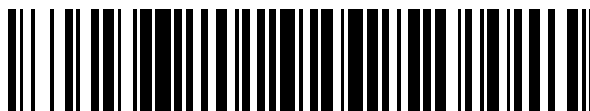


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 589 134**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.07.2013 PCT/EP2013/065245**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.01.2014 WO14013036**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2013 E 13739979 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.07.2016 EP 2874659**

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

30 Prioridad:

18.07.2012 EP 12176974

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

10.11.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 589 134 T3

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

DESCRIPCIÓN

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

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

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

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

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

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

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

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

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

60 Gupta, P. et al.: "Fas ligand expression in the bone marrow in myelodysplastic syndromes correlates with FAB subtype and anemia, and predicts survival", Leukemia (1999), 13:44-53 sugieren el tratamiento de MDS por bloqueo farmacológico de la ruta Fas-FasL para mejorar las citopenias del MDS.

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

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

5 Un primer aspecto de la invención se refiere a un inhibidor de la ruta de señalización de CD95 para su uso en el tratamiento de un síndrome mielodisplásico (MDS), que se selecciona de entre el subgrupo de MDS con bajo riesgo según el IPSS y/o el subgrupo de MDS de riesgo intermedio (int-1) según el IPSS.

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

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

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

25 De acuerdo con una realización especialmente preferida, el inhibidor se une al receptor CD95 (CD95) y/o al ligando CD95 (CD95L). En una realización adicional, se puede inhibir la interacción CD95/CD95L.

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

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

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

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

45 Los métodos para producir anticuerpos son conocidos por los expertos en la técnica.

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

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

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

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

65 En una realización, un inhibidor CD95 comprende un dominio extracelular de la molécula de CD95R, tal como los aminoácidos 1 a 172 (MLG ... SRS) de la secuencia de CD95 maduro de acuerdo con la Pat. de EE. UU. N°

5.891.434. Este dominio extracelular de la molécula CD95R se puede fusionar con un dominio de polipéptido heterólogo, particularmente una molécula de inmunoglobulina Fc que incluya la región bisagra, por ejemplo de una molécula IgG1 humana. Una proteína de fusión que comprende un dominio extracelular de CD95 y un dominio Fc humano se describe en el documento WO 95/27735.

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

10 De acuerdo con una realización especialmente preferida, el agente que se une a CD95L es APG101 o fragmentos funcionales, isoformas y/o derivados del mismo. El APG101 comprende los dominios CD95R (aminoácidos 26-172; dominio extracelular ECD) y el Fc de IgG1 (aminoácidos 172-400) de SEQ ID NO: 1). El APG101 y los derivados del mismo se desvelan en los documentos WO95/27735 y WO2004/085478.

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

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

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

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

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

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

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

50 Otro rasgo característico del subgrupo de MDS que se va a tratar puede ser la resistencia a los agentes estimulantes de la eritropoyesis clásicos (ESA) y/o factores estimulantes de colonias. Un agente estimulante de la eritropoyesis de acuerdo con la invención puede ser un compuesto que estimule la producción de glóbulos rojos. Ejemplos de ESA y/o factores estimulantes de colonias comprenden pero no se limitan a Eritropoyetina (Epo), Epoetina alfa (Procrit/Epogen), Epoetina beta (NeoRecormon), Darbepoetina alfa (Aranesp), Metoxi polietileno de glucopoyetina beta (Mircera) y/o algunas citocinas tales como IL-3 o IL-9.

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

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

65 Teniendo en mente un subgrupo de MDS como se ha descrito anteriormente, una realización adicional de la invención se refiere al uso de los inhibidores que aumentan el número de BFU-E y no afectan a las unidades formadoras de colonias de granulocitos monocitos (CFU-GM) y/o sin aumentar el riesgo de expansión celular

leucémica. Preferentemente, el inhibidor también puede ser un compuesto que mejore el crecimiento de los progenitores eritroides.

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

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

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

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

La dosificación y administración se ajustan para proporcionar niveles suficientes del resto activo o para mantener el efecto deseado. Un experto en la técnica es consciente de los métodos adicionales para proporcionar suficientes niveles del resto activo y/o mantener el efecto deseado. Los factores que se pueden tener en cuenta, incluyen la gravedad de la enfermedad, la salud general del sujeto, edad, peso y género del sujeto, dieta, tiempo y frecuencia de administración, combinaciones farmacológicas, reacciones de sensibilidad, y tolerancia/respuesta a la terapia. En una realización preferida la cantidad total del inhibidor de la ruta de señalización de CD95 de acuerdo con la presente invención que se va a administrar a un paciente que padece MDS es desde aproximadamente 50 a aproximadamente 400 mg/semana, más preferentemente aproximadamente 100 a aproximadamente 200 mg/semana. La dosis semanal preferida se puede administrar como una dosis única o como varias dosis. Especialmente preferida es una única dosis de 100 a 300 mg/semana que se administra por vía intravenosa como dosis única.

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

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención esta composición farmacéutica puede comprender al menos un principio activo adicional tal como un agente que se utiliza habitualmente para el tratamiento de MDS, tal como 5-azacitidina, decitabina o lenalidomida, un agente estimulante de eritropoyesis y/o un agente inhibidor de apoptosis.

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

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

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

Un aspecto adicional de la divulgación se refiere a un método de diagnóstico de MDS, que comprende la etapa de determinar la expresión de CD95L en una muestra, donde la sobre-expresión de CD95L es predictiva de la enfermedad. Una etapa adicional del presente método inventivo puede ser *inter alia* la comparación del valor de la expresión de CD95L con un valor de control tal como el de una muestra de un paciente con anemia de un origen distinto a MDS.

Por supuesto, el método de diagnóstico desvelado puede combinarse con métodos conocidos tales como el sistema IPSS.

Leyenda de las figuras

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Materiales y métodos

Materiales de laboratorio

Descripción	Lote	Suministrador
Trímero purificado estable del ligando CD95 (CD95L-T4) APG101		Apogenix
Citocinas SCF, IGF-1	SCF 02630 IGF-1	Promega SIGMA
Metilcelulosa	04100	Stem Cell technologies
Medio de cultivo IDMD glutamax	31980-022	Invitrogen
Anticuerpos y proteínas marcados con un fluorocromo	CD95 clon UB2 IM1506 CD235a (GPA) clon 11E4B IM2212 CD71 clon YDJ1.2.2 IM0483	Beckman Coulter

Muestras de médula ósea

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

Equipamiento

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

Métodos

5 SOP relevantes

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

SOP	Nº	Fecha de lanzamiento
Aislamiento de células CD34+	GBEA2v1	01/02/2002
Cultivo del progenitor eritroide	GBEA2v1	01/02/2002
Ensayos en metilcelulosa	GBEA1v1	01/02/2002

10

Herramientas y plataformas

- 15
- APG101 Fas-Fc quimérico (Apogenix): un inhibidor de la apoptosis dependiente de Fas; proporcionado por Apogenix GmbH.
 - CD95L-T4: Ligando trimérico para Fas proporcionado por Apogenix.
 - Los cultivos celulares eritroides se llevaron a cabo como se ha descrito: se aislaron las células CD34⁺ de médula ósea en una columna MIDI Macs y se cultivaron con SCF, Epo, IGF-1 y dexametasona para inducir la diferenciación de las células CD34⁺ en linaje eritroide y la proliferación de las células eritroides. Tras 10 días, se obtuvo la maduración terminal de células eritroides por cambio de las células a un medio que contenía Epo e insulina.
 - Se utilizó citometría de flujo para cuantificar la maduración de células eritroides durante el cultivo líquido *in vitro*
- 20

25 Protocolos

Citometría de flujo

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

35

Aislamiento celular y cultivo

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

45

50

Inducción de apoptosis por CD95L-T4 en células eritroides normales

Las células eritroides normales se trataron con concentraciones crecientes de CD95L-T4. A una concentración determinada, se midió el impacto de la adición de CD95L-T4 en una fase temprana de la diferenciación de células eritroides sobre el crecimiento de células eritroides (BFU-E y amplificación total de los precursores eritroides). Se ensayó el impacto de la adición de CD95L-T4 antes de la aparición de la activación de caspasa-3 que precede a la maduración eritroide. La caspasa-3 y las dianas se siguieron por análisis de citometría de flujo y de transferencia de Western.

