7에 도시된 바와 같이, 대조군에 비해 MDS에서 BFU-E의 초기 수(initial number)가 감소했다. APG101은 정상적인 수준에 도달하지 않고, BFU-E의 수의 3배 증가를 유도했다. CFU-GM은 BFU-E보다 덜 심각하게 손상되었고 APG101에 의해 영향받지 않았다. 이러한 결과는 적혈구 계통에 대한 APG101의 특이적 효과를 시사한다.

[0100] 적혈구 생성 동안 세포의 분화에 대한 APG101의 효과를 테스트하기 위해, FasL 발현의 개시와 일치하는, 배양이 Epo & 인슐린으로 전환되었을 때, 상이한 농도의 APG101을 세포 배양에 첨가했다. 배양의 14일 차에, 전체 세포 수가 평균 60% 증가했고, 아폽토시스는 최대 33% 감소한 것으로 보였다 (도 9).

[0101] APG101은 적혈구 분화에 대해 효과가 없었고, 보다 중요하게, 이는 세포 성숙을 차단하지 않았다 (도 10).

[0102] 이 약물로부터 효과를 볼 수 있는 환자의 그룹을 기술하기 위해, 초기 임상 및 생물학적 특징에 따라 메틸셀룰로오스 분석으로부터의 데이터를 재분석하였다. 메틸셀룰로오스 분석은 이전에 Epo에 대한 반응을 예측하는 유용한 도구로 입증되었고 적혈구 생성의 품질과 잘 상관되었다 (Frisan et al, 2010).

[0103] 먼저, 클론원성 분석을 Fas의 초기 발현에 따라 분석하였다. 도 11에 도시된 바와 같이, 10 ㎍/ml APG101의 존재 하에 BFU-E 성장의 개선은 Fas-양성 및 Fas-음성 환자에서 유의성 있게 다르지 않았다.

[0104] 그 후, FasL의 발현에 따라 APG101의 CD71-양성 집단에 대한 효과를 분석했다. 이 시리즈에서, 양성도의 역치는 2.8이었다. FasL-양성 MDS는 3.7의 중앙(median) fasL RFI를 가졌고, FasL-음성 환자는 2.2의 중앙 FasL RFI를 가졌다. APG101의 효과는 고-FasL-발현(high-Fa니-expression)을 보이는 FasL 양성 환자와 저-FasL-발현을 보이는 FasL-음성 환자 간에 다르지 않았다.

[0105] 세째로, BFU-E 성장에 대한 APG101의 효과와 진단시 CFU-L의 초기 성장 간의 가능한 상관관계를 파악했다. 과량의 백혈병 클러스터(leukemic cluster)를 갖는 환자에서, APG101은 BFU-E 성장을 구제하지 못했으나, CFU-L의 낮은 초기 성장을 가진 환자에서 BFU-E의 수를 매우 효율적으로 증가시켰다 (도 13, 상단).

[0106] 최종적으로, APG101은 보존된 적혈구 생성을 갖는 환자에서보다, 기준 시점에 적혈구 생성의 심각한 변형을 갖는 MDS 환자로부터의 골수 세포에서 보다 효율적으로 BFU-E 성장을 개선시켰다 (도 13, 하단).

[0107] **요약**

[0108] 적혈구 생성의 심각한 손상을 갖는, 저 등급 및 INT-1 등급 MDS 환자로부터의 조혈 줄기 세포(CD34+ 세포)의 인비트로 배양에서, APG101은 적혈구 성장을 구제한다는 것이 입증되었다. APG101은 백혈병 세포의 성장(leukemic cell expansion)을 촉진하지 않았고, 따라서, 백혈병 세포 확장의 위험을 증가시키지 않았다.

[0109] FasL의 과발현은 이 질병에 대해 예측적이었다. 그러나, Fas나 FasL 발현 중 어느 것도 전체 생존율에 영향을 갖는다는 것이 명확하게 입증되지 않았다.

[0110] Fas는 빈혈을 초래하는, 조혈 전구 세포의 아폽토시스 세포 사멸의 주요한 작용자(actor) 중 하나이다. 따라서, 가용성 Fas 수용체(즉, APG101)를 이용하여 Fas와 FasL 상호작용을 억제하는 것은 MDS 환자에서 적혈구 생성을 구제할 수 있었다.

[0111] APG101은 적혈구 생성의 심각한 결함을 가지나, 과량의 백혈병 모세포를 갖지 않는 MDS 환자의 서브그룹에서 적혈구 세포 성장을 구제한다. APG101은 CFU-L 계수에 의해 평가된 바와 같이, 백혈병 세포의 성장을 자극하지 않았으나, APG101은 진단시 과량의 CFU-L을 보이는 환자에서 BFU-E 성장을 구제할 수 없었다. 통합하면, APG101은

진단시 적혈구 생성의 심각한 손상을 갖고, 과량의 모세포를 갖지 않는 MDS 환자로부터의 조혈 줄기 세포에서 BFU-E 성장을 구제하는데 효과적이다. 이 환자들은 이전에 부분적으로 Fas의 과발현 및 높은 수준의 아폽토시스 때문에 적혈구 생성-자극제(ESA)에 내성인 것으로 식별되었다.

[0112] **문헌**

[0113] Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. Br. J. Haematol. 1982 Jun;51(2):189-199.

