

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 796 857**

51 Int. Cl.:

C07K 14/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.04.2015 PCT/EP2015/058245**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.10.2015 WO15158810**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2015 E 15715758 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2020 EP 3131922**

54 Título: **Polipéptidos y usos de los mismos para reducir la motilidad celular mediada por CD95**

30 Prioridad:

17.04.2014 EP 14305570

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

30.11.2020

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (12.5%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
UNIVERSITÉ DE BORDEAUX (12.5%);
UNIVERSITÉ DE RENNES (12.5%);
ECOLES DES HAUTES EN SANTE PUBLIQUE (EHESP) (12.5%);
UNIVERSITE DE LA GUYANE (12.5%);
UNIVERSITE DES ANTILLES (12.5%);
INSTITUT BERGONIÉ (12.5%) y
UNIVERSITY OF NOTTINGHAM (12.5%)**

72 Inventor/es:

**LEGEMBRE, PATRICK;
VACHER, PIERRE;
SANSEAU, DORIANE;
PENNA, AUBIN y
FLYNN, ROBIN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 796 857 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

Polipéptidos y usos de los mismos para reducir la motilidad celular mediada por CD95

Campo:

La presente descripción se refiere a polipéptidos y usos de los mismos para reducir la motilidad celular mediada por CD95.

Antecedentes:

El ligando de CD95 (CD95L, también conocido como FasL) pertenece a la familia de TNF (Factor de Necrosis Tumoral) y es el ligando para el "receptor de muerte" CD95 (Fas/APO1). CD95L es una "citocina" transmembrana cuyo dominio extracelular puede ser escindido por metaloproteasas, para producir un ligando soluble. Esta forma soluble se describió inicialmente como un ligando inerte que compite con su contraparte unida a la membrana por la unión a CD95, actuando así como un antagonista de la señal de muerte. Hallazgos más recientes han demostrado que CD95L escindido por metaloproteasa (cl-CD95L) puede participar activamente en el agravamiento de la inflamación en los trastornos inflamatorios crónicos, tales como el lupus eritematoso sistémico (y puede ejercer funciones pro-oncogénicas al promover la supervivencia de los cánceres de ovario y de hígado y resistencia a la quimioterapia de los cánceres de pulmón). Se han descrito péptidos derivados de CD95 para su uso en métodos de tratamiento de cáncer o enfermedades autoinmunitarias (véanse las patentes internacionales WO2010003766 y WO2004085478). La unión de CD95L transmembrana a CD95 conduce al reclutamiento de la proteína adaptadora de dominio de muerte asociada a la proteína Fas (FADD) a la región intracelular de CD95 denominada dominio de muerte (DD). A su vez, FADD se une a las caspasas 8 y 10. Este complejo CD95/FADD/caspasa se conoce como el complejo de señalización inductor de muerte (DISC) y desempeña un papel fundamental en el inicio de la señal apoptótica. Por el contrario, cl-CD95L no puede inducir la formación de DISC y, en cambio, promueve la formación de un receptosoma atípico que los autores de la presente invención han designado Complejo de Señalización Inductor de Motilidad (MISC) (Tauzin S, Chaigne-Delalande B, Selva E, Khadra N, Daburon S, Contin-Bordes C, et al. The naturally processed CD95L elicits a c-yes/calcium/PI3K-driven cell migration pathway. PLoS Biol. 2011; 9: e1001090.). Por consiguiente, es altamente deseable, un compuesto capaz de reducir la motilidad celular mediada por CD95 reductor.

Compendio de la presente invención:

Como se define por las reivindicaciones, la presente invención se refiere a polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que varía del residuo de aminoácido en la posición 175 al residuo de aminoácido en la posición 210 en SEQ ID NO: 1 y que comprende 36; 37; 38; 39; 40; 41; 42; 43; 44; 45; 46; 47; 48; 49; 50; 51; 52; 53; 54; 55; 56; 57; 58; 59; 60; 61; 62; 63; 64; 65; 66; 67; 68; 69; 70; 71; 72; 73; 74; 75; 76; 77; 78; 79; 80; 81; 82; 83; 84; 85; 86; 87; 88; 89; 90; 91; 92; 93; 94; 95; 96; 97; 98; 99; o 100 aminoácidos.

La presente invención también proporciona una proteína de fusión en donde el polipéptido de la reivindicación 1 se fusiona directamente o mediante un espaciador a al menos un polipéptido heterólogo.

La presente invención también se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de la reivindicación 1 o la proteína de fusión de la reivindicación 3.

La presente invención también proporciona un vector y un casete de expresión en el que la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 5 está asociada con elementos adecuados para controlar la transcripción y, opcionalmente, la traducción.

La presente invención también se refiere a una célula anfitriona que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 5 o el vector de la reivindicación 6.

La presente invención también proporciona un método para producir el polipéptido de la reivindicación 1 o la proteína de fusión de la reivindicación 3 que comprende la etapa que consiste en: (i) cultivar la célula anfitriona transformada de la reivindicación 7 en condiciones adecuadas para permitir la expresión de dicho polipéptido o proteína de fusión; y (ii) recuperar el polipéptido o la proteína de fusión expresados.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de la reivindicación 1 o la proteína de fusión de la reivindicación 3 y un portador farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también se refiere a un método para escrutar un fármaco para reducir la motilidad celular mediada por CD95 que comprende las etapas que consisten en a) determinar la capacidad de un compuesto candidato para inhibir la interacción entre CD95 y el polipéptido de la reivindicación 1 o la proteína de fusión de la reivindicación 3 y b) seleccionar positivamente el compuesto candidato que inhibe dicha interacción.

Descripción detallada:

El receptor de muerte CD95 juega un papel fundamental en la vigilancia inmunitaria. La unión de CD95L a CD95 conduce a la formación de un complejo molecular que consiste en la proteína adaptadora FADD y las proteasas caspasa-8 y -10. Este complejo se denomina complejo de señalización inductor de muerte (DISC). Los autores de la presente invención descubrieron que el acoplamiento de CD95 activa la fosfolipasa $\text{C}\gamma 1$ ($\text{PLC}\gamma 1$), que a su vez evoca una respuesta de calcio a través de la activación del receptor $\text{Ins}3\text{P Ins}1,4,5$ trisfosfato ($\text{IP}3$) ($\text{IP}3\text{R}$) y a continuación la multimerización del canal de calcio de la membrana plasmática Orai1. Las células tumorales expuestas a CD95L experimentan una redistribución de Orai1 en el agregado de CD95 donde desencadena un influjo de calcio localizado que inhibe transitoriamente la formación de DISC mediante el reclutamiento de la proteína quinasa $\text{C}\beta 2$ ($\text{PKC}\beta 2$). Además, esta señal de calcio puede promover la motilidad celular. En general, los datos de los autores de la presente invención indican claramente que inhibición de la respuesta de Ca^{2+} mediada por CD95 resulta ser un proceso atractivo para sensibilizar simultáneamente las células tumorales a la muerte y deteriorar su motilidad. Más recientemente, los autores de la presente invención descubrieron que, si bien la activación de $\text{PLC}\gamma 1$ perjudica la formación de DISC, FADD y caspasa-8 no participan en la señal de Ca^{2+} , lo que sugiere que se requiere la formación de un complejo molecular diferente para evocar la respuesta de calcio en las células expuestas a CD95L. Tras este análisis, también identificaron el dominio intracelular de CD95 responsable de la activación de $\text{PLC}\gamma 1$ y su bloqueo por un péptido conjugado con TAT inhibe la señal de calcio mediada por CD95. En resumen, la interrupción de la respuesta de Ca^{2+} mediada por CD95 mediante el uso de este péptido representa un nuevo mecanismo terapéutico para reducir la motilidad celular mediada por CD95 y, por lo tanto, ofrece medios para el tratamiento de cánceres, pero también de enfermedades autoinmunitarias.

Por consiguiente, un objeto de la presente descripción se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de 70% con la secuencia de aminoácidos que varía desde el residuo de aminoácido en la posición 175 hasta el residuo de aminoácido en la posición 191 en SEQ ID NO: 1.

Como se emplea en la presente memoria, el polipéptido que varía desde el residuo de aminoácido en la posición 175 hasta el residuo de aminoácido en la posición 191 se denomina "DID 175-191".

Como se emplea en la presente memoria, el término "CD95" tiene su significado general en la técnica y se refiere a CD95, el receptor presente sobre la superficie de las células de mamíferos, que originalmente se ha demostrado que tiene la capacidad de inducir apoptosis al unirse a la forma trimérica de su ligando afín, CD95L (Krammer, P.H. (2000). CD95's deadly mission in the immune system. Nature 407, 789-795). CD95 también se conoce como FasR o Apo-1. Una secuencia de aminoácidos ilustrativa de CD95 se muestra como SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 1: >sp|P25445|TNR6_HUMANO sin péptido señal:

RLSSKSVNAQVTDINSGLELRKTVTTVETQNLEGLHHDGQFCHKPCPPGERKARDCT
 VNGDEPDCVPCQEGKEYTDKAHFSSKCRRCRLCDEGHGLEVEINCTRTQNTKCRCKPN
 FFCNSTVCEHCDPCTKCEHGI I KECTLTSNTKCKEEGSRSNLWGLCLLLLPIPLIVWV
KRKEVQKTCRKHRKENQGSHESPTLNPETVAINLSVDLSDVLSKYITTIAGVMTLSQVKGF
 VRKNGVNEAKIDEIKNDNVQDTAEQKVQLLRNWHQLHGKKEAYDTLIKDLKKANLCTL
 AEKIQTIIILKDITSDSENSFRNEIQSLV

Según la descripción, una primera secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad con una segunda secuencia de aminoácidos significa que la primera secuencia tiene 70; 71; 72; 73; 74; 75; 76; 77; 78; 79; 80; 81; 82; 83; 84; 85; 86; 87; 88; 89; 90; 91; 92; 93; 94; 95; 96; 97; 98; o 99% de identidad con la segunda secuencia de aminoácidos. La identidad de la secuencia de aminoácidos se determina típicamente utilizando un algoritmo de alineación de secuencia y parámetros predeterminados adecuados, tales como BLAST P (Karlin y Altschul, 1990).

En particular, el polipéptido de la presente descripción es una variante conservativa funcional del polipéptido para la cual la secuencia de aminoácidos varía desde el residuo de aminoácido en la posición 175 hasta el residuo de aminoácido en la posición 191. Como se emplea en la presente memoria, el término "variante conservativa de función" representa aquellas en las que se ha cambiado un residuo de aminoácido dado en una proteína o enzima sin alterar la conformación y la función general del polipéptido, que incluye, pero no se limita a, el reemplazo de un aminoácido por otro que tenga propiedades similares (tal como, por ejemplo, polaridad, potencial de enlace de hidrógeno, ácido, alcalino, hidrófobo, aromático y similares). Por consiguiente, una "variante conservativa de la función" también incluye un polipéptido que tiene al menos 70% de identidad de aminoácidos y que tiene propiedades o funciones iguales o potencialmente similares a las de la proteína nativa o parental con la que se compara (es decir, inhibición de la motilidad celular mediada por CD95). Las propiedades funcionales del polipéptido de la presente descripción se podrían evaluar típicamente en cualquier ensayo funcional como se describe en los EJEMPLOS 1 y 2.

En particular, el polipéptido de la presente descripción tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que varía desde el residuo de aminoácido en la posición 175 hasta el residuo de aminoácido en la posición 192 en SEQ ID NO: 1).

En particular, el polipéptido de la presente descripción tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que varía desde el residuo de aminoácido en la posición 175 hasta el residuo de aminoácido en la posición 209 en SEQ ID NO: 1).

5 En particular, el polipéptido de la presente descripción tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos que varía desde el residuo de aminoácido en la posición 175 hasta el residuo de aminoácido en la posición 210 en la SEC ID NO: 1).

Como se emplea en la presente memoria, el polipéptido que varía desde el residuo de aminoácido en la posición 175 hasta el residuo de aminoácido en la posición 210 se denomina "dominio inductor de calcio" o "CID".

10 En particular, el polipéptido de la presente descripción comprende 18; 19; 20; 21; 22; 23; 24; 25; 26; 27; 28; 29; 30; 31; 32; 33; 34; 35; 36; 37; 38; 39; 40; 41; 42; 43; 44; 45; 46; 47; 48; 49; 50; 51; 52; 53; 54; 55; 56; 57; 58; 59; 60; 61; 62; 63; 64; 65; 66; 67; 68; 69; 70; 71; 72; 73; 74; 75; 76; 77; 78; 79; 80; 81; 82; 83; 84; 85; 86; 87; 88; 89; 90; 91; 92; 93; 94; 95; 96; 97; 98; 99; o 100 aminoácidos. En particular, el polipéptido de la presente descripción comprende menos de 50 aminoácidos. En particular, el polipéptido de la presente descripción comprende menos de 30 aminoácidos. En particular, el polipéptido de la presente descripción comprende menos de 25 aminoácidos. En particular, el polipéptido de la presente descripción comprende menos de 20 aminoácidos.

15 En particular, el polipéptido de la presente descripción está grapado. Un péptido "grapado" es un péptido que comprende un número seleccionado de aminoácidos convencionales o no convencionales, que comprende adicionalmente al menos dos radicales susceptibles de experimentar una reacción para promover la formación de enlaces carbono-carbono, que se ha puesto en contacto con un reactivo para generar al menos un entrecruzador entre los al menos dos radicales, que modula, por ejemplo, la estabilidad del péptido. Más concretamente, "grapado de péptidos" es un término acuñado para una metodología sintética utilizada para unir covalentemente dos cadenas laterales que contienen olefinas presentes en una cadena de polipéptidos utilizando una reacción de metátesis de olefinas (J. Org. Chem (2001) 66(16); Blackwell et al., Angew. Chem Int. Ed. (1998) 37:3281). Se ha demostrado que el grapado de un péptido utilizando un entrecruzador hidrocarbonado creado a partir de una reacción de metátesis de olefina ayuda a mantener la conformación nativa de un péptido, particularmente en condiciones fisiológicas (Patentes de Estados Unidos Núm. 7.192.713; 7.723.469; 7.786.072; Publicaciones de las Solicitudes de Patente de Estados Unidos Núm.: 2010-0184645; 2010-0168388; 2010-0081611; 2009-0176964; 2009-0149630; 2006-0008848; Publicaciones de Solicitud PCT Núm.: WO 2010/011313; WO 2008/121767; WO 2008/095063; WO 2008/061192; WO2005/044839; Schafmeister et al., J. Am. Chem Soc. (2000) 122:5891-5892; Walensky et al., Science (2004) 305: 1466-1470). La estrategia del péptido grapado en la que se genera un enlace entrecruzado totalmente hidrocarbonado mediante la metátesis de olefinas es un enfoque eficaz para aumentar el carácter helicoidal de los péptidos para elegir como diana motivos de unión α -helicoidales. A diferencia de sus análogos sin grapar, se ha demostrado que estos péptidos grapados hidrocarbonados son α -helicoidales, son resistentes a la proteasa y penetran en las células.

20 En particular, el polipéptido de la presente descripción se fusiona con al menos un polipéptido heterólogo (es decir, un polipéptido que no se deriva a CD95) para crear una proteína de fusión. El término "proteína de fusión" se refiere al polipéptido de acuerdo con la descripción que se fusiona directamente o mediante un espaciador a al menos un polipéptido heterólogo. En particular, la proteína de fusión comprende el polipéptido de acuerdo con la descripción que se fusiona directamente o mediante un espaciador en su extremo C-terminal al extremo N-terminal del polipéptido heterólogo, o en su extremo N-terminal extremo al C-terminal del polipéptido heterólogo.