Considerando la estequiometría 1/1 del complejo CD95L-T4/APG101 con una afinidad de unión de 11 nM en seres humanos, la concentración de CD95L-T4 y APG101 que se iba a ensayar en el cultivo estaban en el mismo intervalo (0,01 a 10 µg/ml).

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

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

Inhibición de la apoptosis de células eritroides de MDS por APG101

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

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

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

Ensayo en metilcelulosa

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

Estadística

Los datos biológicos se analizaron como valores medios $\pm$ el error estándar de la media. Los ensayos de sensibilidad y especificidad de la citometría de flujo para Fas y FasL se evaluaron con la curva de característica operativa del receptor (ROC) y se dedujo el valor del umbral. Se compararon las variables continuas con el ensayo-t de Student (software Excel 2003, Microsoft). Se utilizó el estimador de Kaplan-Meier para evaluar el impacto de Fas y FasL sobre la supervivencia total a lo largo del tiempo, en los dos subgrupos de población bajo estudio, y se comparó con el ensayo Log-Rank. Todos los análisis estadísticos eran de 2 lados y los valores de P menores de 0,05 se consideraron significativos. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando un software GraphPad.

Resultados**Expresión FasL y diagnóstico de MDS**

Se midió la expresión de FasL tanto en poblaciones celulares de médula ósea CD45low/CD34+ y CD71+ de 84 MDS, 21 sAML y 17 controles. El FasL estaba significativamente más elevado en MDS que en sAML o los controles (Figura 4A) y de acuerdo con la ROC, el umbral de positividad era 6. Cuando se comparaba los MDS con los controles, el valor predictivo de la expresión de FasL para discriminar entre MDS y los controles era bueno (área bajo la curva: 0,73; P=0,002; Figura 4B).

Se recogió la información clínica de 166 pacientes de MDS o sAML con un valor conocido de la expresión de Fas en el momento del diagnóstico y en 42 pacientes MDS/sAML con un valor conocido de FasL en el momento del

diagnóstico para analizar el impacto de la expresión de Fas o FasL sobre el diagnóstico. En el grupo de los 166 pacientes con MDS, el 41% eran positivos para Fas y no se demostró ninguna diferencia en términos de edad, sexo, parámetros del hemograma, % de blastos en médula ósea, displasia multilineal, cariotipo, IPSS y tratamientos. La expresión de Fas no tenía impacto en la supervivencia total (Figura 5). Además, la expresión de Fas no era predictiva de la respuesta a la Epo.

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

En resumen, estos datos muestran que Fas y FasL estaban sobre-expresados en MDS, y la sobre-expresión de FasL es predictiva de MDS. Ni la expresión de Fas ni la expresión de FasL eran parámetros pronósticos para la supervivencia total.

Efecto de APG101 sobre el crecimiento del progenitor hematopoyético

Los estudios han demostrado que bloqueando FasL con un exceso de Fas soluble (Fas: Fc) así como la destrucción de la señalización Fas por medio de expresión ectópica de una forma dominante negativa del adaptador FADD rescataba el crecimiento de BFU-E. Cuando se analizó el efecto de las concentraciones crecientes de APG101 (0, 0,01, 0,1, 1, 10 μ g/ml) sobre los progenitores eritroides y granulo-monocíticos en ensayos de metilcelulosa llegaba a ser evidente que el APG101 no estimulaba el crecimiento de CFU-GM mientras que se notaba un efecto positivo moderado sobre el crecimiento de BFU-E (Figura 6).

Además se analizó efecto de APG101 sobre el crecimiento de los progenitores eritroides maduros (CFU-E) y la respuesta de los blastos leucémicos contando el número de CFU-L (agrupamientos no eritroides de al menos 50 células) el día 7 del cultivo en metilcelulosa (Figura 7). Se encontró que el APG101 no rescataba el crecimiento de CFU-E y no aumentaba el número de CFU-L incluso en muestras de pacientes RAEB2 (MDS con más de un 10% de blastos en el momento del diagnóstico) sugiriendo que el APG101 no estimula el crecimiento de blastos leucémicos.

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

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

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

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

Primero se analizaron los ensayos clonogénicos de acuerdo con la expresión inicial de Fas. Como se muestra en la Figura 11, la mejoría del crecimiento de BFU-E en presencia de 10 μ g/ml de APG101 no era diferente significativamente en pacientes positivos a Fas y negativos a Fas.

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

Tercero, se buscó una posible correlación entre el efecto de APG101 sobre el crecimiento de BFU-E y el crecimiento inicial de CFU-L en el momento del diagnóstico. En pacientes con exceso de agrupamientos leucémicos, el APG101 fallaba en la recuperación el crecimiento de BFU-E mientras que aumentaba muy eficazmente el número de BFU-E en pacientes con un crecimiento inicial bajo de CFU-L (Figura 13, a la izquierda).

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

5 Resumen

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

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

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

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

Bibliografía

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

Bouscary D, De Vos J, Guesnu M, Jondeau K, Viguier F, Melle J, Picard F, Dreyfus F, Fontenay-Roupie M. Fas/Apo-1 (CD95) expression and apoptosis in patients with myelodysplastic syndromes. Leukemia. 1997 Jun; 11 (6):839-45.

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

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

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

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

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

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

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.

Ribeil JA, Zermati Y, Vandekerckhove J, Cathelin S, Kersual J, Dussiot M, Coulon S, Moura IC, Zeuner A, Kirkegaard-Sørensen T, Varet B, Solary E, Garrido C, Hermine O. Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1. Nature. 2007 Ene 4; 445(7123):102-5.

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.

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.

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.

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

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Apogenix GmbH

<120> Fármaco para APG101 mejorado y formulación de sustancia

<130> 51510P WO

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 400

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión que consiste en el dominio extracelular de CD95 humano con la parte FC de IgG1 humana en su extremo C-terminal

<220>

<221> SEÑAL

<222> (1)..(16)

<223> Sitios de escisión variables

<220>

<221> SEÑAL

<222> (1)..(20)

<223> Sitios de escisión variables

<220>

<221> SEÑAL

<222> (1)..(25)

<223> Sitios de escisión variables

<220>

<221> DOMINIO

<222> (26)..(172)

<223> Dominio extracelular de CD95 humano

<220>

<221> MOD_RES

<222> (26)..(26)

<223> ÁCIDO PIRROLIDONA CARBOXÍLICO

<220>

<221> DISULFURO

<222> (59)..(73)