[0114] Bouscary D, De Vos J, Guesnu M, Jondeau K, Viguier F, Melle J, Picard F, Dreyfus F, Fontenay-Roupie M. Fas/Apo-1 (CD95) expression and apoptosis in patients with myelodysplastic syndromes.

[0115] Leukemia. 1997 Jun;11(6):839-45.

[0116] Carlile GW, Smith DH, Wiedmann M. Caspase-3 has a nonapoptotic function in erythroid maturation. Blood. 2004 Jun 1;103(11):4310-6.

[0117] Claessens YE, Bouscary D, Dupont JM, et al. In vitro proliferation and differentiation of erythroid progenitors from patients with myelodysplastic syndromes: evidence for Fas-dependent apoptosis. Blood. 2002; 99: 1594-1601.

[0118] Claessens YE, Park S, Dubart-Kupperschmitt A, Mariot V, Garrido C, Chretien S, Dreyfus F, Lacombe C, Mayeux P, Fontenay M. Rescue of early-stage myelodysplastic syndrome-deriving erythroid precursors by the ectopic expression of a dominant-negative form of FADD. Blood. 2005 May 15;105(10):4035-42.

[0119] De Maria R, Zeuner A, Eramo A, Domenichelli C, Bonci D, Grignani F, Srinivasula SM, Alnemri ES, Testa U, Peschle C. Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. Nature. 1999 Sep 30;401(6752):489-93.

[0120] Frisan E, Pawlikowska P, Pierre-Eugene C, Viallon V, Gibault L, Park S, Mayeux P, Dreyfus F, Porteu F, Fontenay M. p-ERK1/2 is a predictive factor of response to erythropoiesis-stimulating agents in low/int-1 myelodysplastic syndromes. Haematologica. 2010 Nov;95(11):1964-8.

[0121] Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, Sanz M, Vallespi T, Hamblin T, Oscier D, Ohyashiki K, Toyama K, Aul C, Mufti G, Bennett J. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. Blood. 1997 Mar 15;89(6):2079-88.

[0122] Liu Y, Pop R, Sadegh C, Brugnara C, Haase VH, Socolovsky M. Suppression of Fas-FasL coexpression by erythropoietin mediates erythroblast expansion during the erythropoietic stress response in vivo. Blood. 2006 Jul 1;108(1):123-33.

[0123] Ribeil JA, Zermati Y, Vandekerckhove J, Cathelin S, Kersual J, Dussiot M, Coulon S, Moura IC, Zeuner

A, Kirkegaard-Sorensen T, Varet B, Solary E, Garrido C, Hermine O. Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1. Nature. 2007 Jan 4;445(7123):102-5.

[0124] Socolovsky M, Murrell M, Liu Y, Pop R, Porpiglia E, Levchenko A. Negative autoregulation by FAS mediates robust fetal erythropoiesis. PLoS Biol. 2007 Oct;5(10):e252.

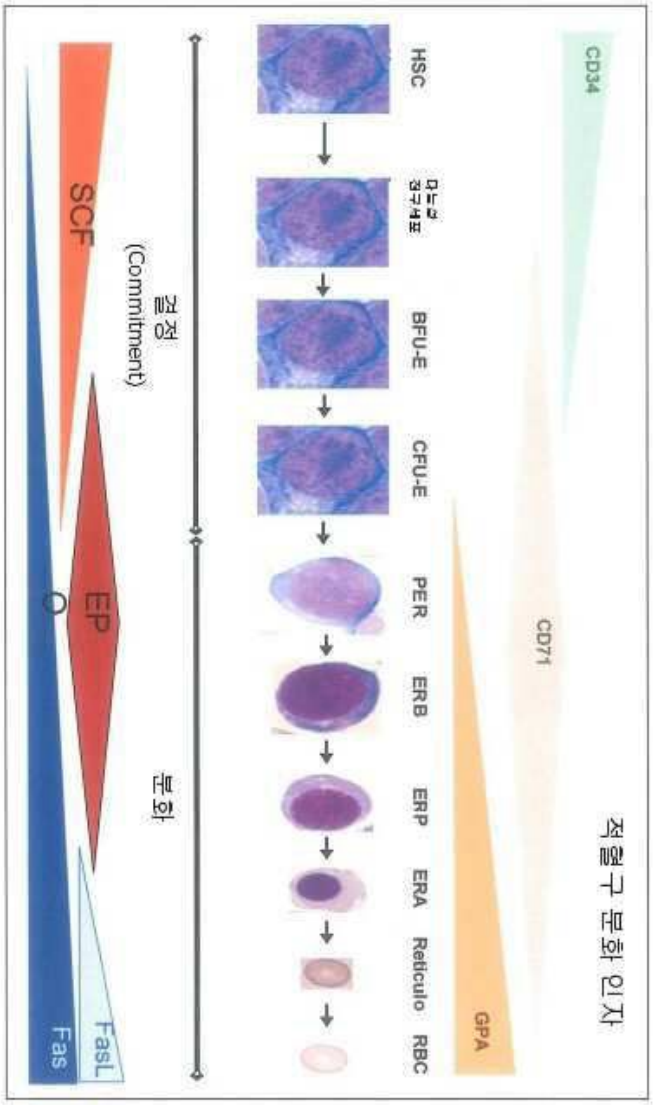
[0125] Tehranchi R, Fadeel B, Forsblom AM, et al. Granulocyte colony-stimulating factor inhibits spontaneous cytochrome c release and mitochondria-dependent apoptosis of myelodysplastic syndrome hematopoietic progenitors. Blood. 2003; 101: 1080-1086.