25 Como se emplea en la presente memoria, el término "directamente" significa que el (primer o último) aminoácido en el extremo terminal (extremo N- o C-terminal) del polipéptido se fusiona con el (primer o último) aminoácido en el extremo terminal (extremo N- o C-terminal) del polipéptido heterólogo. En otras palabras, en particular, el último aminoácido del extremo C-terminal de dicho polipéptido está conectado directamente por un enlace covalente al primer aminoácido del extremo N-terminal de dicho polipéptido heterólogo, o el primer aminoácido del extremo N-terminal de dicho polipéptido está conectado directamente por un enlace covalente al último aminoácido del extremo C-terminal de dicho polipéptido heterólogo.

30 Como se emplea en la presente memoria, el término "espaciador" se refiere a una secuencia de al menos un aminoácido que conecta el polipéptido de la presente descripción al polipéptido heterólogo. Tal espaciador puede ser útil para prevenir impedimentos estéricos.

35 En particular, el polipéptido heterólogo es un péptido de penetración celular, una secuencia de penetración celular Transactivadora de la Transcription (TAT), un péptido permeable para las células o una secuencia de penetración membranosa. El término "péptidos que penetran en las células" es bien conocido en la técnica y se refiere a la secuencia permeable para las células o la secuencia de penetración membranosa tal como la penetratina, la secuencia y compuestos de penetración mitocondrial TAT (Bechara y Sagan, 2013; Jones y Sayers, 2012; Khafagy el y Morishita, 2012; Malhi y Murthy, 2012). En particular, el polipéptido heterólogo es una secuencia de internalización derivada del homeodominio de la proteína Antennapedia/Penetratina (Antp) de *Drosophila* (aminoácidos 43-58; SEQ ID NO: 2) o las secuencias penetrantes de células Transactivadoras de la Transcription (TAT) (SEQ ID NO: 3).

SEQ ID NO: 2 para Antennapedia/Penetratina (Antp) de Drosophila (aminoácidos 43-58):

RQIKIWFQNRMMKWKK

SEQ ID NO: 3 para la secuencia Tat de penetración de células Tat (47-57)

YGRKKRRQRRR

5 Los polipéptidos o proteínas de fusión de la presente descripción se pueden producir mediante cualquier mecanismo conocido per se en la técnica, tal como, sin limitación, cualquier mecanismo químico, biológico, genético o enzimático, ya sea solo o combinado. Por ejemplo, conociendo la secuencia de aminoácidos de la secuencia deseada, un experto en la técnica puede producir fácilmente dichos polipéptidos o proteínas de fusión, mediante mecanismos convencionales para la producción de secuencias de aminoácidos. Por ejemplo, se pueden sintetizar
10 utilizando un método de fase sólida bien conocido, típicamente utilizando un aparato de síntesis de péptidos disponible comercialmente (tal como el fabricado por Applied Biosystems, Foster City, California) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Alternativamente, los polipéptidos o proteínas de fusión de la presente descripción se pueden sintetizar mediante técnicas de ADN recombinante como ahora se conoce bien en la técnica. Por ejemplo, estos fragmentos se pueden obtener como productos de expresión de ADN después de la incorporación de
15 secuencias de ADN que codifican el (poli)péptido deseado a los vectores de expresión y la introducción de tales vectores en anfitriones eucarióticos o procarióticos adecuados que expresarán el polipéptido deseado, a partir de los cuales se pueden aislar más tarde utilizando mecanismos bien conocidos. Los polipéptidos o proteínas de fusión de la presente descripción se pueden utilizar en una forma aislada (p. ej., purificada) o contenida en un vector, tal como una membrana o vesícula lipídica (p. ej., un liposoma).

20 En particular, se contempla que los polipéptidos o las proteínas de fusión de acuerdo con la descripción puedan modificarse para mejorar su eficacia terapéutica. Tal modificación de compuestos terapéuticos se puede utilizar para disminuir la toxicidad, aumentar el tiempo circulatorio o modificar la biodistribución. Por ejemplo, la toxicidad de compuestos terapéuticos potencialmente importantes se puede disminuir significativamente mediante la combinación con una variedad de vehículos portadores de fármacos que modifican la biodistribución. Por ejemplo, una estrategia
25 para mejorar la viabilidad del fármaco es la utilización de polímeros solubles en agua. Se ha demostrado que varios polímeros solubles en agua modifican la biodistribución, mejoran el modo de captación celular, cambian la permeabilidad a través de barreras fisiológicas; y modifican la tasa de aclaramiento del organismo. Para lograr un efecto de liberación dirigida o sostenida, se han sintetizado polímeros solubles en agua que contienen radicales de fármaco como grupos terminales, como parte de la cadena principal o como grupos colgantes en la cadena de
30 polímero. Por ejemplo, la pegilación es un enfoque bien establecido y validado para la modificación de una gama de polipéptidos (Chapman, 2002). Los beneficios incluyen, entre otros: (a) semividas circulantes notablemente mejoradas *in vivo* debido a la evasión del aclaramiento renal como resultado de que el polímero aumenta el tamaño aparente de la molécula por encima del límite de filtración glomerular, y/o mediante la evasión de los mecanismos de aclaramiento celular; (b) reducción de la antigenicidad e inmunogenicidad de la molécula a la que está anclado el
35 PEG; (c) mejora de la farmacocinética; (d) potenciación de la resistencia proteolítica de la proteína conjugada (Cunningham-Rundles et al., 1992); y (e) mejora de la estabilidad térmica y mecánica del polipéptido PEGilado. Por lo tanto, en particular, los polipéptidos de la presente descripción pueden estar conectados covalentemente con uno o más grupos polietilenglicol (PEG).

40 Un objeto adicional de la presente descripción se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido o una proteína de fusión de acuerdo con la descripción.

Como se emplea en la presente memoria, una secuencia que "codifica" un producto de expresión, tal como un ARN, polipéptido, proteína o enzima, es una secuencia de nucleótidos que, cuando se expresa, da como resultado la producción de ese ARN, polipéptido, proteína o enzima, es decir, la secuencia de nucleótidos codifica una secuencia
45 de aminoácidos para ese polipéptido, proteína o enzima. Una secuencia codificante para una proteína puede incluir un codón de inicio (generalmente ATG) y un codón de parada.

Estas secuencias de ácido nucleico se pueden obtener por métodos convencionales bien conocidos por los expertos en la técnica. Típicamente, dicho ácido nucleico es una molécula de ADN o ARN, que se puede incluir en un vector adecuado, tal como un plásmido, cósmido, episoma, cromosoma artificial, fago o vector viral.

50 Por lo tanto, un objeto adicional de la presente descripción se refiere a un vector y un casete de expresión en los que una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido o una proteína de fusión de la presente descripción está asociada con elementos adecuados para controlar la transcripción (en particular promotor, potenciador y, opcionalmente, terminador) y, opcionalmente, la traducción, y también los vectores recombinantes en los que se inserta una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la descripción. Estos vectores recombinantes pueden ser, por ejemplo, vectores de clonación o vectores de expresión.

55 Como se emplea en la presente memoria, los términos "vector", "vector de clonación" y "vector de expresión" significan el vehículo mediante el cual una secuencia de ADN o ARN (p. ej., un gen foráneo) se puede introducir en una célula anfitriona, para transformar el anfitrión y promover la expresión (p. ej., transcripción y traducción) de la secuencia introducida. Se puede utilizar cualquier vector de expresión para células animales. Los ejemplos de

- 5 vectores adecuados incluyen pAGE107 (Miyaji et al., 1990), pAGE103 (Mizukami e Itoh, 1987), pHSG274 (Brady et al., 1984), pKCR (O'Hare et al., 1981), pSG1 beta d2-4 (Miyaji et al., 1990) y similares. Otros ejemplos de plásmidos incluyen plásmidos replicantes que comprenden un origen de replicación, o plásmidos integrativos, tales como por ejemplo pUC, pcDNA, pBR y similares. Otros ejemplos de vectores virales incluyen vectores adenovirales, retrovirales, virus del herpes y AAV. Tales virus recombinantes se pueden producir mediante mecanismos conocidos en la técnica, por ejemplo, transfectando células de empaquetamiento o mediante transfección transitoria con plásmidos o virus auxiliares. Los ejemplos típicos de células de empaquetamiento de virus incluyen células PA317, células PsiCRIP, células GPenv+, células 293, etc. Se pueden encontrar protocolos detallados para producir tales virus recombinantes de replicación defectuosa, por ejemplo, en los documentos WO 95/14785, WO 96/22378, US 10 5.882.877, US 6.013.516, US 4.861.719, US 5.278.056 y WO 94/19478. Los ejemplos de promotores y potenciadores utilizados en el vector de expresión para células animales incluyen el promotor temprano y el potenciador de SV40 (Mizukami e Itoh, 1987), el promotor y potenciador LTR del virus de la leucemia de ratón de Moloney (Kuwana et al., 1987), el promotor (Mason et al. al., 1985) y potenciador (Gillies et al., 1983) de la cadena H de inmunoglobulina y similares.
- 15 Un aspecto adicional de la presente descripción se refiere a una célula anfitriona que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido o una proteína de fusión de acuerdo con la descripción o un vector de acuerdo con la descripción. En particular, un sujeto de la presente descripción es una célula anfitriona procariótica o eucariótica transformada genéticamente con al menos una molécula o vector de ácido nucleico de acuerdo con la descripción.
- 20 El término "transformación" significa la introducción de un gen, secuencia de ADN o ARN "foráneos" (es decir, extrínsecos o extracelulares), en una célula anfitriona, de modo que la célula anfitriona expresará el gen o la secuencia introducidos para producir una sustancia deseada, típicamente un proteína o enzima codificada por el gen o secuencia introducidos. Una célula anfitriona que recibe y expresa el ADN o ARN introducidos ha sido "transformada".
- 25 En particular, para expresar y producir polipéptidos o proteínas de fusión de la presente descripción, se elegirán células procarióticas, en particular células de *E. coli*. En realidad, de acuerdo con la descripción, no es obligatorio producir el polipéptido o la proteína de fusión de la presente descripción en un contexto eucariótico que favorecerá las modificaciones postraduccionales (p. ej., glicosilación). Además, las células procarióticas tienen las ventajas de producir proteínas en grandes cantidades. Si se necesita un contexto eucariótico, pueden ser particularmente adecuadas las levaduras (p. ej. cepas de *saccharomyces*) ya que permiten la producción de grandes cantidades de proteínas. De lo contrario, se podrían utilizar líneas celulares eucarióticas típicas tales como CHO, BHK-21, COS-7, C127, PER.C6, YB2/0 o HEK293, por su capacidad para procesar las modificaciones postraduccionales correctas de la proteína de fusión de la presente descripción.
- 30 La construcción de vectores de expresión de acuerdo con la descripción, y la transformación de las células anfitrionas se pueden llevar a cabo utilizando técnicas convencionales de biología molecular. El polipéptido o la proteína de fusión de la presente descripción, por ejemplo, se pueden obtener cultivando células genéticamente transformadas de acuerdo con la descripción y recuperando el polipéptido o la proteína de fusión expresados por dicha célula, del cultivo. A continuación, si fuera necesario, se pueden purificar mediante procedimientos convencionales, conocidos en sí mismos por los expertos en la técnica, por ejemplo, mediante precipitación fraccionada, en particular precipitación con sulfato de amonio, electroforesis, filtración en gel, cromatografía de afinidad, etc. En particular, se pueden utilizar métodos convencionales para preparar y purificar proteínas recombinantes para producir las proteínas de acuerdo con la descripción.
- 35 Un aspecto adicional de la presente descripción se refiere a un método para producir un polipéptido o una proteína de fusión de la presente descripción que comprende la etapa que consiste en: (i) cultivar una célula anfitriona transformada de acuerdo con la descripción en condiciones adecuadas para permitir la expresión de dicho polipéptido o proteína de fusión; y (ii) recuperar el polipéptido o la proteína de fusión expresados.
- 40 Los polipéptidos y las proteínas de fusión de la presente descripción son particularmente adecuados para reducir la motilidad celular mediada por CD95 y, por lo tanto, pueden encontrar diversas aplicaciones terapéuticas.
- 45 En particular, el polipéptido o la proteína de fusión de la presente descripción son particularmente adecuados para reducir la motilidad de las células cancerosas mediada por CD95. En particular, los polipéptidos y las proteínas de fusión de la presente descripción son particularmente adecuados para el tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesite. Como se emplea en la presente memoria, el término "cáncer" tiene su significado general en la técnica e incluye, pero no se limita a, tumores sólidos y tumores transmitidos por la sangre. El término cáncer incluye enfermedades de la piel, tejidos, órganos, huesos, cartílagos, sangre y vasos. El término "cáncer" abarca adicionalmente cánceres tanto primarios como metastásicos. Los ejemplos de cánceres que se pueden tratar mediante los métodos y composiciones de la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, células cancerosas de la vejiga, sangre, hueso, médula ósea, cerebro, mama, colon, esófago, gastrointestinal, encía, cabeza, riñón, hígado, pulmón, nasofaringe, cuello, ovario, próstata, piel, estómago, testículos, lengua o útero. Además, el cáncer puede ser específicamente del siguiente tipo histológico, aunque no se limita a estos: neoplasia, maligna; carcinoma; carcinoma indiferenciado; carcinoma de células gigantes y fusiformes; carcinoma de células pequeñas; carcinoma
- 50
- 55
- 60

5 papilar; carcinoma de células escamosas; carcinoma linfoepitelial; carcinoma de células basales; carcinoma de pilomatriz; carcinoma de células de transición; carcinoma papilar de células de transición; adenocarcinoma; gastrinoma maligno; colangiocarcinoma; carcinoma hepatocelular; carcinoma hepatocelular y colangiocarcinoma combinados; adenocarcinoma trabecular; carcinoma adenoide quístico; adenocarcinoma en pólipo adenomatoso; adenocarcinoma, poliposis familiar; carcinoma sólido; tumor carcinoide, maligno; adenocarcinoma branquioloalveolar; adenocarcinoma papilar; carcinoma cromóforo; carcinoma acidófilo; adenocarcinoma oxifílico; carcinoma basófilo; adenocarcinoma de células claras; carcinoma de células granulares; adenocarcinoma folicular; adenocarcinoma papilar y folicular; carcinoma esclerosante no encapsulante; carcinoma cortical suprarrenal; carcinoma endometroide; carcinoma de apéndice de la piel; adenocarcinoma apocrino; adenocarcinoma sebáceo; adenocarcinoma ceruminoso; carcinoma mucoepidermoide; cistadenocarcinoma; cistadenocarcinoma papilar; cistadenocarcinoma seroso papilar; cistadenocarcinoma mucinoso; adenocarcinoma mucinoso; carcinoma de células en anillo de sello; carcinoma de conducto infiltrante; carcinoma medular; carcinoma lobular; carcinoma inflamatorio; enfermedad de Paget, mamaria; carcinoma de células acinares; carcinoma adenoescamoso; adenocarcinoma con metaplasia escamosa; timoma maligno; tumor del estroma ovárico, maligno; tecomoma maligno; tumor de células granulosas, maligno; y roblastoma maligno; carcinoma de células de Sertoli; tumor de células de Leydig, maligno; tumor de células lipídicas, maligno; paraganglioma maligno; paraganglioma extramamario, maligno; feocromocitoma; glomangiosarcoma; melanoma maligno; melanoma amelanótico; melanoma de extensión superficial; melanoma maligno en nevo gigante pigmentado; melanoma de células epitelioides; nevo azul, maligno; sarcoma; fibrosarcoma; histiocitoma fibroso, maligno; mixosarcoma; liposarcoma; leiomioma; rabdomiosarcoma; rabdomiosarcoma embrionario; rabdomiosarcoma alveolar; sarcoma del estroma; tumor mixto maligno; tumor mixto mulleriano; nefroblastoma; hepatoblastoma; carcinosarcoma; mesenquimoma maligno; tumor de Brenner, maligno; tumor filodes maligno; sarcoma sinovial; mesotelioma maligno; disgerminoma; carcinoma embrionario; teratoma maligno; struma ovarii, maligno; coriocarcinoma; mesonefoma, maligno; hemangiosarcoma; hemangioendotelioma maligno; sarcoma de Kaposi; hemangiopericitoma maligno; linfangiosarcoma; osteosarcoma; osteosarcoma yuxtacortical; condrosarcoma; condroblastoma maligno; condrosarcoma mesenquimatoso; tumor de células gigantes de hueso; sarcoma de Ewing; tumor odontogénico, maligno; odontosarcoma ameloblástico; ameloblastoma maligno; fibrosarcoma ameloblástico; pinealoma maligno; cordoma glioma maligno; ependimoma; astrocitoma; astrocitoma protoplasmático; astrocitoma fibrilar; astroblastoma; glioblastoma; oligodendroglioma; oligodendroblastoma; neuroectodérmico primitivo; sarcoma cerebeloso; ganglioneuroblastoma; neuroblastoma; retinoblastoma; tumor neurogénico olfativo; meningioma maligno; neurofibrosarcoma; neurilemmoma maligno; tumor de células granulares, maligno; linfoma maligno; enfermedad de Hodgkin; Linfoma de Hodgkin; paragranuloma linfoma maligno, linfocítico pequeño; linfoma maligno, de células grandes, difuso; linfoma maligno folicular; micosis fungoide; otros linfomas no Hodgkin especificados; histiocitosis maligna; mieloma múltiple; sarcoma de mastocitos; enfermedad inmunoproliferativa del intestino delgado; leucemia; leucemia linfoide; leucemia de células plasmáticas; eritroleucemia; leucemia de células de linfosarcoma; leucemia mieloide; leucemia basófila; leucemia eosinófila; leucemia monocítica; leucemia de mastocitos; leucemia megacarioblástica; sarcoma mieloide; y leucemia de células pilosas.