<220>

	<221> DISULFURO
	<222> (63)..(82)
5	<220>
	<221> DISULFURO
	<222> (85)..(101)
10	<220>
	<221> DISULFURO
	<222> (104)..(119)
15	<220>
	<221> DISULFURO
	<222> (107)..(127)
20	<220>
	<221> CARBOHIDRATO
	<222> (118)..(118)
	<223> Glucosilación unida a N en la posición N118
25	<220>
	<221> DISULFURO
	<222> (129)..(143)
30	<220>
	<221> CARBOHIDRATO
	<222> (136)..(136)
	<223> Glucosilación unida a N en la posición N136
35	<220>
	<221> DISULFURO
	<222> (146)..(157)
40	<220>
	<221> DISULFURO
	<222> (149)..(165)
45	<220>
	<221> DOMINIO
	<222> (172)..(400)
	<223> Dominio FC de IgG1 humana
50	<220>
	<221> DISULFURO
	<222> (173)..(173)
	<223> Resto formador de cisteína intercadena del homodímero APG101.
55	<220>
	<221> DISULFURO
	<222> (179)..(179)
	<223> Resto formador de cisteína intercadena del homodímero APG101.
60	<220>
	<221> DISULFURO
	<222> (182)..(182)
	<223> Resto formador de cisteína intercadena del homodímero APG101.
65	<220>
	<221> DISULFURO
	<222> (214)..(274)
	<220>

<221> CARBOHIDRATO
<222> (250)..(250)
<223> Glucosilación unida a N en la posición N250

5

<220>
<221> DISULFURO
<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			
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							

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de la ruta de señalización de CD95 para su uso en el tratamiento del Síndrome Mielodisplásico (MDS), donde el MDS se selecciona de entre el subgrupo de MDS de bajo riesgo según el IPSS y el subgrupo de MDS de riesgo intermedio-1 (int-1) según el IPSS, y donde el inhibidor se une al receptor de CD95 (CD95) y/o al ligando de CD95 (CD95L).
2. El inhibidor de la ruta de señalización de CD95 para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el inhibidor es un compuesto que mejora el crecimiento de progenitores eritroides.
3. El inhibidor de la ruta de señalización de CD95 para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde el inhibidor es un anticuerpo, en particular un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a CD95L.
4. El inhibidor de la ruta de señalización de CD95 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde el inhibidor es una molécula receptora de CD95 o una porción de unión al ligando CD95 de la misma y/o un inhibidor del ligando CD95.
5. El inhibidor de la ruta de señalización de CD95 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde el inhibidor es una proteína de fusión que se une al CD95L.
6. El inhibidor de la ruta de señalización de CD95 para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, donde la proteína de fusión comprende un dominio extracelular o un fragmento funcional del mismo y un dominio Fc humano o un fragmento funcional del mismo.
7. El inhibidor de la ruta de señalización de CD95 para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, donde el inhibidor es APG101 y/o un derivado funcional del mismo, donde el APG101 comprende los dominios de CD95R (aminoácidos 26-172) de SEQ ID NO: 1 y el Fc de IgG1 (aminoácidos 172-400) de SEQ ID NO: 1.
8. El inhibidor de la ruta de señalización de CD95 para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la población de MDS **se caracteriza por** un aumento de la apoptosis durante la eritropoyesis.
9. El inhibidor de la ruta de señalización de CD95 para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la población de MDS **se caracteriza por** un grave defecto de la eritropoyesis sin exceso de blastos.
10. El inhibidor de la ruta de señalización de CD95 para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde la población de MDS **se caracteriza por** ser resistente a los agentes estimulantes de la eritropoyesis (ESA) y/o factores estimulantes de colonias.
11. El inhibidor de la ruta de señalización de CD95 para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 10, que se proporciona como una composición farmacéutica que comprende vehículos, diluyentes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables.
12. El inhibidor de la ruta de señalización de CD95 para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que se proporciona como una composición farmacéutica que comprende al menos un principio activo adicional tal como un agente estimulante de la eritropoyesis y/o un agente inhibidor de la apoptosis.
13. El inhibidor de la ruta de señalización de CD95 para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 que se administra a una cantidad total de 50 a 400 mg/semana, preferentemente a 100 a 200 mg/semana.