[0126] Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellstrom-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. Blood. 2009 Jul 30;114(5):937-51.

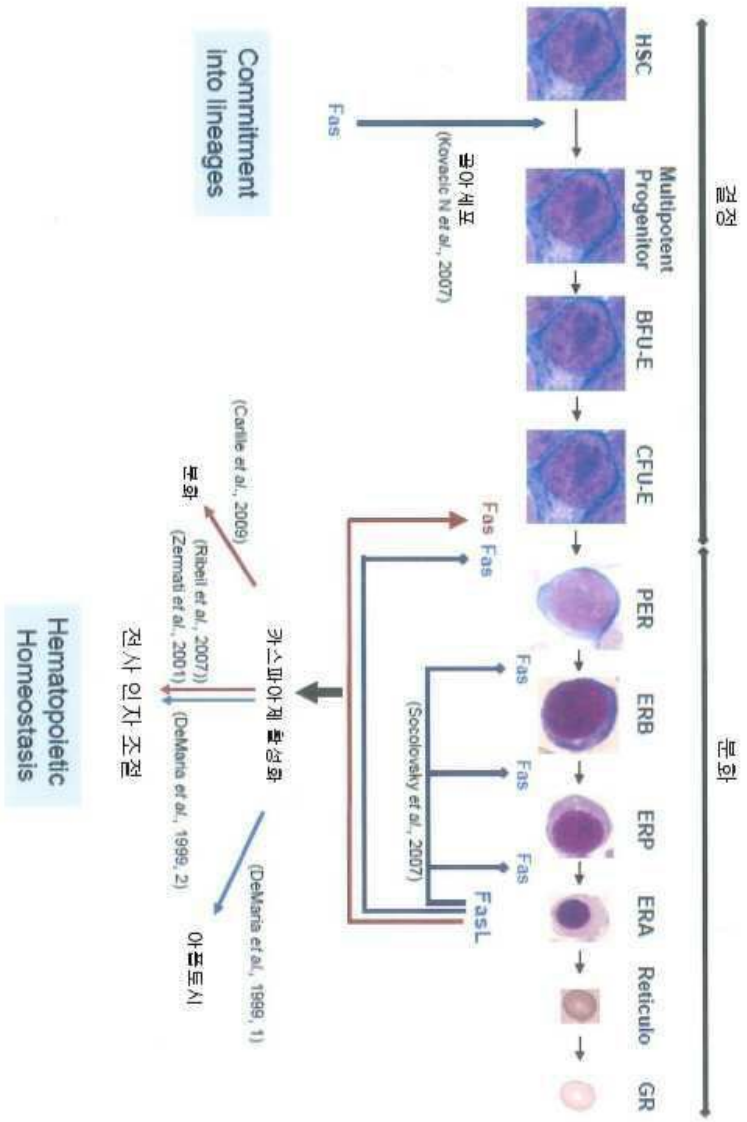
[0127] Zermati Y, Garrido C, Amsellem S, et al. Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. J Exp Med. 2001;1 93: 247-254.

도면

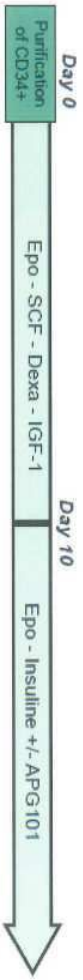
도면1


적혈구 분화 인자
CD34
CD71
GPA
HSC
BFU-E
CFU-E
PER
ERB
ERP
ERA
Reticulo
RBC
SCF
EP
O
FasL
Fas
결정
(Commitment)
분화

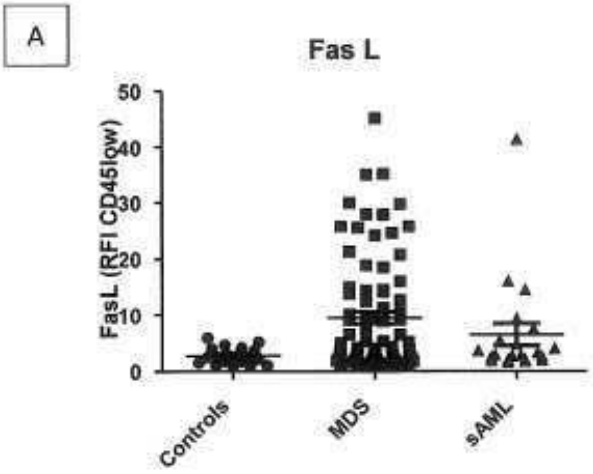
도면2


결정
분화
HSC
Multipotent Progenitor
BFU-E
CFU-E
PER
ERB
ERP
ERA
Reticulo
GR
Fas
(Kovacic N et al., 2007)
Commitment into lineages
Fas Fas
Fas
Fas
FasL
(Socolovsky et al., 2007)
(Carlile et al., 2009)
(Rikeli et al., 2007)
(Zermati et al., 2001)
(DeMaria et al., 1999, 2)
(DeMaria et al., 1999, 1)
카스파아제 활성화
Hematopoietic Homeostasis
전사 인자 조절