40 En particular, el polipéptido o la proteína de fusión de la presente es particularmente adecuado para el tratamiento del cáncer de mama triple negativo. Como se emplea en la presente memoria, la expresión "cáncer de mama triple negativo" tiene su significado general en la técnica y significa que dicho cáncer de mama carece de receptores para las hormonas estrógeno (ER-negativo) y progesterona (PR-negativo), y para la proteína HER2.

En particular, el polipéptido o la proteína de fusión de la presente descripción son particularmente adecuados para la prevención de la metástasis (p. ej., en un sujeto que padece un cáncer de mama triple negativo).

45 En particular, la presente descripción se refiere al polipéptido o la proteína de fusión de la presente descripción para su uso en la mejora de la eficacia terapéutica del tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesite. En particular, el polipéptido o la proteína de fusión de la presente descripción se pueden administrar de forma secuencial o concomitante con uno o más agentes terapéuticamente activos tales como agentes quimioterapéuticos o radioterapéuticos. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a, fludarabina, gemcitabina, capecitabina, metotrexato, mercaptopurina, tioguanina, hidroxurea, citarabina, ciclofosfamida, ifosfamida, nitrosoureas, complejos de platino tales como cisplatino, carboplatino y oxaliplatino, mitomicina, dacarbazina, procarbazona, epipodofiloxinas tales como etopósido y tenipósido, camptotecinas tales como irinotecán y topotecán, bleomicina, doxorubicina, idarrubicina, daunorubicina, dactinomicina, plicamicina, mitoxantrona, L-asparaginasa, doxorubicina, epirubicina, 5-fluorouracilo y 5-fluorouracilo combinado con leucovorina, taxanos tales como docetaxel y paclitaxel, levamisol, estramustina, mostazas nitrogenadas, nitrosoureas tales como carmustina y lomustina, alcaloides de vinca tales como vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina, mesilato de imatinib, hexametilmelamina, inhibidores de quinasa, inhibidores de fosfatasa, inhibidores de ATPasa, inhibidores trifostinas, inhibidores de proteasa, inhibidores de erbimicina A, genisteína, erbatina, y lavendustina A. En particular, se pueden seleccionar agentes terapéuticos activos adicionales entre, pero sin limitarse a, uno o una combinación de la siguiente clase de agentes: agentes alquilantes, alcaloides vegetales, inhibidores de la ADN topoisomerasa, antifolatos, análogos de pirimidina, análogos de purinas, antimetabolitos de ADN, taxanos, podofilotoxinas, terapias hormonales, retinoides, fotosensibilizadores o terapias fotodinámicas, inhibidores de la angiogénesis, agentes antimetabólicos, inhibidores de la isoprenilación, inhibidores del ciclo celular, actinomicina, bleomicina, antraciclinas, inhibidores de MDR e inhibidores de la Ca²⁺-ATPasa. Se pretende que el término "agente

radioterapéutico", como se emplea en la presente memoria, se refiera a cualquier agente radioterapéutico conocido por un experto en la técnica que sea eficaz para tratar o mejorar el cáncer, sin limitación. Por ejemplo, el agente radioterapéutico puede ser un agente tal como los administrados en braquiterapia o terapia con radionúclidos. Tales métodos pueden comprender opcionalmente adicionalmente la administración de una o más terapias adicionales contra el cáncer, tales como, pero no limitadas a, quimioterapias y/u otra radioterapia.

En particular, el polipéptido o la proteína de fusión de la presente descripción son particularmente adecuados para reducir la motilidad de linfocitos mediada por CD95 (p. ej., células T). En particular, el polipéptido o la proteína de fusión de la presente descripción son particularmente adecuados para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria. Como se emplea en la presente memoria, una "enfermedad autoinmunitaria" es una enfermedad o trastorno que surge y se dirige a los propios tejidos de un individuo. Los ejemplos de enfermedades autoinmunitarias incluyen, pero no se limitan a, Enfermedad de Addison, Alergia, Alopecia Areata, enfermedad de Alzheimer, Vasculitis asociada a anticuerpos citoplásmicos antineutrófilos (ANCA), Espondilitis Anquilosante, Síndrome Antifosfolípido (Síndrome de Hughes), artritis, Asma, Aterosclerosis, Placa aterosclerótica, enfermedad autoinmunitaria (p. ej., lupus, AR, EM, enfermedad de Graves, etc.), anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, enfermedad autoinmunitaria del oído interno, síndrome linfoproliferativo autoinmunitario, miocarditis autoinmunitaria, ooforitis autoinmunitaria, orquitis autoinmunitaria, azoospermia, enfermedad de Behcet, Enfermedad de Berger, penfigoide ampollar, miocardiopatía, enfermedad cardiovascular, esprúe celíaco/enfermedad celíaca, síndrome de disfunción inmunitaria por fatiga crónica (CFIDS), polineuritis idiopática crónica, polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIPD), polineuropatía crónica recurrente (síndrome de Guillain-Barré), Síndrome de Churg-Strauss (CSS), Penfigoide Cicatricial, Enfermedad de la Aglutinina Fría (CAD), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), síndrome CREST, enfermedad de Crohn, Dermatitis Herpetiforme, Dermatomiositis, diabetes, Lupus Discoide, Eccema, Epidermolísis ampollosa adquirida, Crioglobulinemia Mixta Esencial, Síndrome de Evan, Exoftalmos, Fibromialgia, Síndrome de Goodpasture, Tiroiditis de Hashimoto, Fibrosis Pulmonar Idiopática, Púrpura Trombocitopénica Idiopática (PTI), Nefropatía por IgA, enfermedad o trastorno inmunoproliferativo (p. ej., Psoriasis), Enfermedad inflamatoria intestinal (EII), incluida la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, Diabetes Mellitus Dependiente de Insulina, Enfermedad pulmonar intersticial, diabetes juvenil, Artritis Juvenil, artritis idiopática juvenil (AIJ), Enfermedad de Kawasaki, Síndrome Miasténico de Lambert-Eaton, Liquen Plano, lupus, Nefritis Lúpica, Linfocititis Linfocítica, Enfermedad de Ménière, Síndrome de Miller-Fisher/Encefalomielorradiculopatía diseminada aguda, Enfermedad del Tejido Conectivo Mixta, Esclerosis Múltiple (EM), reumatismo muscular, Encefalomielitis mialgica (EM), Miastenia Gravis, Inflamación Ocular, Pénfigo Foliáceo, Pénfigo Vulgar, Anemia Perniciosa, Poliarteritis Nodosa, Policondritis, Síndromes Poliglandulares (síndrome de Whitaker), Polimialgia Reumática, Polimiositis, Agammaglobulinemia Primaria, Cirrosis Biliar Primaria/Calangiopatía autoinmunitaria, Psoriasis, Artritis psoriásica, Fenómeno de Raynaud, Síndrome de Reiter/Artritis reactiva, Reestenosis, Fiebre Reumática, enfermedad reumática, Artritis Reumatoide, Sarcoidosis, síndrome de Schmidt, Escleroderma, Síndrome de Sjörgen, Síndrome de Hombre Rígido, Lupus Eritematoso Sistémico (LES), escleroderma sistémica, Arteritis de Takayasu, Arteritis Temporal/Arteritis de Células Gigantes, Tiroiditis, diabetes Tipo 1, diabetes Tipo 2, Colitis ulcerosa, Uveítis, Vasculitis, Vitiligo y Granulomatosis de Wegener.

En particular, el polipéptido o la proteína de fusión de la presente descripción son particularmente adecuados para el tratamiento del lupus eritematoso sistémico.

En particular, el polipéptido o proteína de fusión de la presente descripción son particularmente adecuados para el tratamiento de una afección inflamatoria. El término "afección inflamatoria", como se emplea en la presente memoria, se refiere a respuestas localizadas o sistémicas agudas o crónicas a estímulos dañinos, tales como patógenos, células dañadas, lesiones físicas o irritantes, que están mediadas en parte por la actividad de citocinas, quimiocinas o células inflamatorias. (p. ej., neutrófilos, monocitos, linfocitos, macrófagos) y se caracteriza en la mayoría de los casos por dolor, enrojecimiento, hinchazón y deterioro de la función del tejido. La afección inflamatoria se puede seleccionar del grupo que consiste en: sepsis, septicemia, neumonía, choque séptico, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), Síndrome de Dificultad Respiratoria Aguda (SDRA), lesión pulmonar aguda, neumonía por aspiración, infección, pancreatitis, bacteriemia, peritonitis, absceso abdominal, inflamación debida a traumatismo, inflamación debida a cirugía, enfermedad inflamatoria crónica, isquemia, lesión por isquemia-reperusión de un órgano o tejido, daño tisular debido a enfermedad, daño tisular debido a quimioterapia o radioterapia, y reacciones a sustancias ingeridas, inhaladas, infundidas, inyectadas o administradas, glomerulonefritis, infección intestinal, infecciones oportunistas, y para sujetos sometidos a cirugía mayor o diálisis, sujetos inmunocomprometidos, sujetos con agentes inmunosupresores, sujetos con VIH/SIDA, sujetos con sospecha de endocarditis, sujetos con fiebre, sujetos con fiebre de origen desconocido, sujetos con fibrosis quística, sujetos con diabetes mellitus, sujetos con insuficiencia renal crónica, sujetos con bronquiectasia, sujetos con enfermedad pulmonar obstructiva crónica, bronquitis crónica, enfisema o asma, sujetos con neutropenia febril, sujetos con meningitis, sujetos con artritis séptica, sujetos con infección del tracto urinario, sujetos con fascitis necrotizante, sujetos con otra sospecha de infección por estreptococos del Grupo A, sujetos que han tenido una esplenectomía, sujetos con infección por enterococos recurrente o sospechada, otras afecciones médicas y quirúrgicas asociadas con un mayor riesgo de infección, sepsis Gram positiva, sepsis Gram negativa, sepsis con cultivo negativo, sepsis fúngica, meningococemia, síndrome post-bombeo, síndrome de aturdimiento cardíaco, accidente cerebrovascular, insuficiencia cardíaca congestiva, hepatitis, epiglotitis, E. coli 0157:H7, malaria, gangrena gaseosa, síndrome de choque tóxico, preeclampsia, eclampsia, síndrome HELP, tuberculosis micobacteriana, Pneumocystic carinii, neumonía,

leishmaniasis, síndrome urémico hemolítico/púrpura trombocitopénica trombótica, fiebre hemorrágica del dengue, enfermedad inflamatoria pélvica, legionella, enfermedad de Lyme, Influenza A, virus de Epstein-Barr, encefalitis, enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias, incluyendo artritis reumatoide, osteoartritis, esclerosis sistémica progresiva, lupus eritematoso sistémico, enfermedad inflamatoria intestinal, fibrosis pulmonar idiopática, sarcoidosis, neumonitis por hipersensibilidad, vasculitis sistémica, granulomatosis de Wegener, trasplantes que incluyen corazón, hígado, pulmón, riñón, médula ósea, enfermedad de injerto contra anfitrión, rechazo de trasplante, anemia falciforme, síndrome nefrótico, toxicidad de agentes tales como OKT3, terapia con citocinas y cirrosis.

En particular, el polipéptido o proteína de fusión de la presente descripción son particularmente adecuados para prevenir la transmigración de células Th17. Por consiguiente, el polipéptido o la proteína de fusión de la presente descripción son particularmente adecuados para tratar enfermedades mediadas por Th17. El término "enfermedad mediada por Th17" se utiliza en la presente memoria en el sentido más amplio e incluye todas las enfermedades y afecciones patológicas cuya patogenia implica anomalías de las células Th17. Como se emplea en la presente memoria, el término "células Th17" tiene su significado general en la técnica y se refiere a un subconjunto de células T auxiliares que producen interleucina 17 (IL-17). "A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage". Nat. Med. 13 (2): 139-145). El término "IL-17" tiene su significado general en la técnica y se refiere a la proteína interleucina-17A. Típicamente, las células Th17 se caracterizan por la expresión clásica de marcadores de células Th en su superficie celular tal como CD4, y por la expresión de IL17. Típicamente, como se hace referencia en la presente memoria, una célula Th17 es una célula IL-17+. Los ejemplos de enfermedades mediadas por Th17 incluyen, pero no se limitan a, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias, osteoclasia y rechazo de trasplante de células, tejidos y órganos. En particular, las enfermedades mediadas por Th17 mencionadas anteriormente pueden ser una o más seleccionadas del grupo que consiste en la enfermedad de Behçet, polimiositis/dermatomiositis, citopenias autoinmunitarias, miocarditis autoinmunitaria, cirrosis hepática primaria, síndrome de Goodpasture, meningitis autoinmunitaria, síndrome de Sjögren, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Addison, alopecia areata, espondilitis anquilosante, hepatitis autoinmunitaria, paperas autoinmunitarias, enfermedad de Crohn, diabetes mellitus insulino dependiente, epidermolisis ampollosa distrófica, epididimitis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, anemia de Hashimoto, enfermedad de Hashimoto, enfermedad de Hashimoto, enfermedad de Hashimoto esclerosis, miastenia gravis, pénfigo vulgar, psoriasis, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, escleroma, espondiloartropatía, tiroiditis, vasculitis, vitiligo, mixedema, anemia perniciosa y colitis ulcerosa.

Típicamente, el polipéptido o proteína de fusión de la presente descripción se administran al sujeto en una cantidad terapéuticamente eficaz. Por "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende una cantidad suficiente del polipéptido o proteína de fusión de la presente descripción para alcanzar un efecto terapéutico (p. ej., tratamiento del cáncer). Sin embargo, se entenderá que el uso diario total de los compuestos y composiciones de la presente descripción será decidido por el médico a cargo dentro del alcance del buen criterio médico. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier sujeto en particular dependerá de una variedad de factores que incluyen el trastorno que esté siendo tratado y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del sujeto; el tiempo de administración, la ruta de administración y la velocidad de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos utilizados de manera combinada o coincidente con el polipéptido específico empleado; y como factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Por ejemplo, está dentro de los conocimientos de la técnica comenzar las dosis del compuesto a niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta que se logre el efecto deseado. Sin embargo, la dosificación diaria de los productos puede variar a lo largo de un amplio intervalo de 0,01 a 1.000 mg por adulto por día. Típicamente, las composiciones contienen 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 y 500 mg del ingrediente activo para el ajuste sintomático de la dosis al sujeto que se vaya a tratar. Un medicamento típicamente contiene de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg del ingrediente activo, típicamente de 1 mg a aproximadamente 100 mg del ingrediente activo. Normalmente se suministra una cantidad eficaz del medicamento a un nivel de dosificación de 0,0002 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal por día, especialmente de aproximadamente 0,001 mg/kg a 7 mg/kg de peso corporal por día.