Figura 1

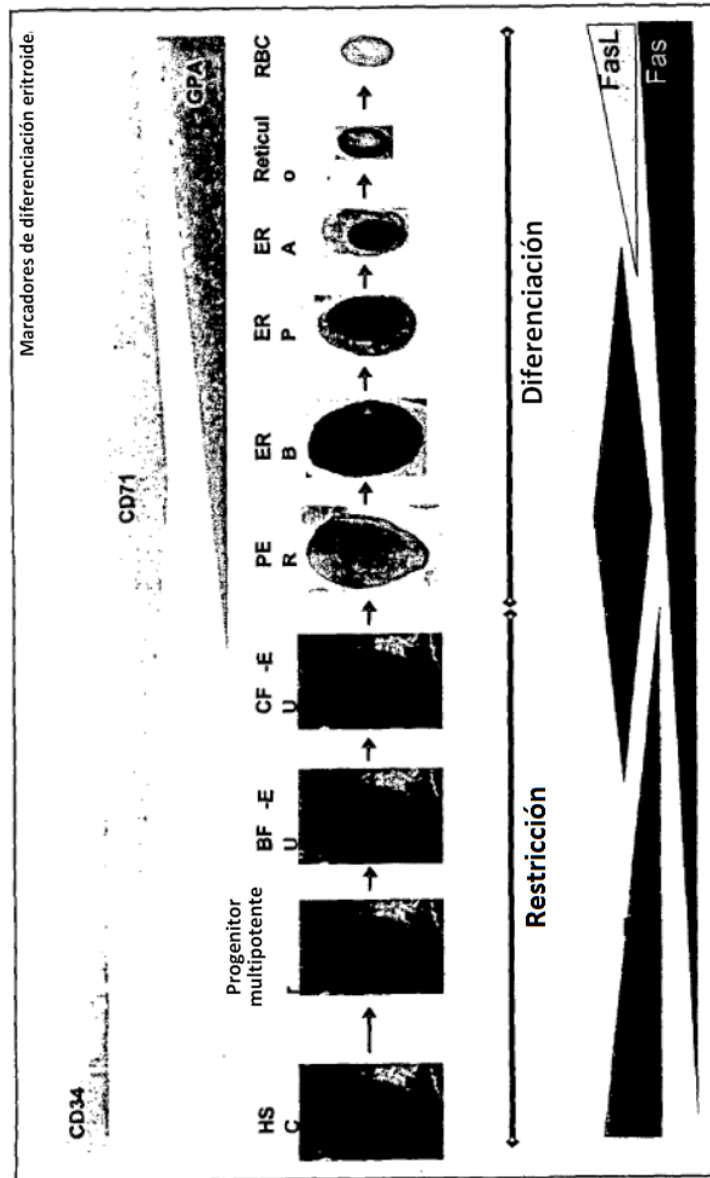


Figura 2

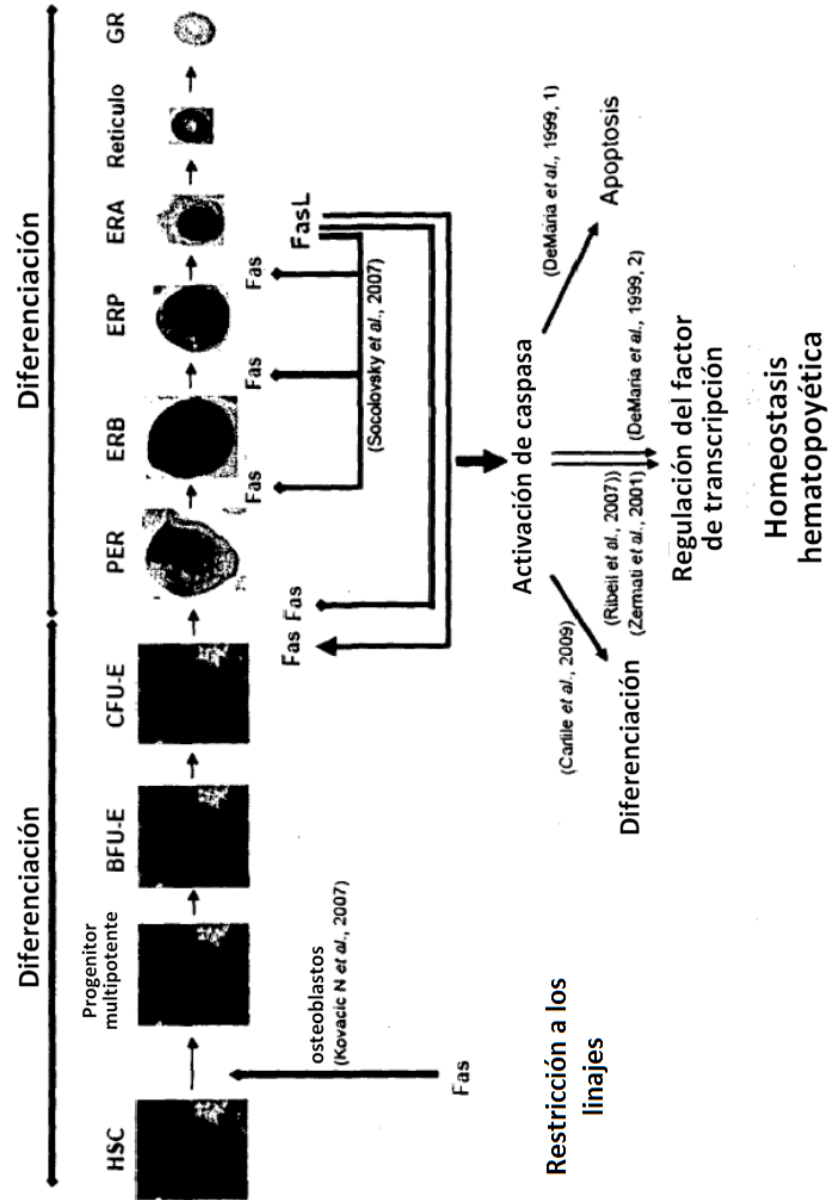


Figura 3

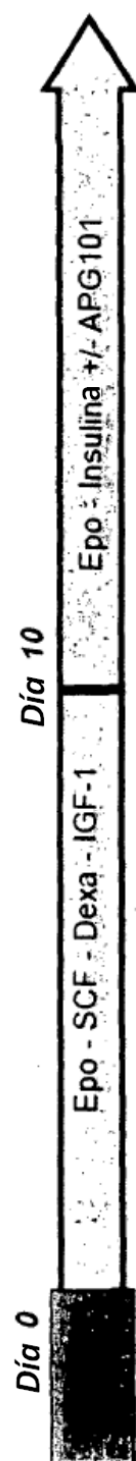


Figura 4

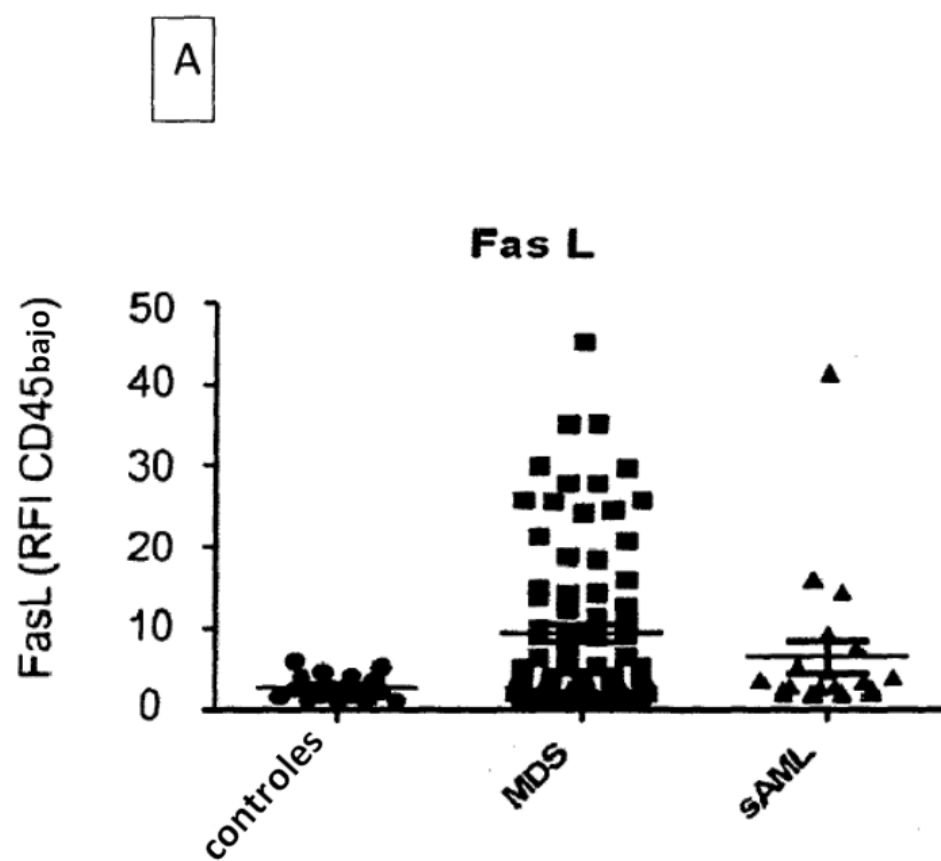