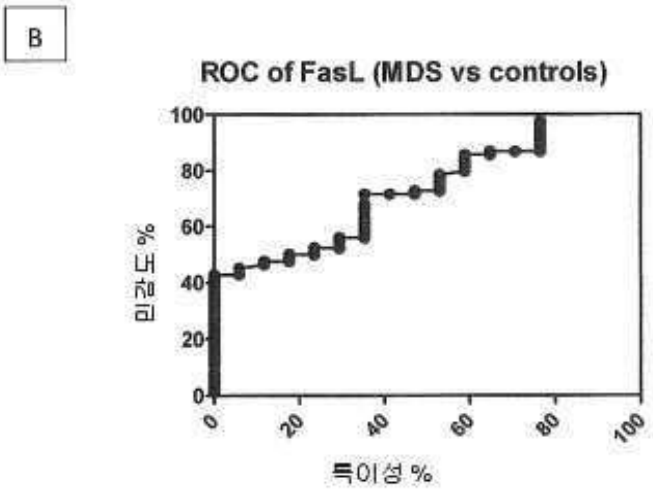
도면3


Purification of CD34+
Day 0
Epo - SCF - Dexa - IGF-1
Day 10
Epo - Insuline +/- APG101

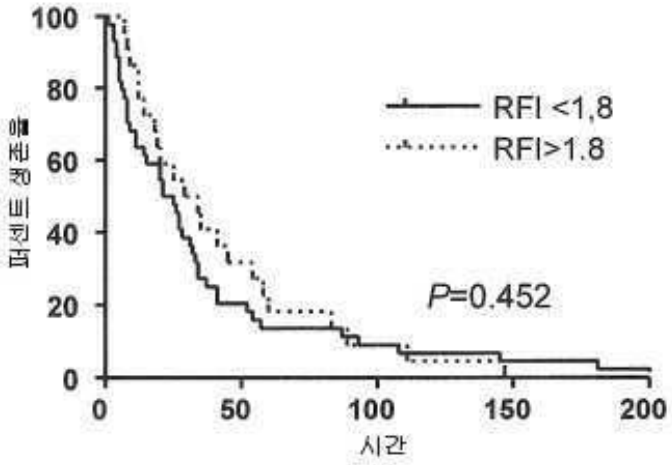
도면4a


A
Fas L
FasL (RFI CD45low)
50
40
30
20
10
0
Controls
MDS
sAML

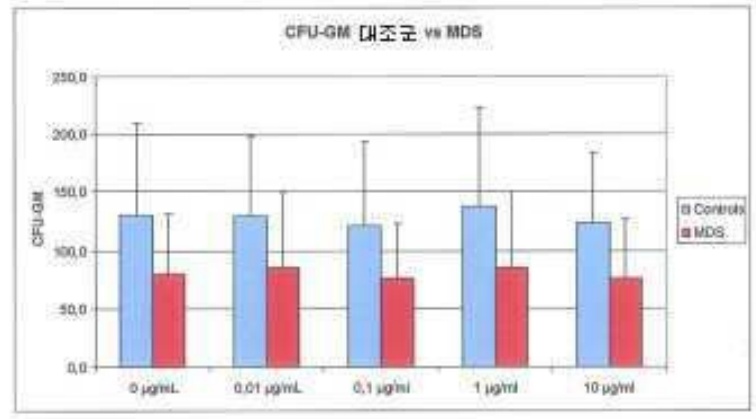
도면4b

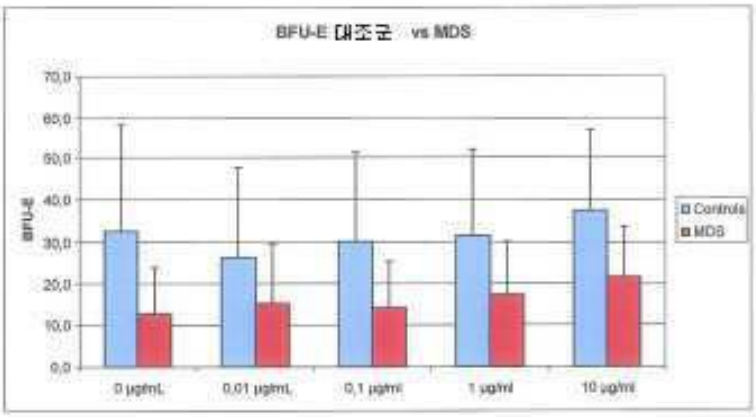

B
ROC of FasL (MDS vs controls)
민감도 %
특이성 %
0
20
40
60
80
100

도면5