En particular, el método terapéutico de la presente comprende las etapas de i) determinar el nivel de i) determinar el nivel de CD95L soluble en una muestra de sangre obtenida del sujeto, ii) comparar el nivel determinado en la etapa i) con un valor de referencia predeterminado y iii) administrar al sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido o proteína de fusión de la presente descripción cuando el nivel determinado en la etapa i) es mayor que el valor de referencia determinado previamente.

Como se emplea en la presente memoria, el término CD95L tiene su significado general en la técnica y se refiere al ligando afín de CD95 que es una proteína transmembrana. Como se emplea en la presente memoria, el término "CD95L soluble" tiene su significado general en la técnica y se refiere al ligando soluble producido por la escisión del CD95L transmembrana (también conocido como FasL) (Matsuno et al., 2001; Vargo-Gogola et al., 2002; Kiaei et al., 2007; Kirkin et al., 2007; o Schulte et al., 2007). El término "CD95L en suero", "CD95L soluble", "CD95L escindido con metaloproteasa" y "cl-CD95L" tienen el mismo significado a lo largo de la memoria descriptiva.

Según la descripción, la medida del nivel de CD95L soluble se puede realizar mediante una variedad de técnicas. Típicamente, los métodos pueden comprender poner en contacto la muestra con un compañero de unión capaz de

interactuar selectivamente con CD95L soluble en la muestra. En algunos aspectos, los compañeros de unión son anticuerpos, tales como, por ejemplo, anticuerpos monoclonales o incluso aptámeros. Los ensayos mencionados generalmente implican la unión del compañero (es decir, anticuerpo o aptámero) a un soporte sólido. Los soportes sólidos, que se pueden utilizar en la práctica de la presente descripción incluyen sustratos tales como nitrocelulosa (p. ej., en forma de membrana o pocillos de microtitulación); poli(cloruro de vinilo) (p. ej., láminas o pocillos de microtitulación); látex de poliestireno (p. ej., cuentas o placas de microtitulación); poli(fluoruro de vinilideno); papel diazotado; membranas de nailon; cuentas activadas, cuentas que responden magnéticamente y similares. El nivel de CD95L soluble se puede medir utilizando técnicas de inmunodiagnóstico convencionales, que incluyen inmunoensayos tales como ensayos de competición, reacción directa o tipo sándwich. Tales ensayos incluyen, pero no se limitan a, pruebas de aglutinación; inmunoensayos marcados con, y mediados por, enzimas, tales como ELISA; ensayos de tipo biotina/avidina; radioinmunoensayos; inmunoelectroforesis; inmunoprecipitación. Una prueba bioquímica ilustrativa para identificar proteínas específicas emplea un formato de prueba normalizado, tal como la prueba ELISA, aunque la información proporcionada en la presente memoria se puede aplicar al desarrollo de otras pruebas bioquímicas o de diagnóstico y no se limita al desarrollo de una prueba ELISA (véase, p. Ej. , Molecular Immunology: A Textbook, editado por Atassi et al. Marcel Dekker Inc., Nueva York y Basilea 1984, para una descripción de las pruebas ELISA). Se entiende que están disponibles kits comerciales de ensayo de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) para diversos constituyentes plasmáticos. Por lo tanto, se puede utilizar el método ELISA, en donde los pocillos de una placa de microtitulación están recubiertos con un conjunto de anticuerpos, que reconocen CD95L soluble. A continuación, se añade una muestra que contiene o se sospecha que contiene CD95L soluble a los pocillos recubiertos. Después de un período de incubación suficiente para permitir la formación de complejos anticuerpo-antígeno, la placa o las placas se pueden lavar para eliminar radicales no unidos y añadir una molécula de unión secundaria marcada de forma detectable. Se permite que la molécula de unión secundaria reaccione con cualquier proteína marcadora de muestra capturada, se lava la placa y se detecta la presencia de la molécula de unión secundaria utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Típicamente, los niveles de CD95L soluble inmunorreactivo en una muestra se pueden medir mediante un ensayo inmunométrico sobre la base de una técnica "sandwich" de doble anticuerpo, con un anticuerpo monoclonal específico para CD95L soluble (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan). Dichos medios para medir el nivel de CD95L soluble son, por ejemplo, i) un tampón de CD95L soluble, ii) un anticuerpo monoclonal que interactúa específicamente con CD95L soluble, iii) un anticuerpo conjugado con enzima específico para CD95L soluble y un valor de referencia predeterminado de CD95L soluble.

Otro objeto de la presente descripción se refiere a una composición farmacéutica que comprende un polipéptido o la proteína de fusión o la secuencia de ácido nucleico o el vector de expresión o la célula anfitriona de acuerdo con la descripción y un portador farmacéuticamente aceptable. Típicamente, el polipéptido o la proteína de fusión o la secuencia de ácido nucleico o el vector de expresión o la célula anfitriona de acuerdo con la descripción se pueden combinar con excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas. "Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refieren a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción inapropiada cuando se administran a un mamífero, especialmente a un ser humano, según corresponda. Un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a una carga, diluyente, material encapsulante o formulación auxiliar no tóxica sólida, semisólida o líquida de cualquier tipo.

En las composiciones farmacéuticas de la presente descripción para administración oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, local o rectal, el principio activo, solo o combinado con otro principio activo, se puede administrar en una forma de administración unitaria, como mezcla con soportes farmacéuticos convencionales, a animales y seres humanos. Las formas de administración de unidades adecuadas comprenden formas de ruta oral tales como comprimidos, cápsulas de gel, polvos, gránulos y suspensiones o soluciones orales, formas de administración sublingual y bucal, aerosoles, implantes, formas de administración subcutáneas, transdérmicas, tópicas, intraperitoneales, intramusculares, intravenosas, subdérmicas, transdérmicas, intratecales e intranasales y formas de administración rectales.

Típicamente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos, que son farmacéuticamente aceptables para una formulación susceptible de ser inyectada. Estas pueden ser en particular soluciones salinas isotónicas, estériles (fosfato monosódico o disódico, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares o mezclas de tales sales), o composiciones secas, especialmente liofilizadas, que después de la adición, dependiendo del caso, de agua esterilizada o solución salina fisiológica, permite la constitución de soluciones inyectables. Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil jeringabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y se debe preservar contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. Las soluciones que comprenden compuestos de la presente descripción como base libre o sales farmacológicamente aceptables se pueden preparar en agua adecuadamente mezclada con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos. El polipéptido o proteína de fusión de la

presente descripción se pueden formular en una composición en forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también se pueden obtener a partir de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férricos, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares. El portador también puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensoactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede ser provocada por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina. Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización mediante filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados a un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión alcalino y los otros ingredientes requeridos entre los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son técnicas de secado a vacío y liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución del mismo previamente filtrada en condiciones estériles. También se contempla la preparación de soluciones más concentradas, o altamente concentradas para inyección directa, donde se prevé el uso de DMSO como disolvente para dar como resultado una penetración extremadamente rápida, suministrando altas concentraciones de los agentes activos a un área tumoral pequeña. Tras la formulación, las soluciones se administrarán de manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, tales como el tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente, pero también se pueden emplear cápsulas de liberación de fármacos y similares. Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución se debe tamponar adecuadamente si fuera necesario y el volver isotónico el diluyente líquido en primer lugar con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas concretas son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, los expertos en la técnica conocerán los medios acuosos estériles que se pueden emplear a la luz de la presente descripción. Se producirá necesariamente alguna variación en la dosificación dependiendo de la afección del sujeto que se esté tratando. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis adecuada para el sujeto individual.

En particular, el polipéptido o proteína de fusión de la presente descripción son particularmente adecuados para su uso en métodos de escrutinio para identificar fármacos para reducir la motilidad celular mediada por CD95 en un sujeto.

Por consiguiente, un aspecto adicional de la presente descripción consiste en un método para escrutar un fármaco para reducir la motilidad celular mediada por CD95 que comprende las etapas que consisten en a) determinar la capacidad de un compuesto candidato para inhibir la interacción entre CD95 y un polipéptido o proteína de fusión de la presente descripción y b) seleccionar positivamente el compuesto candidato que inhibe dicha interacción.

En la etapa a), cualquier método adecuado para la detección de interacciones proteína-proteína es apropiado. Cualquiera que sea la etapa a) del método de escrutinio, la proteína CD95 completa y el polipéptido o la proteína de fusión de la presente descripción se pueden utilizarse como compañeros de unión. Alternativamente, se utilizan fragmentos de proteína CD95 que incluyen el sitio de interacción. Por lo tanto, en particular, la etapa a) del método de escrutinio de la presente descripción consiste en determinar la capacidad del compuesto candidato para inhibir la unión entre dos polipéptidos o proteínas de fusión de la presente descripción.

En particular, la etapa a) consiste en generar valores físicos que ilustran o no la capacidad del compuesto candidato para inhibir la interacción entre los dos polipéptidos o proteínas de fusión de la presente descripción y comparar dichos valores con los valores físicos convencionales obtenidos en el mismo ensayo realizado en ausencia de dicho compuesto candidato. Los "valores físicos" a los que se hace referencia anteriormente pueden ser de varios tipos dependiendo del ensayo de unión que se realiza, pero en particular abarcan valores de absorbancia de luz, señales radiactivas y valor de intensidad de la señal de fluorescencia. Si después de la comparación de los valores físicos con los valores físicos convencionales, se determina que dicho compuesto candidato modula la unión entre dicho primer polipéptido y dicho segundo polipéptido, en ese caso el candidato se selecciona positivamente en la etapa b).

En particular, el polipéptido o la proteína de fusión de la presente descripción se marcan con una molécula detectable para los propósitos de escrutinio. Típicamente, la molécula detectable puede consistir en cualquier compuesto o sustancia que sea detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos. Por ejemplo, las moléculas detectables útiles incluyen sustancias radiactivas (incluidas las que comprenden ³²P, ²⁵S, ³H o ¹²⁵I), colorantes fluorescentes (que incluyen 5-bromodesosirudina,

fluoresceína, acetilaminofluoreno o digoxigenina), proteínas fluorescentes (que incluyen GFP y YFP) o proteínas o péptidos detectables (que incluyen biotina, colas de polihistidina u otras etiquetas de antígeno como el antígeno HA, el antígeno FLAG, el antígeno c-myc y el antígeno DNP). En particular, la molécula detectable se encuentra en, o se une a, un residuo de aminoácido ubicado fuera de dicha secuencia de aminoácidos de interés, para minimizar o prevenir cualquier artefacto para la unión entre dichos polipéptidos o entre el compuesto candidato y/o cualquiera de los polipéptidos.

En particular, los polipéptidos de la presente descripción están fusionados con una etiqueta GST (Glutación S-transferasa). En particular, el radical GST de dicha proteína de fusión se puede utilizar como molécula detectable. En dicha proteína de fusión, GST puede estar ubicado en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal. La molécula detectable de GST se puede detectar cuando posteriormente se pone en contacto con un anticuerpo anti-GST, incluso con un anticuerpo anti-GST marcado. Los anticuerpos anti-GST marcados con diversas moléculas detectables están fácilmente disponibles comercialmente.

En particular, los polipéptidos de la presente descripción están fusionados con una etiqueta de polihistidina. Dicha etiqueta de polihistidina usualmente comprende al menos cuatro residuos de histidina consecutivos y generalmente al menos seis residuos de histidina consecutivos. Tal etiqueta polipeptídica también puede comprender hasta 20 residuos de histidina consecutivos. Dicha etiqueta de polihistidina se puede ubicar en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal. En particular, la etiqueta de poli-histidina se puede detectar cuando posteriormente se pone en contacto con un anticuerpo anti-poli-histidina, incluso con un anticuerpo anti-poli-histidina marcado. Los anticuerpos anti-poli-histidina marcados con diversas moléculas detectables están fácilmente disponibles comercialmente.

En particular, los polipéptidos de la presente descripción están fusionados con un radical de proteína que consiste en el dominio de unión a ADN o el dominio activador de un factor de transcripción. Dicho dominio de transcripción del radical de proteína se puede localizar en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal. Tal dominio de unión a ADN puede consistir en el conocido dominio de unión a ADN de la proteína LexA que se origina a partir de E. Coli. Además, dicho dominio activador de un factor de transcripción puede consistir en el dominio activador de la conocida proteína Gal4 que se origina a partir de levadura.

En el método de escrutinio concreto de acuerdo con la descripción, los polipéptidos o las proteínas de fusión de la presente descripción comprenden una porción de un factor de transcripción. En dicho ensayo, la unión de las porciones primera y segunda genera un factor de transcripción funcional que se une a una secuencia de ADN reguladora específica, que a su vez induce la expresión de una secuencia de ADN informadora, siendo dicha expresión detectada y/o medida adicionalmente. Una detección positiva de la expresión de dicha secuencia de ADN informadora significa que se forma un factor de transcripción activo, debido a la unión de dichos polipéptidos o proteínas de fusión de la presente descripción. Usualmente, en un ensayo de dos híbridos, la primera y la segunda porciones de un factor de transcripción consisten respectivamente en (i) el dominio de unión a ADN de un factor de transcripción y (ii) el dominio activador de un factor de transcripción. En particular, el dominio de unión a ADN y el dominio activador se originan a partir del mismo factor de transcripción natural. En particular, el dominio de unión a ADN y el dominio activador se originan a partir de distintos factores naturales, mientras que, cuando se unen, estas dos porciones forman un factor de transcripción activo. El término "porción" cuando se utiliza en la presente memoria para factor de transcripción, abarca proteínas completas implicadas en factores de transcripción de múltiples proteínas, así como dominios de proteínas funcionales específicas de una proteína de factor de transcripción completa. Por lo tanto, en particular, la etapa a) del método de escrutinio de la presente descripción comprende las siguientes etapas:

(1) proporcionar una célula anfitriona que expresa:

- una primera proteína de fusión entre (i) un polipéptido de la presente descripción y (ii) una primera porción de proteína del factor de transcripción

- una segunda proteína de fusión entre (i) un polipéptido de la presente descripción y (ii) una segunda porción de un factor de transcripción

dicho factor de transcripción está activo en la secuencia reguladora diana de ADN cuando la primera y la segunda porciones de proteína se unen entre sí y

dicha célula anfitriona también contiene un ácido nucleico que comprende (i) una secuencia de ADN reguladora que se puede activar mediante dicho factor de transcripción activo y (ii) una secuencia informadora de ADN que está conectada operativamente a dicha secuencia reguladora

(2) poner dicha célula anfitriona proporcionada en la etapa 1) en contacto con un compuesto candidato que se vaya a someter a prueba

(3) determinar el nivel de expresión de dicha secuencia informadora de ADN

El nivel de expresión de dicha secuencia informadora de ADN que se determina en la etapa (3) anterior se compara con la expresión de dicha secuencia informadora de ADN cuando se omite la etapa (2). Un nivel de expresión

diferente de dicha secuencia informadora de ADN en presencia del compuesto candidato significa que dicho compuesto candidato inhibe eficazmente la unión entre los dos polipéptidos de la presente descripción y que dicho compuesto candidato se puede seleccionar positivamente en una etapa b) del método de escrutinio.