Figura 4

B

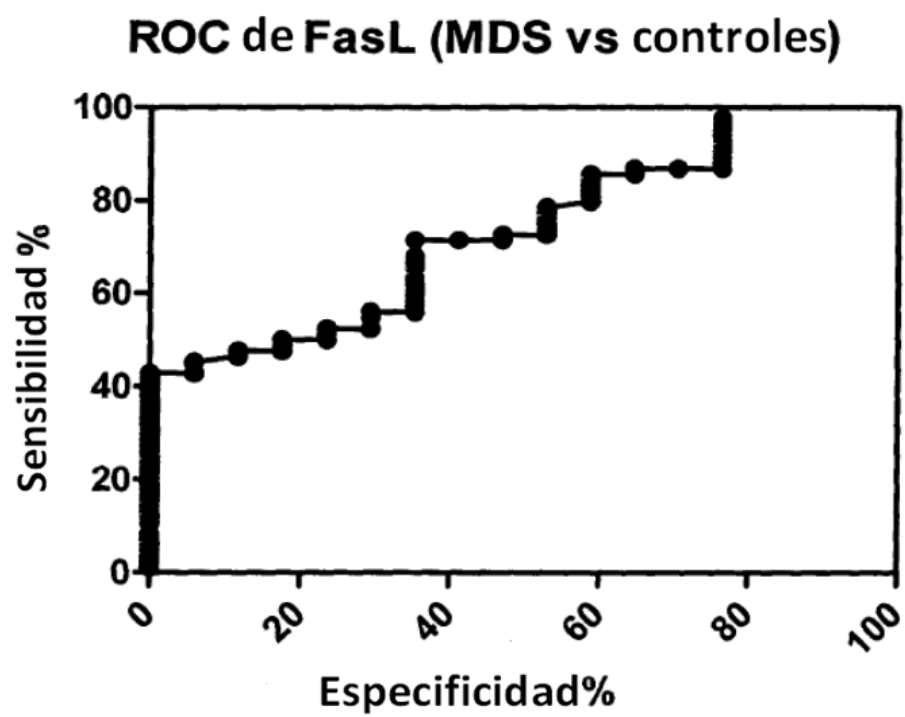


Figura 5

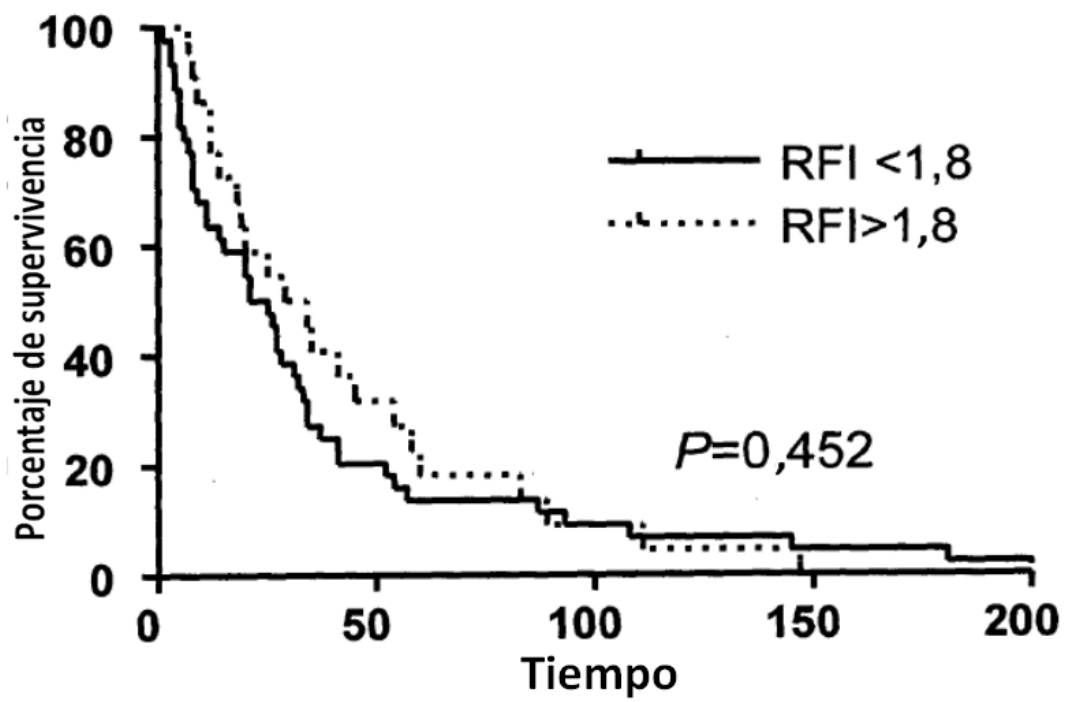


Figura 6

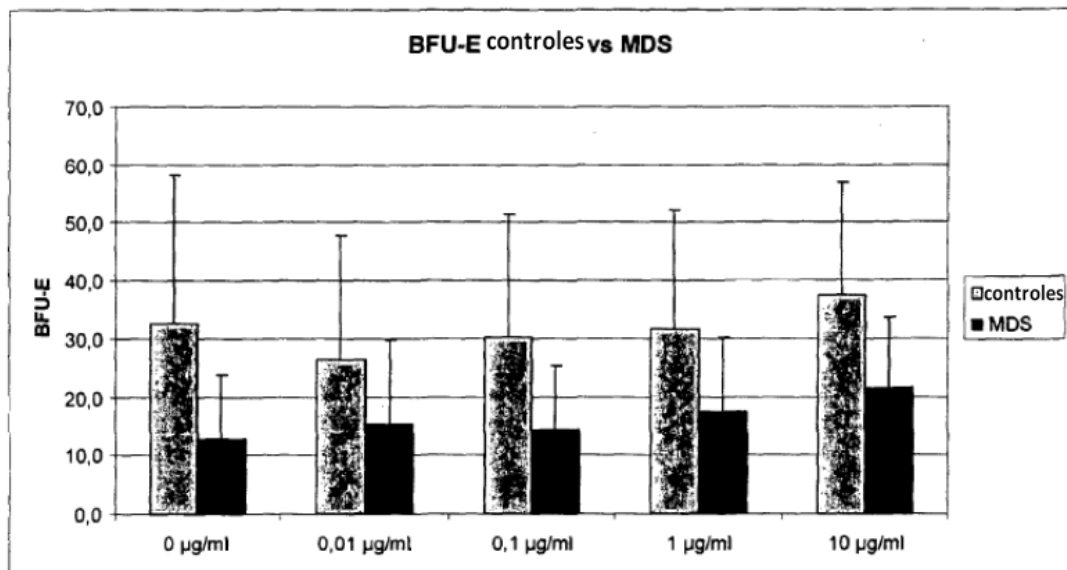
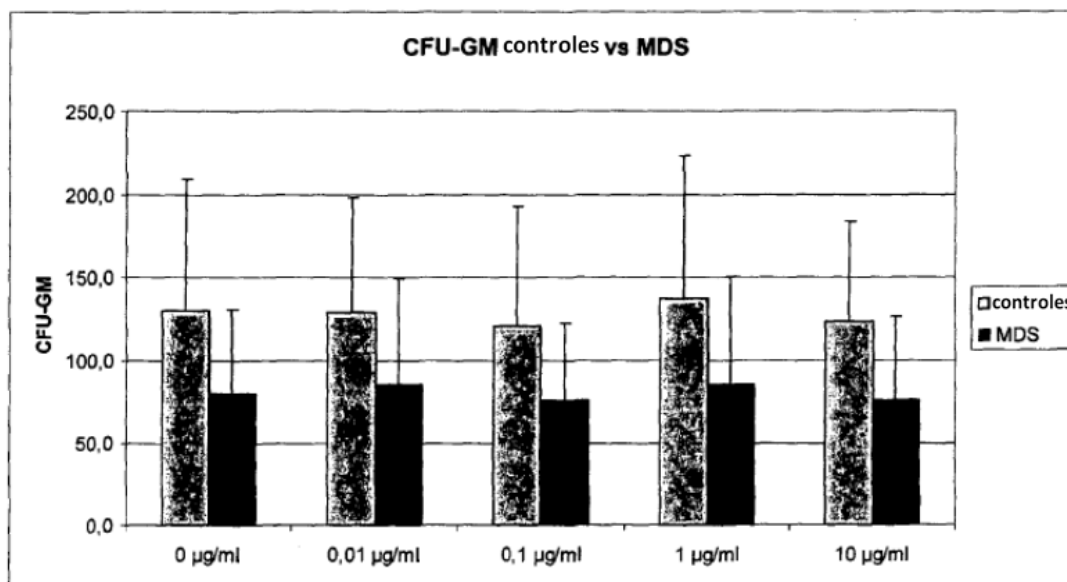