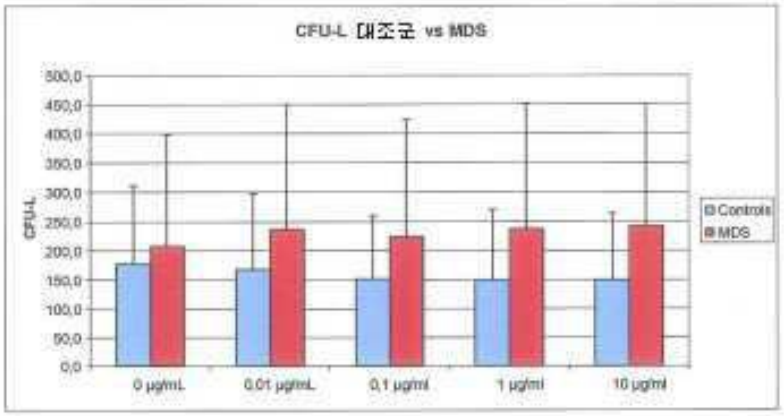

퍼센트 생존율
시간
RFI <1,8
RFI>1.8
P=0.452
0
20
40
60
80
100
0
50
100
150
200

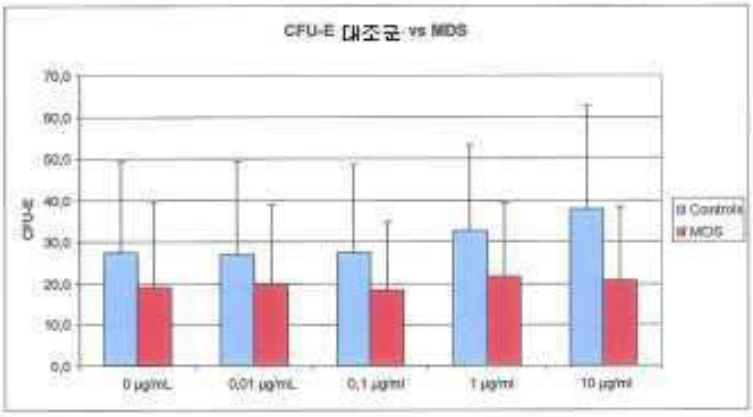
도면6


CFU-GM 대조군 vs MDS
250,0
200,0
150,0
100,0
50,0
0,0
CFU-GM
0 μg/mL
0,01 μg/mL
0,1 μg/ml
1 μg/ml
10 μg/ml
Controls
MDS

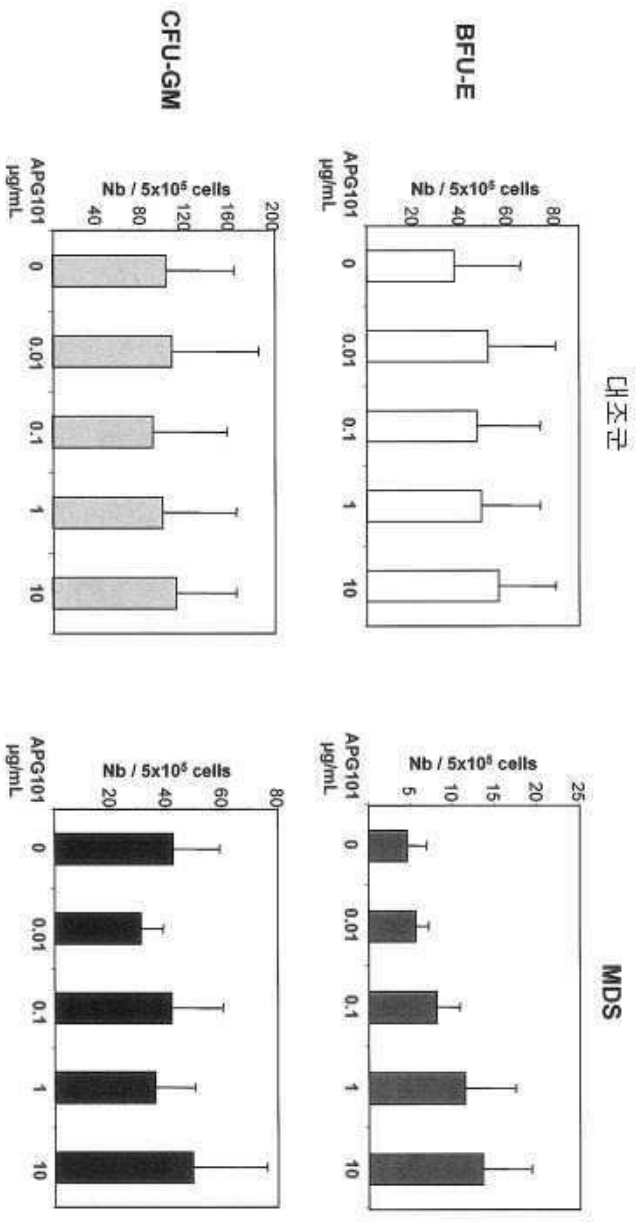

BFU-E 대조군 vs MDS
70,0
60,0
50,0
40,0
30,0
20,0
10,0
0,0
BFU-E
0 μg/mL
0,01 μg/mL
0,1 μg/ml
1 μg/ml
10 μg/ml
Controls
MDS