5 Las células anfitrionas adecuadas incluyen, sin limitación, células procarióticas (tales como bacterias) y células eucarióticas (tales como células de levadura, células de mamífero, células de insecto, células vegetales, etc.). Sin embargo, las células anfitrionas preferidas son células de levadura y más preferiblemente una célula de *Saccharomyces cerevisiae* o una célula de *Schizosaccharomyces pombe*. Sistemas similares de ensayos de dos híbridos son bien conocidos en la técnica y, por lo tanto, se pueden utilizar para realizar el método de escrutinio de acuerdo con la descripción (véanse. Fields et al. 1989; Vasavada et al. 1991; Fearon et al. 1992; Dang et al., 1991, Chien et al. 1991, documento US 5.283.173, documento US 5.667.973, documento US 5.468.614, documento US 5.525.490 y documento US 5.637.463). Por ejemplo, como se describe en estos documentos, el dominio activador Gal4 se puede utilizar para realizar el método de escrutinio según la descripción. Gal4 consiste en dos dominios modulares físicamente discretos, uno que actúa como dominio de unión a ADN y el otro que funciona como dominio de activación de la transcripción. El sistema de expresión de levadura descrito en los documentos anteriores aprovecha esta propiedad. La expresión de un gen informador Gall-LacZ bajo el control de un promotor activado por Gal4 depende de la reconstitución de la actividad de Gal4 a través de la interacción proteína-proteína. Las colonias que contienen polipéptidos que interactúan se detectan con un sustrato cromogénico para la β -galactosidasa. Clontech comercializa un kit de competición (MATCHMAKER, TM) para identificar interacciones proteína-proteína. En particular, un primer polipéptido de la presente descripción se fusiona al dominio de unión a ADN de Gal4 y un segundo polipéptido de la presente descripción como se definió anteriormente se fusiona al dominio de activación de Gal4. La expresión de dicho gen marcador detectable se puede evaluar cuantificando la cantidad del ARNm específico correspondiente producido. Sin embargo, generalmente la secuencia del gen marcador detectable codifica la proteína detectable, de modo que el nivel de expresión de dicho gen marcador detectable se evalúa cuantificando la cantidad de la proteína producida correspondiente. Los mecanismos para cuantificar la cantidad de ARNm o proteína son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el gen marcador detectable colocado bajo el control de la secuencia reguladora puede consistir en la β -galactosidasa como se describió anteriormente.

En particular, los primeros polipéptidos o proteínas de fusión de la presente descripción están marcados con una molécula o sustrato fluorescentes. Por lo tanto, el posible efecto de alteración del compuesto candidato que se vaya a someter a prueba sobre la unión entre los 2 polipéptidos o proteínas de fusión de la presente descripción se determina mediante cuantificación de la fluorescencia.

En particular, la molécula detectable es un sistema de complementación de fragmentos de proteínas, en donde un fragmento de proteína fusionado a un polipéptido de la presente descripción es complementario a otro fragmento de proteína fusionado al otro polipéptido de la presente descripción y la complementación de fragmentos de proteína genera una señal medible (ensayo de complementación de fragmentos de proteínas). En particular, los fragmentos proteicos complementarios generan una enzima activa. En particular, la enzima activa es la β -lactamasa que puede generar un producto coloreado a partir de un sustrato tal como la nitrocefina, un producto fluorescente del sustrato tal como Fluorocillin Green o un producto bioluminiscente (combinado con luciferasa de luciérnaga) a partir de un sustrato tal como Bluco (β -lactama-D-luciferina). En particular, la enzima activa es una luciferasa que puede generar bioluminiscencia a partir de un sustrato tal como D-luciferina para luciferasa de luciérnaga y luciferina celenterazina para luciferasas de renilla y *gaussia*.

En particular, los polipéptidos de la presente descripción están marcados con moléculas fluorescentes que son adecuadas para realizar la detección y/o cuantificación de fluorescencia para determinar la unión entre dichos polipéptidos utilizando ensayo de transferencia de energía de fluorescencia (FRET) o BRET (transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia).

En particular, la molécula detectable del donador es una enzima bioluminiscente que puede transferir energía de resonancia (BRET). Por ejemplo, una enzima luciferasa generalmente genera luz tras la oxidación de su sustrato, pero también puede transferir la energía a un fluoróforo cercano. En particular, la enzima bioluminiscente se expresa como una proteína de fusión con un primer polipéptido de la presente descripción. En particular, la proteína bioluminiscente es luciferasa de luciérnaga, renilla o *gaussia*. En particular, el fluoróforo aceptor es una proteína fluorescente que se fusiona con un segundo polipéptido de la presente descripción. En particular, el fluoróforo aceptor es orgánico o inorgánico.

En particular, un primer polipéptido de la presente descripción está marcado con una primera sustancia fluoróforo y un segundo polipéptido de la presente descripción está marcado con una segunda sustancia fluoróforo. La primera sustancia fluoróforo puede tener un valor de longitud de onda que sea sustancialmente igual al valor de longitud de onda de excitación del segundo fluoróforo, por lo que se detecta la unión de dichos primer y segundo polipéptidos midiendo la intensidad de la señal de fluorescencia emitida en la longitud de onda de emisión de la segunda sustancia fluoróforo. Alternativamente, la segunda sustancia fluoróforo también puede tener un valor de longitud de onda de emisión del primer fluoróforo, por lo que la unión de dichos primer y segundo polipéptidos se detecta midiendo la intensidad de la señal de fluorescencia emitida a la longitud de onda de la primera sustancia fluoróforo. Los fluoróforos utilizados pueden ser de varios tipos adecuados, tales como los quelatos de lantánidos conocidos. Se ha descrito que estos quelatos tienen estabilidad química, fluorescencia de larga duración (más de 0,1 ms de

vida útil) después de la bioconjugación y transferencia de energía significativa en el ensayo de bioafinidad de especificidad. El documento US 5.162.508 describe criptatos de biperidina. Se conocen quelantes de policarboxilato con fotosensibilizadores tipo TEKES (documento EP0203047A1) y fotosensibilizadores de tipo terpiridina (documento EP0649020A1). El documento WO96/00901 describe quelatos de ácido dietilentriaminopentaacético (DPTA) que utilizan carboestirilo como sensibilizador. Los quelatos DPT adicionales con otros sensibilizadores y otros metales trazadores son conocidos para usos de diagnóstico o de diagnóstico mediante imágenes (p. ej., documento EP0450742A1).

En particular, el ensayo de fluorescencia realizado en la etapa a) del método de escrutinio consiste en un ensayo homogéneo de fluorescencia resuelta en el tiempo (HTRF), como se describe en el documento WO 00/01663 o el documento US 6.740.756. HTRF es una tecnología basada en TR-FRET que utiliza los principios de TRF (fluorescencia de resolución en el tiempo) y FRET. Más específicamente, el experto en la técnica puede utilizar un ensayo de HTRF basado en la tecnología de emisión de criptato amplificada resuelta en el tiempo (TRACE) como describen Leblanc et al. (2002). El fluoróforo donador de HTRF es el Criptato de Europio, que tiene las emisiones de larga duración de los lantánidos junto con la estabilidad de la encapsulación del criptato. XL665, una alofocianina modificada purificada de algas rojas, es el fluoróforo aceptor primario de HTRF. Cuando estos dos fluoróforos se unen mediante una interacción biomolecular, una parte de la energía capturada por el Criptato durante la excitación se libera a través de la emisión de fluorescencia a 620 nm, mientras que la energía restante se transfiere a XL665. Esta energía es liberada a continuación por XL665 como fluorescencia específica a 665 nm. La luz a 665 nm se emite solo a través de FRET con Europio. Debido a que el Criptato de Europio siempre está presente en el ensayo, se detecta luz a 620 nm incluso cuando la interacción biomolecular no lleva a XL665 a las proximidades.

Por lo tanto, en particular, la etapa a) del método de escrutinio puede comprender por consiguiente las etapas que consisten en:

(1) poner en contacto una muestra previa al ensayo que comprende:

- un primer polipéptido de la presente descripción fusionado a un primer antígeno,
- un segundo polipéptido de la presente descripción fusionado a un segundo antígeno
- un compuesto candidato que se va a someter a prueba

(2) añadir a dicha muestra previa al ensayo de la etapa (2):

- al menos un anticuerpo marcado con un Criptato de Europio que se dirige específicamente contra el primer antígeno mencionado
- al menos un anticuerpo marcado con XL665 dirigido contra el segundo antígeno mencionado

(3) iluminar la muestra de ensayo de la etapa (2) a la longitud de onda de excitación de dicho Criptato de Europio

(4) detectar y/o cuantificar la señal de fluorescencia emitida a la longitud de onda de emisión de XL665

(5) comparar la señal de fluorescencia obtenida en la etapa (4) con la fluorescencia obtenida, en donde la muestra previa al ensayo de la etapa (1) se prepara en ausencia del compuesto candidato que se va a someter a prueba.

Si en la etapa (5) como se describió anteriormente, el valor de intensidad de la señal de fluorescencia es diferente (menor o mayor) que el valor de intensidad de la señal de fluorescencia que se encuentra cuando se prepara la muestra previa al ensayo de la etapa (1) en ausencia del compuesto candidato que se va a someter a prueba, el compuesto candidato se puede seleccionar positivamente en la etapa b) del método de escrutinio. Los anticuerpos marcados con Criptato de Europio o marcados con XL665 se pueden dirigir contra diferentes antígenos de interés, incluidos GST, cola de polihistidina, DNP, c-myx, antígeno HA y FLAG. Tales anticuerpos abarcan los que están disponibles comercialmente en CisBio (Bedfors, MA, EE.UU.), y en particular los denominados 61GSTKLA o 61HISKLB respectivamente.

Los compuestos candidatos que se han seleccionado positivamente al final de cualquiera de los escrutinios in vitro que se han descrito previamente en la presente memoria descriptiva se pueden someter a etapas de selección adicionales con el fin de analizar sus propiedades en la motilidad celular mediada por CD95 (p. ej., respuesta de Ca²⁺ mediada por CD95 o migración celular). Para este propósito, los compuestos candidatos que se han seleccionado positivamente con el método general de detección in vitro como se describió anteriormente se pueden seleccionar adicionalmente para reducir o inhibir la respuesta de Ca²⁺ mediada por CD95 y/o la migración celular inducida por CD95L soluble. Por lo tanto, en particular, el método de escrutinio de la presente descripción comprende las etapas de: i) escrutar los compuestos candidatos que inhiben la interacción entre CD95 y el polipéptido o la proteína de fusión de la presente descripción, realizando el método de escrutinio in vitro como se describió anteriormente y ii) escrutar los compuestos candidatos seleccionados positivamente al final de la etapa i)

para determinar su capacidad para reducir la respuesta de Ca²⁺ mediada por CD95 y/o la motilidad celular mediada por CD95 (p. ej., migración celular mediada por CD95L soluble). En particular, la etapa ii) de dicho método de escrutinio comprende las siguientes etapas: (1) poner en contacto una célula con un compuesto candidato que se ha seleccionado positivamente al final de la etapa i), (2) determinar la capacidad del compuesto para inhibir o reducir la respuesta de Ca²⁺ mediada por CD95 y/o la migración celular inducida por CD95L soluble y (3) comparar la respuesta de Ca²⁺ mediada por CD95 y/o la migración celular determinada en la etapa (2) con la respuesta de Ca²⁺ mediada por CD95 y/o la migración celular determinada cuando la etapa (1) se realiza en ausencia de dicho compuesto candidato seleccionado positivamente, y (4) selección positiva del compuesto candidato cuando la respuesta de Ca²⁺ mediada por CD95 y/o la migración celular determinada en la etapa (2) es inferior a la respuesta de Ca²⁺ mediada por CD95 y/o la migración celular determinada cuando la etapa (1) se realiza en ausencia de dicho compuesto candidato. En particular, la célula se selecciona del grupo que consiste en células T y células cancerosas (p. ej., células de cáncer de mama tales como células TNBC (MDA-MB-231)). Típicamente, se puede utilizar un ensayo de migración o un ensayo de respuesta de Ca²⁺ mediado por CD95 como se describe en el EJEMPLO. La etapa (1) como se describió anteriormente se puede realizar añadiendo una cantidad del compuesto candidato que se va a someter a prueba al medio de cultivo. Usualmente, se prepara una pluralidad de muestras de cultivo, para añadir cantidades crecientes del compuesto candidato que se va a someter a prueba a distintas muestras de cultivo. Generalmente, también se prepara al menos una muestra de cultivo sin compuesto candidato como control negativo para una comparación adicional. Opcionalmente, también se prepara al menos una muestra de cultivo con un agente ya conocido que reduce la respuesta de Ca²⁺ mediada por CD95 y/o la migración celular como control positivo para la normalización del método. Por lo tanto, la etapa (3) se puede realizar comparando el porcentaje de células en donde se modulan la respuesta de Ca²⁺ mediada por CD95 y/o la migración celular obtenido para los cultivos celulares incubados con el compuesto candidato que se va a someter a prueba con el porcentaje de células en donde se modulan la respuesta de Ca²⁺ mediada por CD95 y/o la migración celular obtenido para los cultivos celulares de control negativo sin el compuesto candidato. Ilustrativamente, la eficiencia del compuesto candidato puede evaluarse comparando (i) el porcentaje de células en donde se reducen la respuesta de Ca²⁺ mediada por CD95 y/o la migración celular con (ii) el porcentaje de células en donde se reducen la respuesta de Ca²⁺ mediada por CD95 y/o la migración celular medido en el sobrenadante de los cultivos celulares que se incubaron con el agente conocido que modula la respuesta de Ca²⁺ mediada por CD95 y/o la migración celular. Más ilustrativamente, la eficiencia del compuesto candidato se puede evaluar determinando para qué cantidad del compuesto candidato añadido a los cultivos celulares se reduce el porcentaje de células en donde la respuesta de Ca²⁺ mediada por CD95 y/o la migración celular es cercano o superior al porcentaje de células en donde se reducen la respuesta de Ca²⁺ mediada por CD95 y/o la migración celular con el agente conocido que inhibe o reduce la respuesta de Ca²⁺ mediada por CD95 y/o la migración celular.

En particular, el compuesto candidato se puede seleccionar del grupo que consiste en péptidos, peptidomiméticos, moléculas orgánicas pequeñas o ácidos nucleicos. Por ejemplo, el compuesto candidato según la descripción se puede seleccionar de una biblioteca de compuestos previamente sintetizados, o una biblioteca de compuestos para los que la estructura se determina en una base de datos, o de una biblioteca de compuestos que se han sintetizado de novo. En particular, el compuesto candidato se puede seleccionarse entre moléculas orgánicas pequeñas. Como se emplea en la presente memoria, el término "molécula orgánica pequeña" se refiere a una molécula de tamaño comparable a las moléculas orgánicas generalmente demandadas en productos farmacéuticos. El término excluye macromoléculas biológicas (p. ej., proteínas, ácidos nucleicos, etc.); las moléculas orgánicas pequeñas preferidas tienen un tamaño que varía hasta 2000 Da, y lo más preferiblemente hasta aproximadamente 1000 Da.

La descripción se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente descripción.