Figura 7

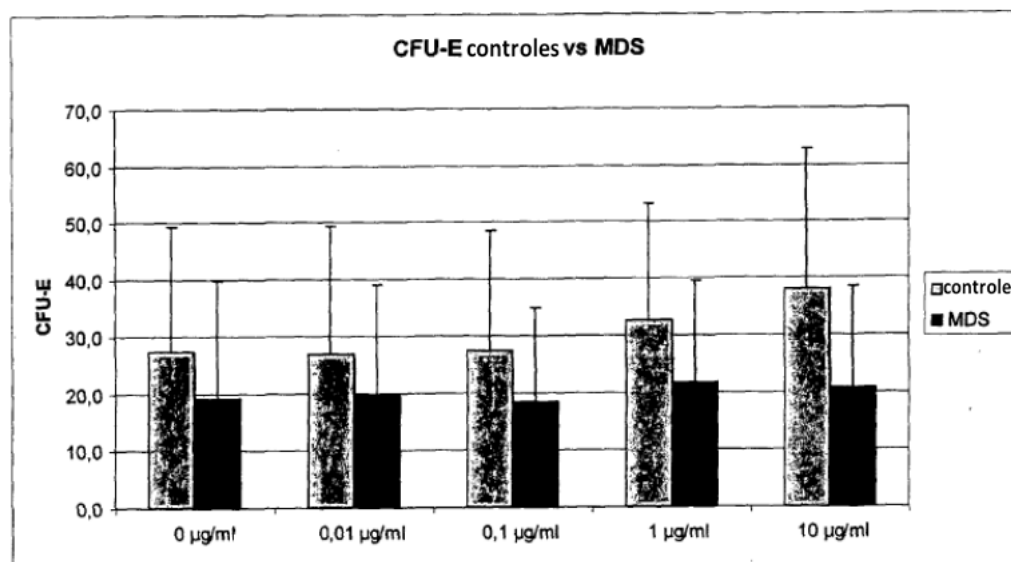
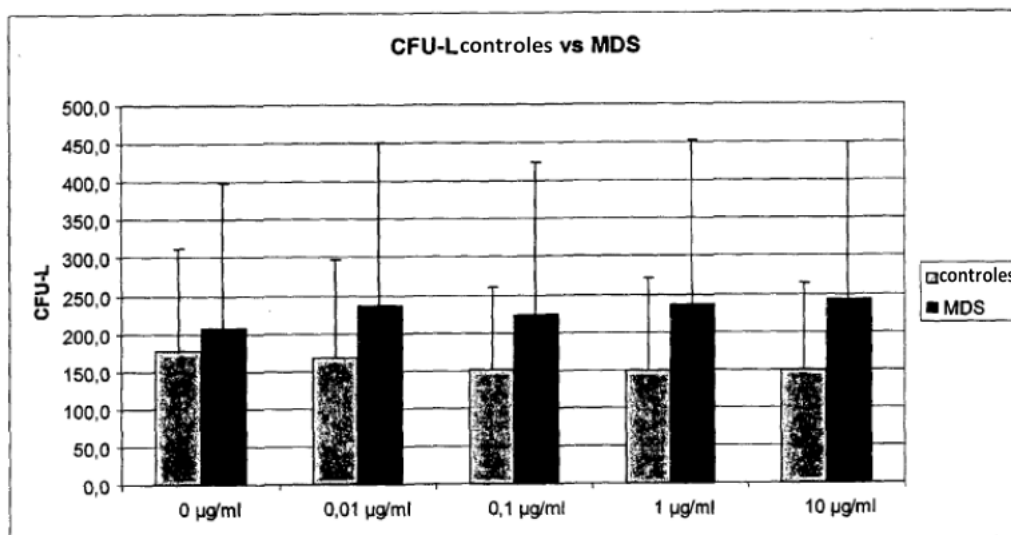