도면7

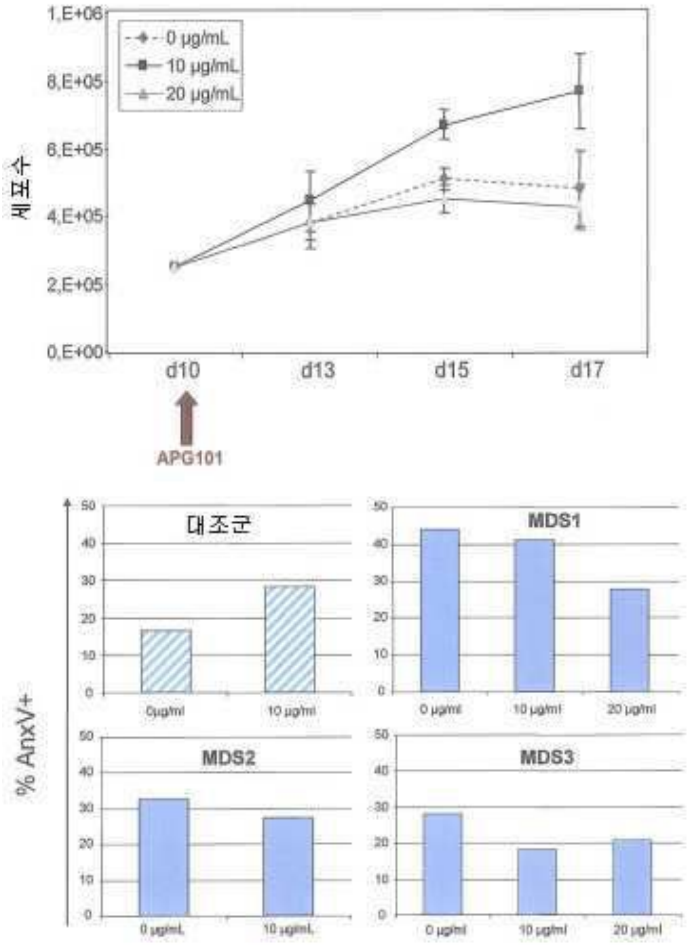

CFU-L 대조군 vs MDS
500,0
450,0
400,0
350,0
300,0
250,0
200,0
150,0
100,0
50,0
0,0
CFU-L
0 μg/mL
0,01 μg/mL
0,1 μg/ml
1 μg/ml
10 μg/ml
Controls
MDS


CFU-E 대조군 vs MDS
70,0
60,0
50,0
40,0
30,0
20,0
10,0
0,0
CFU-E
0 μg/mL
0,01 μg/mL
0,1 μg/ml
1 μg/ml
10 μg/ml
Controls
MDS