45 FIGURAS:

Figura 1: CD95L escindido moviliza iones de calcio de los compartimentos extracelular e intracelular por mecanismos que implican canales de Ca²⁺, PLC γ , IP3 y receptores de Rianodina. Se controló [Ca²⁺]_i a través de la razón F340nm/F380nm ([Ca²⁺]_i citosólica relativa) utilizando Fura2 como sonda fluorescente. Los datos representan la media \pm DT de al menos 60 células (3 experimentos independientes). Las células Jurkat se estimularon con 100 ng/ml de cl-CD95L (flecha de color negro). A. Las células se bañaron en un medio que contenía Ca²⁺ 2 mM (cuadrados de color negro) o en un medio libre de Ca²⁺ (círculos vacíos). El aumento transitorio de Ca²⁺ que se produce en el medio libre de Ca²⁺ (círculos vacíos) corresponde a la liberación de iones de calcio almacenados en compartimentos intracelulares. La fase de meseta observada en el medio que contiene Ca²⁺ 2 mM y que desaparece en el medio libre de Ca²⁺ se debe principalmente a la entrada de calcio desde el espacio extracelular. B. En las células Jurkat PLC γ 1^{-/-} (círculos vacíos), cl-CD95L no pudo inducir el aumento transitorio inicial de [Ca²⁺]_i, que se restaura cuando se reintroduce PLC γ 1 en las células PLC γ 1^{-/-} (cuadrados de color negro). C. Las células Jurkat se trataron previamente (2 μ M, 20 minutos) con Xestospongina C (XestoC, círculos vacíos), un potente bloqueador de receptores de IP3 permeable para la membrana. Tal tratamiento nuevamente bloqueó completamente el componente inicial de la respuesta de calcio. D. Las células Jurkat se pretrataron (20 minutos) con altas concentraciones (10 μ M) de Rianodina (Rya, triángulo vacío), para bloquear los receptores de Rianodina, o con Rianodina y Xestospongina C (XestoC, círculo vacío) para bloquear los receptores de rianodina e IP3. Rya no redujo el pico inicial pero bloqueó la fase de meseta. La combinación de Rya y XestoC abolió la respuesta de Ca²⁺ mediada por CD95.

Figura 2: TAT CID 175-210 y TAT CID 175-191 deterioran la respuesta de calcio dependiente de PLC γ /IP3 a cl-CD95L. Se controló [Ca²⁺]_i a través de la razón F340nm/F380nm ([Ca²⁺]_i citosólica relativa) utilizando Fura2 como sonda fluorescente. Los datos representan la media \pm DT de al menos 60 células (3 experimentos independientes). Se estimularon Jurkat (A y B) y PBL activados (C y D) con 100 ng/ml de cl-CD95L (flecha de color negro). A. Se preincubaron Jurkat con un control de péptido TAT (1 hora, 10 μ M, triángulo vacío) o con un péptido TAT correspondiente a los aa 192-210 del receptor de muerte CD95 (1 hora, 10 μ M, círculos vacíos) o no (control, cuadrados de color negro). Los tratamientos no modificaron significativamente la respuesta de calcio a cl-CD95L, particularmente el pico inicial. B. Se preincubaron Jurkat con un péptido TAT correspondiente a los aa 175-210 del receptor de muerte CD95 (1 hora, 10 μ M, círculos vacíos) o con un péptido TAT correspondiente a los aa 175-191 del receptor de muerte CD95 (1 hora, 10 μ M, triángulos vacíos) o no (cuadrados de color negro). Ambos tratamientos redujeron en gran medida la respuesta de calcio a cl-CD95L, particularmente el pico inicial. C. Los PBL activados se incubaron previamente con el control del péptido TAT (1 hora, 10 μ M, triángulos vacíos) o con el péptido TAT correspondiente a los aa 192-210 del receptor de muerte CD95 (1 hora, 10 μ M, círculos vacíos) o no (control, cuadrados de color negro). Los tratamientos no modificaron significativamente la respuesta de calcio a cl-CD95L. D. Los PBL activados se preincubaron con un péptido TAT correspondiente a los aa 175-210 del receptor de muerte CD95 (1 hora, 10 μ M, círculos vacíos) o con un péptido TAT correspondiente a los aa 175-191 del receptor de muerte CD95 (1 hora, 10 μ M, triángulos vacíos) o no (cuadrados de color negro). Ambos tratamientos redujeron en gran medida la respuesta de calcio a cl-CD95L, particularmente el pico inicial.

Figura 3: TAT CID 175-210 es eficaz en varios modelos celulares. Se controló [Ca²⁺]_i a través de la razón F340nm/F380nm ([Ca²⁺]_i citosólica relativa) utilizando Fura2 como sonda fluorescente. Los datos representan la media \pm DT de al menos 60 células (3 experimentos independientes). CEM (A), MDA MB 231 (B) y MEF (C) se estimularon con 100 ng/ml de cl-CD95L (flecha de color negro). A y B. Las células CEM y MDA MB 231 se incubaron previamente con un péptido TAT correspondiente a los aa 175-210 del receptor de muerte CD95 (1 hora, 10 μ M, círculo vacío). El tratamiento (círculos vacíos) abolió por completo la respuesta de calcio en ambos tipos de células. C. Los MEF se incubaron previamente con el péptido TAT correspondiente a los aa 175-210 del receptor de muerte CD95 (1 hora, 10 μ M, círculo vacío) o con el control del péptido TAT (1 hora, 10 μ M, triángulos vacíos). Si este último no modificó la fase inicial, el primero la bloqueó.

Figura 4: TAT CID 175-219 inhibe la migración de células de cáncer triple negativo. La línea celular de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231 se preincubó durante 1 hora con 10 μ M de DID 175-220 y se evaluó la migración celular utilizando el ensayo de cámara Boyden en presencia o ausencia de cl-CD95L (100 ng/mL) durante 24 h. Las células migratorias se tiñeron con Giemsa. Para cada experimento, se adquirieron cinco imágenes de campos aleatorios.

Figura 5. Las altas cantidades de CD95L en suero en pacientes con LES corresponden a un ligando homotrimérico que induce la transmigración endotelial de linfocitos T activados. A. El CD95L soluble se dosificó mediante ELISA en sueros de pacientes con LES recién diagnosticados y donantes sanos. *** indica P \leq 0,0001 utilizando una prueba t de Student de dos colas. B. Los sueros de pacientes con LES se fraccionaron utilizando columnas Sephacryl S-300-HR de exclusión por tamaño y se dosificó CD95L mediante ELISA. *Recuadro:* El CD95L se inmunoprecipitó en las fracciones 40-46 y 76-78 y se cargó en una SDS-PAGE al 12%. Se representa la inmunotransferencia anti-CD95L. C. Los PBL activados de donantes sanos se incubaron en presencia de fracciones de filtración en gel obtenidas en B y se evaluó la transmigración endotelial como se describe en *Materiales y métodos*. Cuando se indicó, las fracciones 76-78 se incubaron previamente 30 minutos con el antagonista anti-CD95L mAb NOK-1 (10 μ g/ml). D. Los niveles de expresión de CD95L, IL17 y CD4 se analizaron mediante inmunohistoquímica en pieles inflamadas de pacientes con lupus o en sujetos sanos (mamectomía). Los números corresponden a diferentes pacientes. E. Los análisis densitométricos de la tinción de CD95L e IL17 representados en D revelaron que los niveles de expresión de estos dos marcadores varían de manera correlacionada. F. Los subconjuntos de células T humanas indicados se sometieron a un ensayo de transmigración en presencia de sueros tomados de pacientes con LES o donantes sanos como controles. Los datos se analizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney. *** P < 0,001 G. Los subconjuntos de células T humanas se sometieron a un ensayo de transmigración como anteriormente excepto que en la cámara inferior se añadió Fas-Fc a concentraciones crecientes en paralelo con cl-CD95L. Los datos representan la media de 4-5 donantes individuales \pm DT y se analizaron utilizando un Anova de 2 vías. H. La transmigración de subconjuntos de células T CD4 se analizó en cámaras Boyden en presencia o ausencia de cl-CD95L (200 ng/ml). I. La transmigración de células T reguladoras humanas y células Th17 se evaluó mediante el ensayo de la Cámara Boyden en presencia o ausencia de cl-CD95L. Los datos se analizaron utilizando un Anova de 2 vías. Los valores de P < 0,05 se consideraron significativos; * P < 0,05, *** P < 0,001

Figura 6. La administración in vivo de cl-CD95L atrae preferentemente células Th17. A los ratones se les inyectaron una vez cl-CD95L (200 ng) o vehículo, y 24 horas más tarde se sometieron a examen. (A-B) Se realizaron recuentos celulares totales para la cavidad peritoneal (A) y el bazo (B). (C-D). El recuento diferencial de glóbulos blancos se realizó 24 horas después de la inyección. Las células del exudado peritoneal (PEC) (C) y las células del bazo (D) fueron sometidas a análisis de citometría de flujo para identificar el porcentaje de células CD4⁺ infiltradas. (E-I) Las células PEC CD4⁺ se purificaron mediante separación AutoMACS y se preparó ARN. Las células se sometieron a PCR en tiempo real para (E) IL-17A, (F) IL-23R, (G) CCR6, (H) IFN- γ y (I) FoxP3. Los datos presentados son promedios de grupos de 6 ratones \pm DT, con experimentos repetidos dos veces. Los datos se

analizaron utilizando la prueba t de Student, los valores de $P < 0,05$ se consideraron significativos; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Figura 7. CD95 implementa una respuesta de Ca^{2+} independiente del dominio de muerte A. Las células CEM se estimularon con CD95L (100 ng/ml) y se inmunoprecipitó CD95. El complejo inmunitario se resolvió mediante SDS/PAGE y se realizaron las inmunotransferencias indicadas. Los productos lisados totales se cargaron como control. B. Las células T Jurkat parentales, con deficiencia de PLC- γ 1 y sus contrapartes reconstituidas en PLC- γ 1 se cargaron con la sonda de Ca^{2+} FuraPE3-AM (1 μ M) y a continuación se estimularon con cl-CD95L (100 ng/mL, flecha de color negro). Las imágenes de la razón (F340/F380, R) se tomaron cada 10 s y se normalizaron frente a valores preestimulados (R_0). Los datos representan la media \pm DT de R/R_0 medido en n células. *Recuadro*: Las células Jurkat con deficiencia de PLC γ 1 o su contraparte reconstituida se lisaron y los niveles de expresión de PLC γ 1 y CD95 se evaluaron mediante inmunotransferencia. Se utilizó tubulina como control de carga. C. Las células se cargaron con la sonda de Ca^{2+} FuraPE3-AM (1 μ M) y a continuación se estimularon con cl-CD95L (100 ng/ml). Los datos se analizaron como se describe en B. *Recuadro*: Las células Jurkat parentales (A3) o sus contrapartes que carecían de FADD o caspasa-8 se lisaron y los niveles de expresión de CD95, FADD y Caspasa-8 se evaluaron mediante inmunotransferencia. D. Representación de las diferentes construcciones de CD95. E. Las células CEM-IRC que expresaban GFP sola o las construcciones de CD95 fusionadas con GFP mostradas en D, se cargaron con la sonda de Ca^{2+} fluo2-AM (1 μ M). Las células fueron estimuladas a continuación con cl-CD95L (100 ng/mL; flecha de color negro) y se controló $[Ca^{2+}]_i$ a través de la razón F/F_0 ($Ca^{2+}_{[CYT]}$ relativo). Los datos representan la media \pm DT de F/F_0 medido en n células.

Figura 8. La señal de Ca^{2+} mediada por CD95 proviene de los residuos de aminoácidos 175 a 210 en CD95. A. Las células HEK se co-transfectaron con las construcciones CD95 fusionadas con GFP y PLC γ 1 de tipo salvaje. Veinticuatro horas después de la transfección, se evaluó el nivel de expresión de CD95 en estas células mediante citometría de flujo. B. Las células en A se estimularon con CD95L (100 ng/ml) y se inmunoprecipitó CD95. El complejo inmunitario se resolvió mediante SDS-PAGE y se realizó la inmunotransferencia indicada. Los productos lisados totales se cargaron como control. C. *Panel izquierdo*: Las células HEK se co-transfectaron con PLC γ 1 y CID-mCherry o mCherry solo. Después de 24 h, las células se lisaron y PLC γ 1 se inmunoprecipitó. El complejo inmunitario se resolvió mediante SDS/PAGE y se realizaron las inmunotransferencias indicadas. Los productos lisados totales se cargaron como control. *Panel derecho*: Las células HEK se co-transfectaron con PLC γ 1 y CID-mCherry o mCherry solo. Después de 24 h, las células se estimularon en presencia o ausencia de CD95L (100 ng/ml) y se inmunoprecipitó CD95. El complejo inmunitario se resolvió mediante SDS-PAGE y se realizó la inmunotransferencia indicada. Los productos lisados totales se cargaron como control. D. *Panel superior*; secuencias de proteínas de TAT-CID y control TAT. *Panel inferior*; La línea de células T leucémicas CEM se preincubó durante 1 h con 10 μ M de control TAT o TAT-CID y a continuación se estimuló en presencia o ausencia de cl-CD95L (100 ng/ml) durante los tiempos indicados. Se lisaron las células y se inmunoprecipitó CD95. El complejo inmunitario se resolvió mediante SDS-PAGE y se realizó la inmunotransferencia indicada. Los productos lisados totales se cargaron como control. E. Jurkat y CEM se cargaron con FuraPE3-AM (1 μ M), se pretrataron durante 1 hora con 10 μ M de control TAT o TAT-CID y a continuación se estimularon con 100 ng/ml de cl-CD95L (flecha de color negro). Las imágenes de la razón se tomaron cada 10 s y se normalizaron frente a valores preestimulados. F. Los PBL humanos de donantes sanos se cargaron con furaPE3-AM (1 μ M) pretratada durante 1 h con 10 μ M de control TAT o TAT-CID o con el inhibidor de IP3R Xestospongina C (control positivo, 1 μ M, 1 h) y a continuación se estimularon con 100 ng/ml de cl-CD95L (flecha de color negro). Los valores de la razón (R) se normalizaron frente a los valores preestimulados (R_0). Los datos representan la media \pm DT de R/R_0 medida en n células.

Figura 9. TAT-CID es un inhibidor de la acumulación de células Th17 inducida por cl-CD95L en los órganos. A. La trans migración de células Th17 de ratón se controló mediante el ensayo de la Cámara Boyden en presencia o ausencia de las concentraciones indicadas del péptido TAT-CID. B-D. A los ratones C57BL/6 se les inyectaron 40 mg/kg de control TAT o TAT-CID dos horas antes de la inyección IP de cl-CD95L (200 ng) o vehículo, y 24 horas más tarde se sometieron a examen. B. Se realizaron recuentos celulares totales para la cavidad peritoneal. C. Las células de exudado peritoneal (PEC) se sometieron a análisis de citometría de flujo para identificar el porcentaje de Células T CD4⁺ CD62L⁻ infiltradas D. Los niveles de IL-17A en la cavidad peritoneal se cuantificaron mediante ELISA. El análisis estadístico se realizó utilizando un Anova de 2 vías. Los valores p indicados son ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

EJEMPLO 1:

Las células se cargaron con Fura2-AM (1 μ M) a temperatura de reposo durante 30 minutos en Solución Salina equilibrada de Hank (HBSS). Después de lavar con HBSS, las células se incubaron durante 15 minutos en ausencia de Fura2-AM para completar la desesterificación del colorante. Las células se colocaron en una cámara termostaticada (37°C) de un microscopio de epifluorescencia invertido (Olympus IX70) equipado con un objetivo de inmersión en agua $\times 40$, UApo/340-1.15 W (Olympus), y se capturaron imágenes de micrografía de fluorescencia a 510 nm y con una resolución de 12 bits mediante una cámara de escaneo rápido (CoolSNAP fx Monochrome, Photometrix). Para minimizar la exposición a la luz UV, se utilizó la función de agrupación 4×4 . Fura2-AM se excitó alternativamente a 340 y 380 nm, y las razones de las imágenes resultantes (excitaciones a 340 y 380 nm y filtro de emisión a 520 nm) se produjeron a intervalos constantes (5 s o 10 s según el estímulo). Se mostraron las imágenes de la razón Fura-2 ($F_{razón}$ 340/380) y se realizó un seguimiento de los valores de $F_{razón}$ de las regiones de interés

(ROI) trazados sobre células individuales durante los experimentos y se analizaron posteriormente sin conexión con el soporte lógico Universal Imaging, que incluía MetaFluor y Metamorph. Cada experimento se repitió de forma independiente 3 veces, y para cada condición experimental, los autores de la presente invención presentaron un promedio de más de 20 trazados de células individuales. Las imágenes fluorescentes se pseudocolorearon utilizando el modo de visualización IMD en MetaFluor y se ensamblaron sin más manipulación en Photoshop (Adobe). Los datos sin procesar fueron adquiridos con MetaFluor y se realizó un gráfico en Origin (OriginLab). $[Ca^{2+}]_i$ se calculó utilizando la siguiente ecuación: $[Ca^{2+}]_i = K_d(R-R_{min})/(R-R_{max}) \times Sf2/Sf1$, donde K_d es la constante de disociación de Fura2-AM en las dos longitudes de onda de excitación (F_{340}/F_{380}); R_{min} es la razón de fluorescencia en presencia de calcio mínimo, obtenida mediante quelación de Ca^{2+} con EGTA 10 mM; R_{max} es la razón de fluorescencia en presencia de exceso de calcio, obtenida tratando células con ionomicina 1 μ M; Sf2 es la fluorescencia de la forma libre de Ca^{2+} ; y Sf1 es la fluorescencia de la forma unida a Ca^{2+} de Fura2-AM a longitudes de onda de excitación de 380 y 340 nm, respectivamente. En algunos experimentos, las células se colocaron en un medio libre Ca^{2+} que consistía en la HBSS descrita anteriormente en la que $CaCl_2$ se omitió y se añadió EGTA 100 μ M para quelar los iones Ca^{2+} residuales. Este medio se añadió a las células inmediatamente antes del registro para evitar fugas de los depósitos de calcio intracelular. Los resultados se muestran en las figuras 1-3.