Figura 8

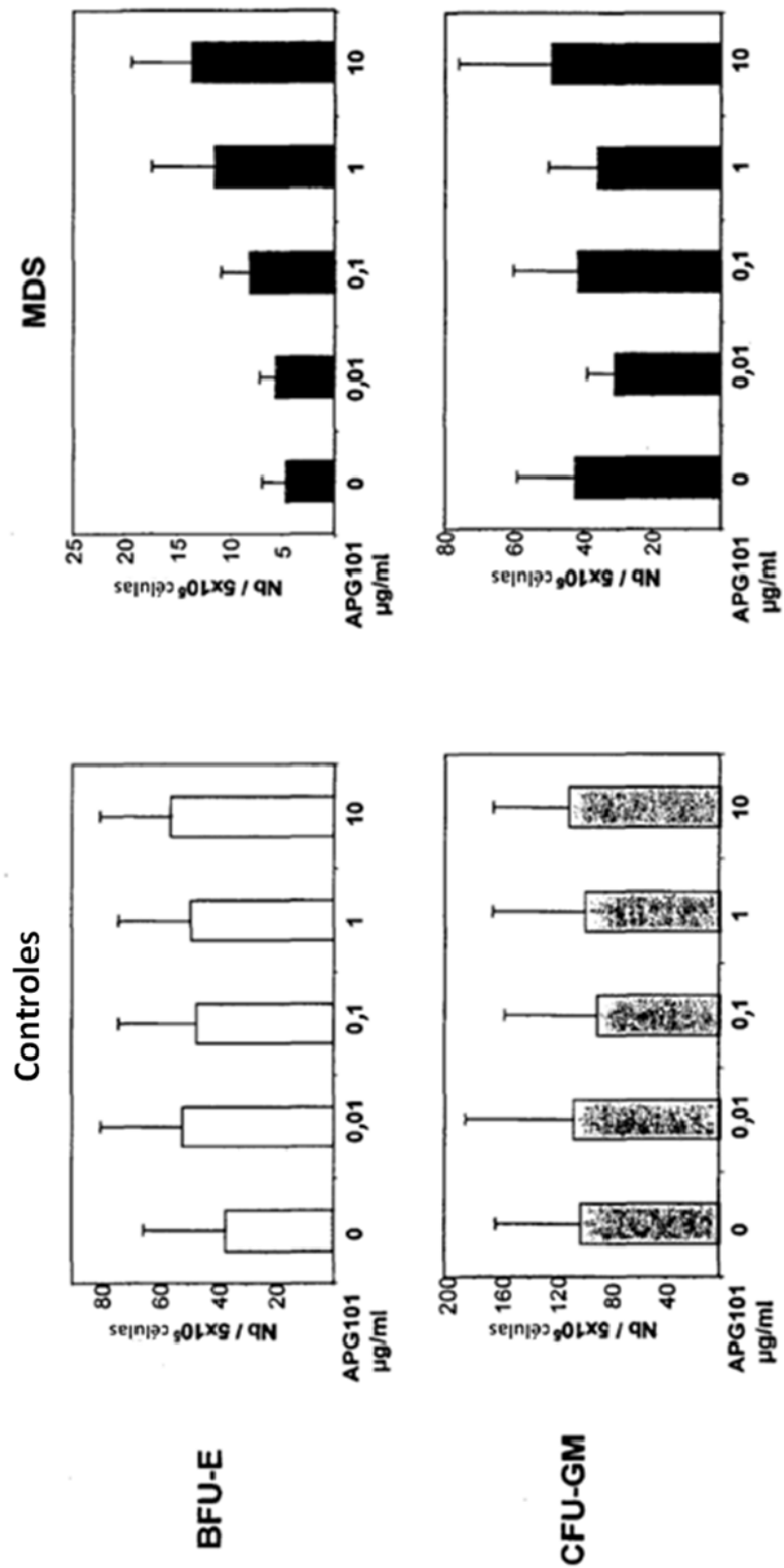


Figura 9

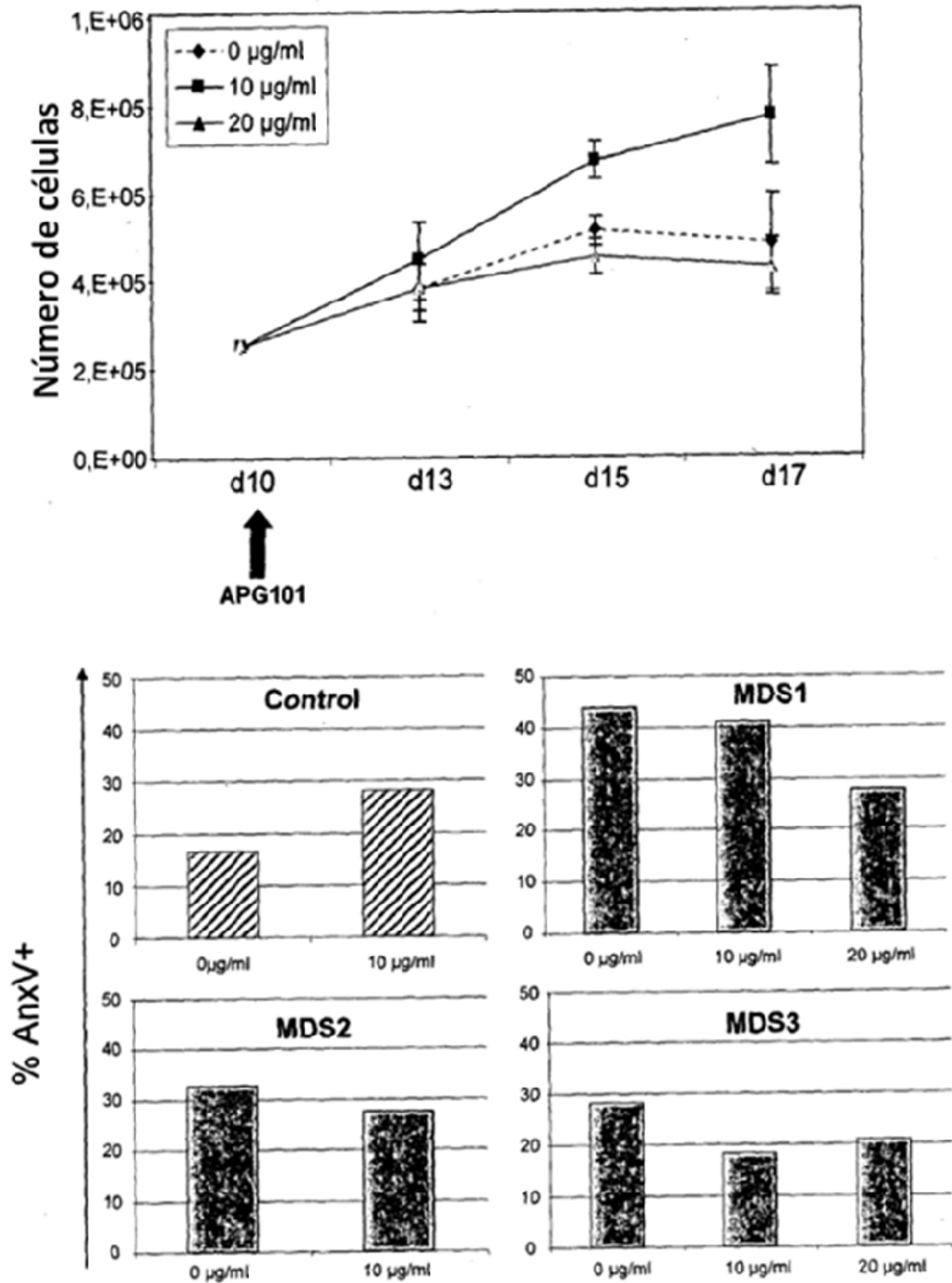


Figura 10

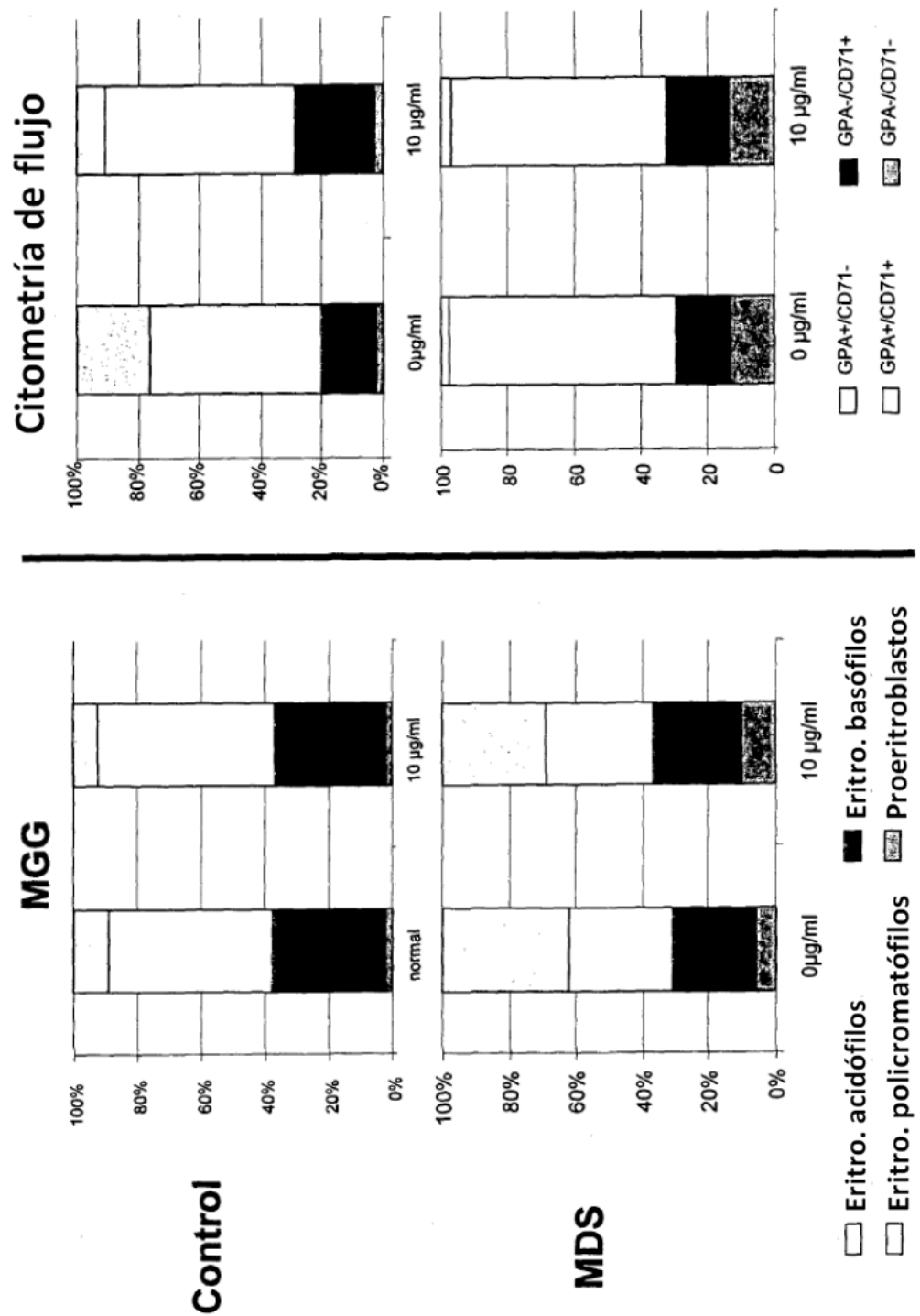


Figura 11