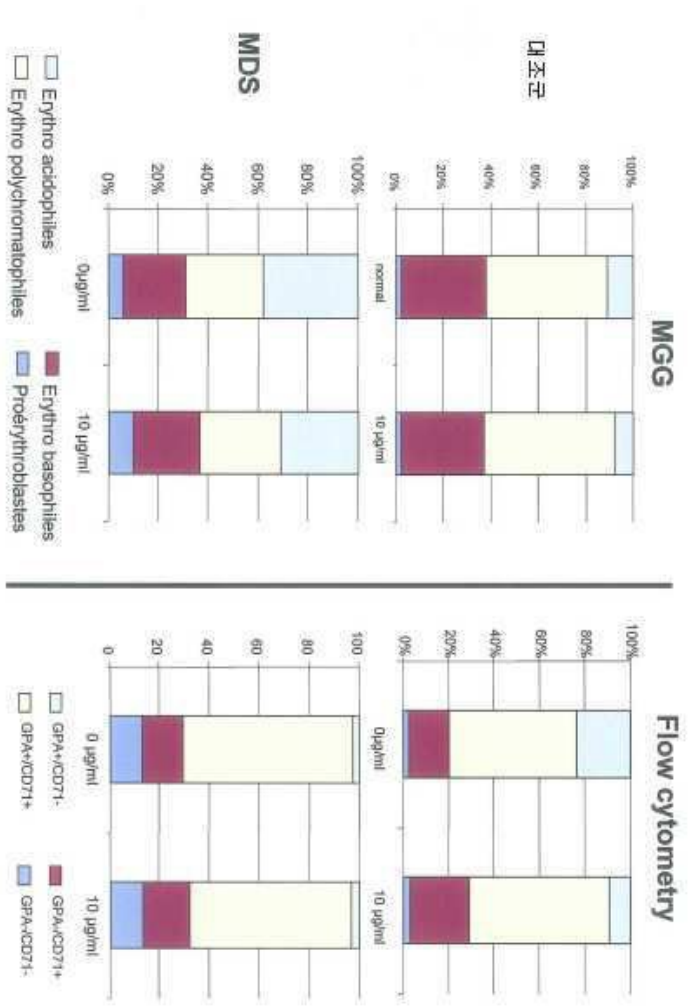
도면8



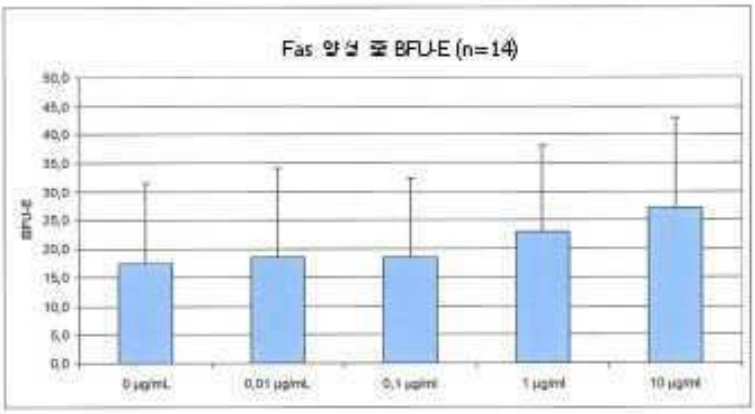
도면9

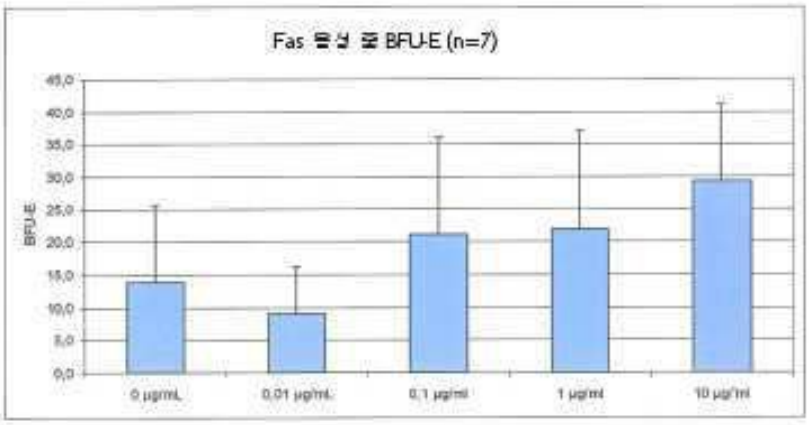

1.E+06
8.E+05
6.E+05
4.E+05
2.E+05
0.E+00
세포수
0 μg/mL
10 μg/mL
20 μg/mL
d10
d13
d15
d17
APG101
% AnxV+
대조군
MDS1
MDS2
MDS3
0 μg/mL
10 μg/mL
20 μg/mL

도면10

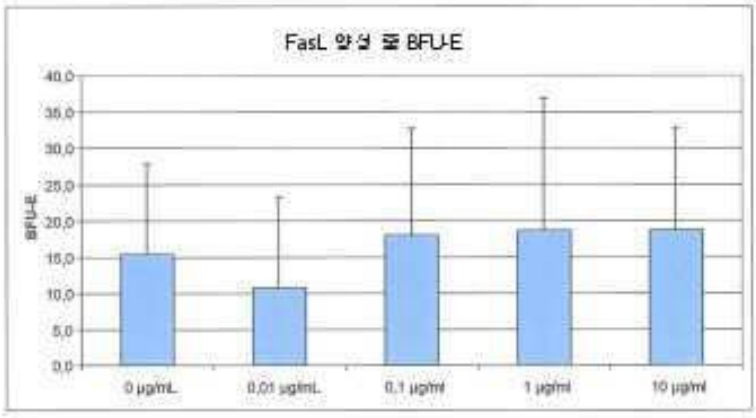

대조군
MGG
MDS
Flow cytometry
normal
0μg/ml
10 μg/ml
0 μg/ml
Erythro acidophiles
Erythro basophiles
Erythro polychromatophiles
Proérythroblastes
GPA+/CD71-
GPA+/CD71+