EJEMPLO 2:

Las cámaras Boyden contenían membranas con un tamaño de poro de 8 μ m (Millipore, Molsheim, Francia). Después de la hidratación de las membranas, las células de cáncer de mama (10^5 células por cámara) se añadieron a la cámara superior en medio con bajo contenido de suero (1%). La cámara del fondo se llenó con medio con bajo contenido de suero (1%) en presencia o ausencia de cl-CD95L (100 ng/ml). Las células se cultivaron durante 24 h a 37°C. Para cuantificar la migración, las células se eliminaron mecánicamente del lado superior de la membrana utilizando un hisopo con punta de algodón, y las células migratorias del lado inverso se fijaron con metanol y se tiñeron con Giemsa. Para cada experimento, se tomaron cinco imágenes representativas para cada inserto, a continuación, las células se lisaron y se midió la absorbancia a 560 nm correlacionada con la cantidad de tinción de Giemsa. Los resultados se muestran en la Figura 4.

EJEMPLO 3:

Métodos:

Declaración de pacientes y ética

Los pacientes con LES cumplieron cuatro o más de los criterios revisados de ACR de 1982 para la enfermedad. Todas las investigaciones clínicas se realizaron de acuerdo con los principios expresados en la Declaración de Helsinki. Se tomaron muestras de sangre de pacientes diagnosticados de LES después de obtener el consentimiento por escrito de cada individuo. Este estudio fue aprobado por la junta de revisión institucional del Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux.

Anticuerpos y otros reactivos

Se adquirieron PHA, bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT), inhibidores de proteasa y fosfatasa de Sigma-Aldrich (L'Isle-d'Abeau-Chesnes, Francia). El mAb anti-CD95L era de Cell Signaling Technology (Boston, MA, EE.UU.). La IL-2 recombinante se obtuvo de PeproTech Inc. (Rocky Hill, NJ, EE.UU.). Se adquirió anti-PLC γ 1 de Millipore (St Quentin en Yvelines, Francia). Los mAb anti-CD95 (APO1-3) provienen de Enzo Life Sciences (Villeurbanne). BD Biosciences (Le Pont de Claix, Francia) proporcionó mAb anti-CD95 (DX2) humano conjugado con PE, mAb anti-FADD humano (clon 1), mAb anti-CD95L neutralizante (Nok1). Los mAb anti-caspasa-8 (C15) y anti-Fas (C-20) fueron de Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Alemania). CD95-Fc, mAb neutralizadores anti-ICAM-1 y anti-E-selectina.

Plásmidos y Construcciones

Las construcciones de CD95 humanas etiquetadas con GFP (hCD95) se obtuvieron mediante PCR y se insertaron en marco entre los sitios Nhe1 y EcoR1 de pEGFP-N1 (Clontech). Obsérvese que para todas las construcciones de CD95, la numeración tiene en cuenta la sustracción de 16 aminoácidos del péptido señal. La sustitución de la cisteína en la posición 183 por una valina en hCD95⁽¹⁻²¹⁰⁾ se realizó utilizando el kit Quickchange Lightning Site directed Mutagenesis (Agilent Technologies, Les Ulis, Francia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La construcción CID-mCHERRY se obtuvo mediante PCR amplificando la secuencia hCD95 que codificaba los residuos 175 a 210. El fragmento resultante se insertó entre el sitio EcoR1 y BamH1 de un vector pmCHERRY-N1. El CD95 completo de ratón (mCD95) fue proporcionado amablemente por el Dr. Pascal Schneider (Universite de Lausanne, Lausanne, Suiza). La secuencia de mCD95 que carecía del péptido señal (SP - residuos 1-21) se amplificó mediante PCR. Después de la digestión por BamHI/EcoRI, el amplicón se insertó en el vector pcDNA3.1(+) en marco con la secuencia SP de la proteína hemaglutinina del virus de la influenza seguido de una secuencia de etiqueta flag y un conector de 6 aminoácidos. El vector pTriEx-4 que codificaba PLC γ 1 humano de completo etiquetado con Myc fue un regalo de la Dra. Matilda Katan (Chester Beatty Laboratories, The Institute of Cancer Research, Londres, Reino Unido). Los plásmidos que codifican CD95L completo e IgCD95L secretado se han descrito en otra parte (Tauzin et

al., 2011). Todas las construcciones fueron validadas mediante secuenciación sobre ambas hebras (GATC Biotech, Constance, Alemania).

Líneas celulares y linfocitos de sangre periférica.

Todas las células se adquirieron de ATCC (Molsheim Cedex, Francia). Las líneas de células T leucémicas CEM, H9 y Jurkat se cultivaron en RPMI con un suplemento de FCS inactivado por calor al 8% (v/v) y L-glutamina 2 mM a 37°C en una incubadora con CO₂ al 5%. La célula CEM-IRC que expresaba una baja cantidad de CD95 de membrana plasmática se describió en (Beneteau et al., 2007; Beneteau et al., 2008). Las células HEK293 se cultivaron en DMEM con un suplemento de FCS inactivado por calor al 8% y L-glutamina 2 mM a 37°C en una incubadora con CO₂ al 5%. Las PBMC (células mononucleares de sangre periférica) de donantes sanos se aislaron por centrifugación con Ficoll, se lavaron dos veces en PBS. Los monocitos se eliminaron mediante una etapa de adherencia de 2 horas y los PBL (linfocitos de sangre periférica) no sometidos a tratamiento previo se incubaron durante la noche en RPMI con un suplemento de 1 µg/ml de PHA. Las células se lavaron ampliamente y se incubaron en el medio de cultivo con un suplemento de 100 unidades/ml de IL-2 recombinante durante 5 días. Las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) (Jaffe et al., 1973) se cultivaron en medio 200 libre de suero endotelial humano con un suplemento de LSGS (suplemento de crecimiento con bajo contenido de suero) (Invitrogen, Cergy Pontoise, Francia). Las células CEM-IRC se sometieron a electroporación utilizando un generador de electroporación BTM-830 (BTX Instrument Division, Harvard Apparatus) con 10 µg de ADN. Veinticuatro horas después de la electroporación, las células se trataron durante una semana con 1 mg/ml de neomicina y a continuación se aislaron los clones con dilución limitante.

Inmunohistología

Las pieles de pacientes con lupus se incluyeron en parafina y se cortaron en secciones de 4 µm. Para la detección de CD4, CD8 e IL17, la tinción inmunohistoquímica se realizó en el aparato de tinción Discovery Automated IHC utilizando el kit de detección Ventana OmniMap (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, EE.UU.). Los portaobjetos se enjuagaron con tampón de reacción basado en Tris de Ventana (Roche). Después de la desparafinación con la solución Ventana EZ Prep (Roche) a 75°C durante 8 minutos, se realizó la recuperación de antígeno utilizando el anticuerpo CC1 (pH 8) de la solución tampón basada en Tris, propiedad de Ventana, de 95°C a 100°C durante 48 minutos. La peroxidasa endógena se bloqueó con Inhibidor-D H₂O₂ al 3% (Ventana) durante 10 minutos a 37°C. Después de enjuagar, los portaobjetos se incubaron a 37°C durante 60 minutos con IL17 (Bioss), CD4 y CD8 (Dako), y anticuerpo secundario: OmniMap HRP durante 32 minutos (Roche). La mejora de la señal se realizó utilizando los portaobjetos del kit Ventana ChromoMap (sistema de detección sin biotina). Para la detección de CD95L (BD Pharmingen), la recuperación de antígeno se realizó utilizando una solución de desmascaramiento de antígeno de pH 9 (Vector) a 95°C durante 40 min y la peroxidasa endógena se bloqueó utilizando peróxido de hidrógeno al 3% p/v en metanol durante 15 min. Los portaobjetos se incubaron en BSA al 5% durante 30 minutos a temperatura ambiente y a continuación se tiñeron durante la noche a 4°C. Las secciones de tejido se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con HRP del sistema Envision+ durante 30 minutos a temperatura ambiente y el marcaje se visualizó añadiendo DAB+ líquido. Las secciones se contratñeron (hematoxilina) y se montaron con medio de montaje DPX. Utilizando el soporte lógico ImageJ (IHC Toolbox), se realizó un análisis de densitometría en los portaobjetos escaneados para evaluar la cantidad de los diferentes marcadores. Se evaluó el área media para cada marcador y se determinó si existía una correlación entre las cantidades de células que expresaban IL17 y Células T CD8⁺ y el nivel de expresión de CD95L.

Generación de subconjuntos de células T CD4⁺ de Ratón y Humanas

Los experimentos con animales sometidos a una revisión ética por parte de la Universidad de Nottingham fueron apropiados y se llevaron a cabo utilizando PPL 40/3412 de acuerdo con la guía del Ministerio del Interior del Reino Unido y según ASPA (1986). Para la generación de subconjuntos de células T murinas, se extrajeron bazos de ratones C57B1/6 y se prepararon suspensiones de células individuales. Las células no sometidas a tratamiento previo CD4⁺CD62L⁺ se aislaron utilizando microesferas de Miltenyi Biotec. Las células T CD4⁺ humanas no sometidas a tratamiento previo se prepararon utilizando el kit II de aislamiento de células T CD4⁺ no sometidas a tratamiento previo de Miltenyi Biotec, que se clasificaron, produciendo una población 99% pura de células CD4⁺CD45RA⁺. Las células purificadas se cultivaron en medios IMDM completos, todos con α-CD3 (1 µg/ml), α-CD28 (2 µg/ml), y como sigue; Células Th1 IL-12 (10 ng/ml) con α-IL-4 (10 µg/ml), células Th2 IL-4 (10 ng/ml) y α-IFN-γ (10 µg/ml), células Th17 IL-6 (10 ng/ml), TGF-β1 (2 ng/ml), α-IFN-γ (10 µg/ml) con α-IL-4 (10 µg/ml) y Tregs IL-2 (10 ng/ml), TGF-β1 (5 ng/ml), α-IFN-γ (10 µg/ml) y α-IL-4 (10 µg/ml). Las células se convirtieron en subconjuntos de células T durante cinco días como se esbozó anteriormente. Todas las citocinas fueron suministradas por PeproTech (Londres, Reino Unido). CD3 de ratón (clon 2C11); CD3 humano (UCHT1); CD28 de ratón (37,51); CD28 humano (CD28.2); IL-4 de ratón (11B11); IL-4 humana (MP4-25D2); ratón IFN-γ (XMG1.2); El IFN-γ B27 humano procedían de BD Pharmingen.

Administración in vivo de cl-CD95L

Se colocaron ratones C57BL/6 hembra (Harlan, Reino Unido) de edades comprendidas entre 8-10 semanas en grupos de 6 y se les administró IP. Veinticuatro horas después de la inyección, se sacrificaron los ratones y se

lavar las cavidades peritoneales con 5 ml de PBS/FCS al 2%, se prepararon frotis de sangre y se recogieron los bazos. Los frotis de sangre y los citoespinos de células peritoneales (PEC) se tiñeron con Giemsa y se realizaron recuentos diferenciales. Se prepararon suspensiones de bazo y PEC de células individuales, se realizaron recuentos de células, se aislaron células T CD4⁺CD62⁻ con microesferas Miltenyi y se determinó el número de células mediante exclusión con azul de tripán. Para los experimentos en los que los animales recibieron TAT-mCID o péptidos de control, se inyectaron 800 µg (40 mg/kg) IP 2 horas antes de la administración de cl-CD95L. Todos los experimentos con ratones se realizaron bajo aprobación ética del comité de ética animal local de la Universidad de Nottingham y cumpliendo con las directrices del Ministerio del Interior del Reino Unido bajo la Licencia de Proyecto 40/3412.

10 ***Producción de CD95L escindido con metaloproteasa y fusionado con Ig***

Se generó Ig-CD95L en el laboratorio como se describe en (Tauzin et al., 2011). Las células HEK 293 mantenidas en un medio que contenía FCS al 8% se transfectaron utilizando el método de precipitación con Calcio/Fosfato con 3 µg de plásmido vacío o vector que contenía CD95L de tipo salvaje. Dieciséis horas después de la transfección, el medio se reemplazó por OPTI-MEM (Invitrogen) con un suplemento de L-glutamina 2 mM y 5 días después, se recogieron medios que contenían CD95L escindido y CD95L completa unido al exosoma. Las células muertas y los desechos se eliminaron mediante dos etapas de centrifugación (4500 rpm/15 minutos) y a continuación se eliminaron los exosomas mediante una etapa de ultracentrifugación (100000 g/2 horas).

15 ***Cromatografía de exclusión por tamaño***

Los sueros de 4 pacientes con LES diferentes (5.10⁷ células) se filtraron utilizando un filtro de 0,2 µm y a continuación se resolvieron 5 ml utilizando una columna Sephacryl S300-HR de fraccionamiento de rango medio (GE Healthcare) equilibrada con PBS (pH 7,4). Utilizando un aparato purificador AKTAprime (GE Healthcare), las fracciones se cosecharon con un caudal de 0,5 mL/min. Se cosecharon 50 fracciones y se analizaron mediante ELISA para cuantificar CD95L.

20 ***ELISA para CD95L***

25 El ELISA anti-CD95L (Diacclone, Besançon, Francia) se realizó para cuantificar con precisión el CD95L escindido presente en el suero siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Inmunoprecipitación

30 Las células T (5 × 10⁷ células por condición) se estimularon con Ig-CD95L o cl-CD95L (100 ng/ml) durante los tiempos indicados a 37°C. Las células se lisaron, se incubaron con APO1.3 (1 µg/ml) durante 15 minutos a 4°C y se inmunoprecipitó CD95 utilizando esferas magnéticas acopladas a proteína A/G (Ademtech, Pessac, Francia) durante 1 hora. Después de un lavado exhaustivo, el complejo inmunitario se resolvió mediante SDS-PAGE y la inmunotransferencia se realizó con los anticuerpos indicados.

Análisis de inmunotransferencia

35 Las células se lisaron durante 30 minutos a 4°C en tampón de lisis (HEPES 25 mM, pH 7,4, Triton X-100 al 1% v/v, NaCl 150 mM, EGTA 2 mM con un suplemento de una mezcla de inhibidores de la proteasa (Sigma-Aldrich)). La concentración de proteínas se determinó por el método del ácido bicinónico (PIERCE, Rockford, IL, EE.UU.) De acuerdo con el protocolo del fabricante. Las proteínas se separaron en una SDS-PAGE al 12% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra). La membrana se bloqueó 15 minutos con TBST (Tris 50 mM, NaCl 160 mM, Tween 20 al 0,05% v/v, pH 7,8) que contenía leche desnatada en polvo al 5% p/v (TBSTM). El anticuerpo primario se incubó durante la noche a 4°C en TBSTM. La membrana se lavó intensamente (TBST) y a continuación se añadió el anti-conejo o anti-ratón marcado con peroxidasa (SouthernBiotech, Birmingham, Alabama, EE. UU.) Durante 45 minutos. Las proteínas se visualizaron con el kit de sustrato de quimioluminiscencia mejorado (ECL, GE Healthcare).