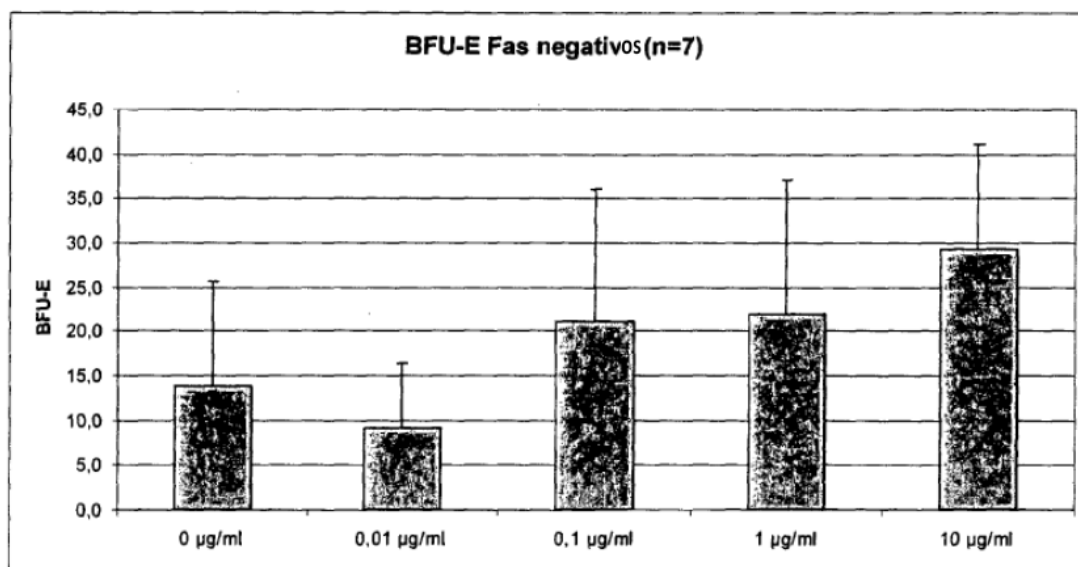
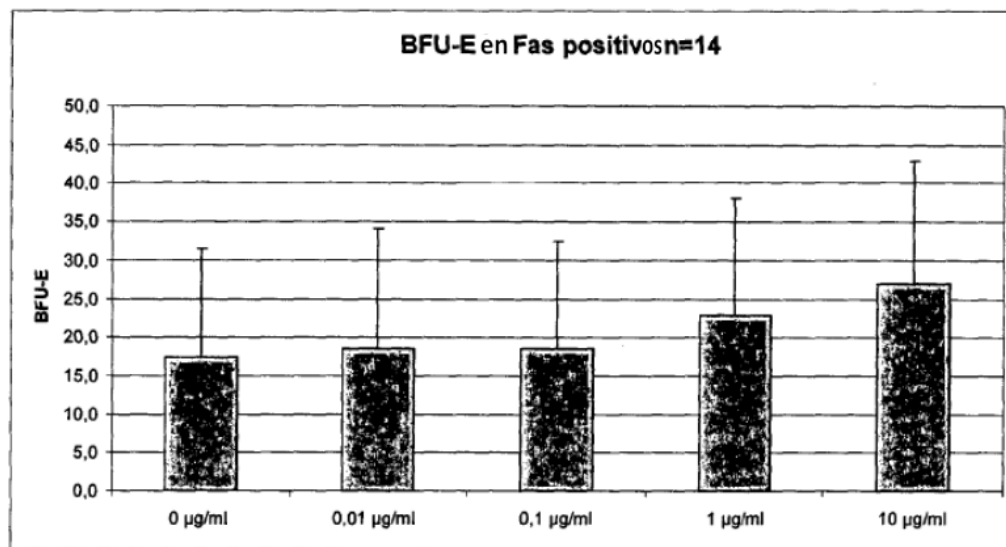


Figura 12

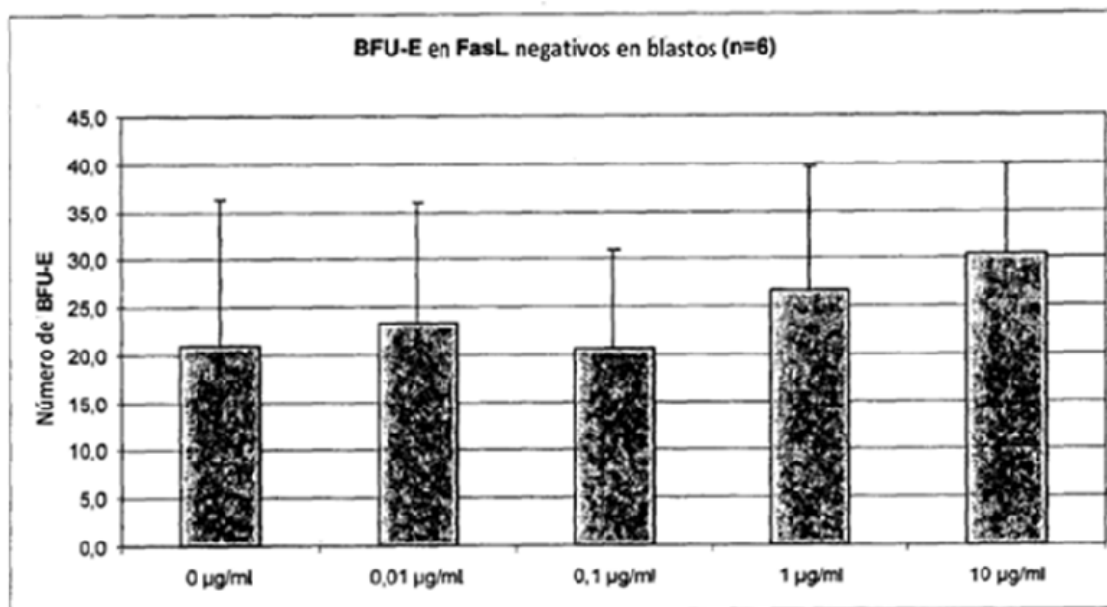
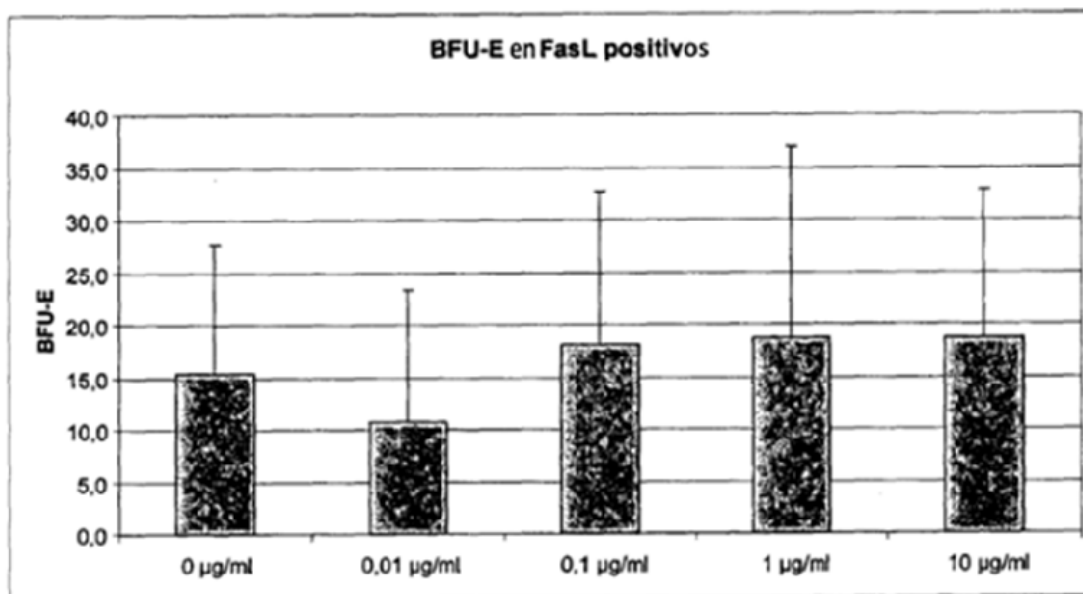


Figura 13