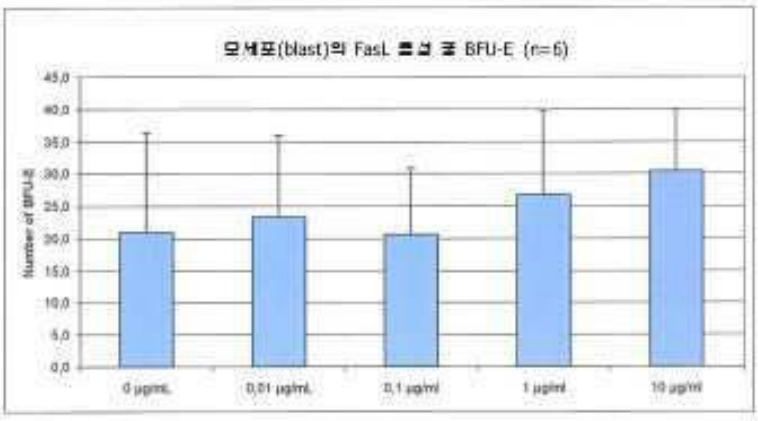
도면11


Fas 양성 줄 BFU-E (n=14)
BFU-E
0 μg/mL
0,01 μg/mL
0,1 μg/ml
1 μg/ml
10 μg/ml

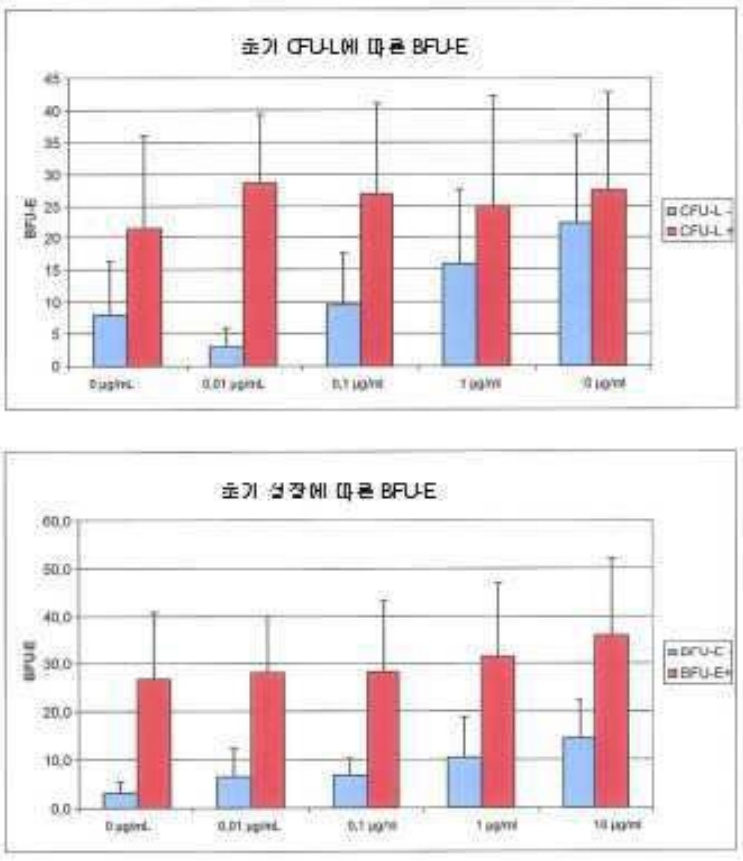

Fas 음성 줄 BFU-E (n=7)
BFU-E
0 μg/mL
0,01 μg/mL
0,1 μg/ml
1 μg/ml
10 μg/ml

도면12


FasL 양성 군 BFU-E
40,0
35,0
30,0
25,0
20,0
15,0
10,0
5,0
0,0
BFU-E
0 μg/mL
0,01 μg/mL
0,1 μg/ml
1 μg/ml
10 μg/ml


모세포(blast)의 FasL 표현 군 BFU-E (n=6)
45,0
40,0
35,0
30,0
25,0
20,0
15,0
10,0
5,0
0,0
Number of BFU-E
0 μg/mL
0,01 μg/mL
0,1 μg/ml
1 μg/ml
10 μg/ml

도면13



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Apogenix GmbH

<120> Improved APG101 Drug and Substance Formulation

<130> 51510P WO

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 400

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Recombinant fusion protein consisting of human CD95 extracellular domain with human IgG1 FC-part to its C-terminus

<220><221> SIGNAL

<222> (1)..(16)

<223> Variable cleavage sites

<220><221> SIGNAL

<222> (1)..(20)

<223

> Variable cleavage sites

<220><221> SIGNAL

<222> (1)..(25)

<223> Variable cleavage sites

<220><221> DOMAIN

<222> (26)..(172)

<223> Human CD95 extracellular domain

<220><221> MOD_RES

<222> (26)..(26)

<223> PYRROLIDONE CARBOXYLIC ACID

<220><221> DISULFID

<222> (59)..(73)

<220><221> DISULFID

<222> (63)..(82)

<220><221> DISULFID

<222> (85)..(101)

<220><221> DISULFID

<222> (104)..(119)

<220><221> DISULFID

<222> (107)..(127)

<220><221> CARBOHYD

<222> (118)..(118)

<223> N-linked Glycosylation at Position N118

<220><221> DISULFID

<222> (129)..(143)

<220><221> DISULFID

<222> (135)..(140)

<220><221> CARBOHYD

<222> (136)..(136)

<223> N-linked Glycosylation at Position N136

<220><221> DISULFID

<222> (146)..(157)

<220><221> DISULFID

<222> (149)..(165)

<220><221> DOMAIN

<222> (172)..(400)

<223> Human IgG1-FC domain

<220><221> DISULFID

<222> (173)..(173)

<223> Interchain cystine forming residue of the APG101 homodimer.

<220

><221> DISULFID

<222> (179)..(179)

<223> Interchain cystine forming residue of the APG101 homodimer.

<220><221> DISULFID

<222> (182)..(182)

<223> Interchain cystine forming residue of the APG101 homodimer.

<220><221> DISULFID

<222> (214)..(274)

<220><221> CARBOHYD

<222> (250)..(250)

<223> N-linked Glycosylation at Position N250

<220><221> DISULFID

<222> (320)..(378)

<400> 1

Met Val Gly Ile Trp Thr Leu Leu Pro Leu Val Leu Thr Ser Val Ala
1 5 10 15

Arg Leu Ser Ser Lys Ser Val Asn Ala Gln Val Thr Asp Ile Asn Ser
20 25 30

Lys Gly Leu Glu Leu Arg Lys Thr Val Thr Thr Val Glu Thr Gln Asn
35 40 45

Leu Glu Gly Leu His His Asp Gly Gln Phe Cys His Lys Pro Cys Pro
50 55 60

Pro Gly Glu Arg Lys Ala Arg Asp Cys Thr Val Asn Gly Asp Glu Pro

65 70 75 80

Asp Cys Val Pro Cys Gln Glu Gly Lys Glu Tyr Thr Asp Lys Ala His
85 90 95

Phe Ser Ser Lys Cys Arg Arg Cys Arg Leu Cys Asp Glu Gly His Gly
100 105 110

Leu Glu Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg Thr Gln Asn Thr Lys Cys Arg
115 120 125

Cys Lys Pro Asn Phe Phe Cys Asn Ser Thr Val Cys Glu His Cys Asp
130 135 140

Pro Cys Thr Lys Cys Glu His Gly Ile Ile Lys Glu Cys Thr Leu Thr
145 150 155 160

Ser Asn Thr Lys Cys Lys Glu Glu Gly Ser Arg Ser Cys Asp Lys Thr
165 170 175

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
180 185 190

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
195 200 205

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
210 215 220

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
225 230 235 240

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
245 250 255

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
260 265 270

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
275 280 285

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
290 295 300

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
305 310 315 320

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
325 330 335

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
340 345 350

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
355 360 365

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
370 375 380

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
385 390 395 400