Migración transendotelial de linfocitos T activados

45 Después de la hidratación de las membranas de la cámara Boyden que contenía membranas de tamaño de poro de 3 µm (Millipore, Molsheim, Francia), los linfocitos T activados (10⁶) se añadieron a la cámara superior en una monocapa confluyente de HUVEC en un medio con bajo contenido de suero (1%). La cámara inferior se cargó con medio con bajo contenido en suero (1%) en presencia o ausencia de 100 ng/ml de cl-CD95L. En experimentos con sueros humanos, se añadieron 500 µl de suero de donantes sanos o pacientes con LES en el depósito inferior. Las células se cultivaron durante 24 h a 37°C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5%. Las células transmigradas se contaron en el depósito inferior por citometría de flujo utilizando un patrón de 2,5x10⁴ esferas fluorescentes (Recuento de flujo, Beckman Coulter).

Ensayo de adhesión de células endoteliales

Los anticuerpos de bloqueo se utilizaron contra E-selectina e ICAM-1 en el ensayo de adhesión de células endoteliales CHEMICON® (Millipore). Brevemente, después de la activación de la capa de células endoteliales con TNF- α , se añadieron controles anti-Ig de ratón, anti-E-selectina o anti-ICAM-1 a concentraciones finales de 10 $\mu\text{g/ml}$. Posteriormente, se incubaron subconjuntos de células T teñidas con calceína-AM durante 24 horas y se lavaron las células no unidas. Las células fijadas al endotelio se evaluaron utilizando un lector de placa de fluorescencia.

QPCR en tiempo real

Se prepararon suspensiones de células individuales de bazos y PEC como se describió anteriormente. El ARN se extrajo de las células T CD4 utilizando fenol/cloroformo. El ADNc se preparó utilizando el kit de transcripción inversa Promega GO-Script y se utilizó en una PCR en tiempo real. Brevemente, las muestras de ADNc se sometieron al ensayo Taqman realizado en un Roche Lightcycler. Los resultados, referidos como niveles de expresión, se calcularon utilizando el método Δct relativo a HPRT.

Generación de imágenes de video de la respuesta de calcio en células vivas**Experimentos sobre líneas celulares parentales**

Las células T se cargaron con Fura-PE3-AM (1 μM) a temperatura ambiente durante 30 minutos en solución salina equilibrada de Hank (HBSS). Después del lavado, las células se incubaron durante 15 minutos en ausencia de Fura-PE3-AM para completar la desesterificación del colorante. Las células se colocaron a la cámara de temperatura controlada (37°C) de un microscopio de epifluorescencia invertido (Olympus IX70) equipado con un objetivo de inmersión en agua x40 UApo/340-1.15 W (Olympus), y se capturaron imágenes de micrografía de fluorescencia a 510 nm y Resolución de 12 bits mediante una cámara de escaneo rápido (CoolSNAP fx Monochrome, Photometrix). Para minimizar la exposición a la luz ultravioleta, se utilizó una función de agrupamiento 4×4 . Fura-PE3 se excitó alternativamente a 340 y 380 nm, y las razones de las imágenes resultantes (filtro de emisión a 520 nm) se produjeron a intervalos constantes (10 segundos). Las imágenes de la razón de Fura-PE3 ($F_{\text{razón } 340/380}$) se analizaron sin conexión con el soporte lógico Universal Imaging, que incluía Metafluor y Metamorph. $F_{\text{razón}}$ refleja los cambios de concentración de Ca^{2+} intracelular. Cada experimento se repitió 3 veces y se analizó el promedio de más de 20 trazados unicelulares.

Experimentos sobre líneas celulares que expresan GFP

Se utilizó Fluo2-AM, en lugar de Fura-PE3-AM para experimentos con células que expresan GFP, debido a que la fluorescencia de GFP perturba la medición de Ca^{2+} con Fura-PE3. En cuanto a Fura-PE3-AM, las células T se cargaron con Fluo2-AM (1 μM) durante 30 minutos en solución salina equilibrada de Hank (HBSS) y a continuación se incubaron durante 15 minutos en la HBSS libre de Fluo2-AM para completar la desesterificación de el colorante. Los cambios en Ca^{2+} se evaluaron excitando células cargadas con Fluo2-AM a 535 ± 35 nm. Los valores de la fluorescencia emitida (605 ± 50 nm) para cada célula (F) se normalizaron a la fluorescencia inicial (F_0) y fueron referidos como F/F_0 ($\text{Ca}^{2+}_{[\text{CYT}]}$ relativo). Solo se consideraron células positivas para GFP.

Resultados:**CD95L en suero en pacientes con lupus promueve la transmigración endotelial de células Th17 activadas**

Informes recientes sugieren que una forma soluble de CD95L aumenta en el líquido de lavado broncoalveolar de pacientes que padecen síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA). Sorprendentemente, este CD95L soluble conserva su región del tallo extracelular amino terminal (residuos de aminoácidos 103 a 136), una región que normalmente se elimina después del desprendimiento por metaloproteasa del CD95L unido a la membrana (Herrero et al., 2011). Además, en condiciones nativas, este CD95L de SDRA exhibió una estequiometría hexamérica y ejerció una actividad citotóxica hacia las células epiteliales alveolares en los pulmones (Herrero et al., 2011). Estos resultados animaron a los autores de la presente invención a evaluar la estequiometría de CD95L del suero en pacientes con LES. En primer lugar, los autores de la presente invención confirmaron que el CD95L soluble aumentó significativamente en el suero de 34 pacientes con LES en comparación con 8 donantes sanos de la misma edad ($360 \pm 224,8$ pg/ml en pacientes con LES frente a $30,04 \pm 28,52$ pg/ml en sujetos sanos, $P < 0,0001$) (Fig. 5A). En segundo lugar, estos sueros se fraccionaron utilizando cromatografía de exclusión por tamaño y la concentración de CD95L se cuantificó en cada fracción eluida (Fig. 5B). Se detectó CD95L en las fracciones 76 a 78, que contenían proteínas cuya masa molecular nativa oscilaba entre 75 y 80 kDa. Este CD95L se inmunoprecipitó a continuación y se resolvió en condiciones desnaturalizantes/reductoras (SDS-PAGE) a 26 kDa (Fig. 5B), lo que indicaba que el CD95L en suero acumulado en pacientes con lupus correspondía a un ligando homotrimérico. Tras el examen, los autores de la presente invención observaron que funcionalmente este CD95L del suero retuvo la actividad previamente referida de CD95L escindido (cl-CD95L), ya que promovió la transmigración de linfocitos T a través de una monocapa endotelial (Fig. 5C). Específicamente, los linfocitos T significativamente más activados aislados de donantes sanos expuestos a las fracciones 76-78 cruzaron monocapas endoteliales en comparación con los linfocitos expuestos a las fracciones 42-44. Estas últimas fracciones, que contienen CD95L unido a exosoma (datos no mostrados) no lograron ejercer ningún efecto pro-migratorio (Fig. 5C). Además, la transmigración de células T inducida por las fracciones 76-78 se inhibió hasta en 50% utilizando un mAb neutralizante anti-CD95L (Fig. 5C)

confirmando que el CD95L soluble en pacientes con LES juega un papel en la trans migración endotelial de linfocitos T. Si la infiltración de células T está implicada en el daño tisular y las células Th17 contribuyen a este resultado clínico a través de un reclutamiento impulsado por CD95, los autores de la presente invención supusieron que las células que expresan CD95L debían detectarse en los órganos inflamados. Utilizando inmunohistoquímica, los autores de la presente invención evaluaron la distribución de CD95L y las células que expresaban IL17 en pacientes con lupus con lesiones cutáneas. Es de destacar que se observaron tinciones de CD95L e IL17 en biopsias de piel de pacientes con lupus, mientras que no fueron detectables en las pieles de control (es decir, pieles de reconstrucción mamaria) (Fig. 5D). Por otra parte, el CD95L se detectó principalmente en el endotelio de los vasos sanguíneos, que estaban rodeados por infiltración de células inmunitarias (Fig. 5D). Asimismo, un análisis densitométrico de pacientes con lupus (n = 10) destacó que la cantidad de CD95L se correlacionó con la cantidad de células inmunitarias que expresan IL17 infiltrante de tejido, lo que sugiere que este ligando puede representar un quimioatrayente para células Th17 CD4⁺ (Fig. 5E). Para investigar más a fondo si después de la escisión por metaloproteasa, CD95L ejerció una actividad quimioatrayente hacia todos los linfocitos T o promovió selectivamente la migración de una subpoblación, se evaluó la trans migración endotelial de células T CD4⁺ no sometidas a tratamiento previo aisladas de donantes sanos y sometidas a diferenciación in vitro en presencia o ausencia de sueros sanos o con LES. En comparación con los sueros sanos, los sueros de pacientes con LES desencadenaron un aumento moderado en la trans migración de Th1 mientras que mejoraron drásticamente la trans migración endotelial de las células Th17 (Fig. 5F). Más importante aún, este proceso de trans migración se basó en la señalización de CD95 debido a que la preincubación de los sueros con LES con un receptor señuelo (CD95-Fc) evitó la migración de células Th17 de una manera dependiente de la dosis (Fig. 5G).

Se ha informado de que las células T tanto Th1 como Th17 se acumulan en órganos inflamados de pacientes con lupus y ratones propensos a lupus que contribuyen a la patogénesis de la enfermedad. Para eliminar un supuesto papel desempeñado por otros componentes del suero en el fenómeno observado, los autores de la presente invención utilizaron en adelante una versión recombinante y homotrimérica de CD95L. Con este fin, las células HEK 293 se transfectaron con un vector codificante de CD95L completo y los autores de la presente invención utilizaron el CD95L escindido con metaloproteasa (cl-CD95L) contenido en este sobrenadante (Tauzin et al., 2011). De manera similar al CD95L en suero en pacientes con lupus, el cl-CD95L fue más eficaz para promover la trans migración de los linfocitos Th1 y Th17 en comparación con las células Th0 no diferenciadas y Th2 diferenciadas (Fig. 5H). Puesto que se ha sugerido que el desequilibrio de la razón de células reguladoras Th17/T (Treg) en órganos inflamados participa en trastornos autoinmunitarios y específicamente en la patogénesis del lupus (Yang et al., 2009), los autores de la presente invención evaluaron a continuación el efecto de cl-CD95L sobre la trans migración de células Treg. Como se muestra en la Figura 5I, cl-CD95L mejoró la trans migración endotelial de células T Th17, pero no logró inducir una trans migración de Treg significativa, lo que indica la acumulación de células Th17 a expensas de las células Treg en los tejidos inflamados de pacientes con lupus. Estos hallazgos revelaron que los niveles más altos de CD95L en suero en pacientes con LES en comparación con donantes sanos podrían contribuir a la acumulación de células Th17 en los órganos inflamados.

El reclutamiento y el tráfico celular se pueden controlar mediante niveles de expresión de moléculas de adhesión sobre los linfocitos y sus compañeros moleculares sobre las superficies de células endoteliales. La expresión de estas moléculas durante una respuesta inflamatoria es un proceso dinámico, que aumenta o disminuye la extravasación de células inmunitarias en los tejidos. Recientemente, se ha demostrado que las células Th17 se acumulan en los órganos como resultado de su interacción con E-selectina durante el rodamiento y la detención dependiente de ICAM-1 en el endotelio activado (Alcaide et al., 2012). Para determinar si estas moléculas contribuían a la migración de células T endoteliales mediada por CD95 de células Th17, los autores de la presente invención evaluaron el nivel de expresión de moléculas de adhesión clave sobre células endoteliales y células Th diferenciadas en presencia o ausencia de cl-CD95L. Es de destacar que, aunque se observó una cantidad importante de E-selectina en la superficie de HUVEC, no se detectó P-selectina en estas células. Además, cl-CD95L no alteró el nivel de expresión de diferentes moléculas de adhesión sobre HUVEC. Por el contrario, en presencia de cl-CD95L, las células Th17 se sometieron a una regulación por incremento de la glicoproteína P-selectina (PSGL-1), un ligando de E- y P-selectina, y el compañero de unión de ICAM-1 LFA-1. El nivel de expresión de estos ligandos no se vio afectado en las células Th1 y tendió hacia un estado regulado por disminución en las células Treg. Funcionalmente, se evaluó el impacto de la regulación por incremento de PSGL-1 en células Th17 estimuladas con cl-CD95L mediante el uso de un mAb neutralizador de E-selectina. El anti-E-selectina inhibió más eficazmente la trans migración de células Th17 en comparación con células Th1 tratadas de manera similar. Por el contrario, el bloqueo de las interacciones ICAM-1/LFA-1 por mAb anti-ICAM-1 perjudica en menor medida la migración de células Th1 y Th17 a través de las células endoteliales. Estos hallazgos sugirieron que cl-CD95L promovía la trans migración de células Th17 mediada por CD95 al mejorar la interacción de PSGL-1/E-selectina.

Cl-CD95L provoca in vivo una rápida acumulación de células Th17.

Para confirmar in vivo la capacidad quimioatrayente de cl-CD95L hacia las células Th17, a los ratones se les inyectó intraperitonealmente una dosis única de cl-CD95L o vehículo y, 24 horas después, se examinó la composición de las células T que infiltraban la cavidad peritoneal (células exudadas peritoneales - PEC) y el bazo. El recuento total de células de PEC y bazo reveló un aumento significativo en el número de linfocitos en estos compartimentos en comparación con los ratones a los que se había inyectado vehículo (Fig. 6A-B). La pérdida de la expresión de CD62L está asociada con el acoplamiento del receptor de células T. Utilizando este marcador, los autores de la presente

invención evaluaron la cantidad de células T CD4⁺ (CD4⁺CD62L⁻) activadas reclutadas en el bazo y la cavidad peritoneal de ratones a los que se había inyectado o no cl-CD95L. Los autores de la presente invención observaron una mayor cantidad de células T reclutadas en la cavidad peritoneal y el bazo tras la inyección de cl-CD95L en comparación con el medio de control (Fig. 6C-D). Por otra parte, los análisis de Q-PCR de los marcadores clave del linaje Th17 que incluían IL-17 (Fig. 6E), IL-23R (Fig. 6F) y CCR6 (Fig. 6G), realizados en estas células T CD4⁺ activadas mostraron que cl-CD95L inducía el reclutamiento de células Th17 en estos tejidos. Además, no hubo un aumento en los niveles de IFN- γ (células Th1) y niveles de FoxP3 (Treg) tras el examen (Fig. 6H-I), lo que respalda fuertemente que cl-CD95L actuaba principalmente como un potente ligando quimiotáctico para las células T Th17.

CD95 desencadena una respuesta de Ca²⁺ independiente del dominio de muerte

Los autores de la presente invención demostraron recientemente que el acoplamiento de CD95 evocó una respuesta de Ca²⁺ en linfocitos T activados que inhibía transitoriamente la señal apoptótica (Khadra et al., 2011) y promovía la motilidad celular (Tauzin et al., 2011). Estas observaciones plantearon la cuestión de si la inhibición de esta respuesta de Ca²⁺ mediada por CD95 puede inhibir simultáneamente la migración celular y potenciar o al menos dejar inalterada la señal apoptótica. Las células T expuestas a cl-CD95L formaron rápidamente un complejo molecular que contenía la fosfolipasa $\text{C}\alpha_1$ (PLC α_1) (Fig. 7A). Es de destacar que la falta de esta lipasa en la línea de células T Jurkat causaba una pérdida de la señal de Ca²⁺ mediada por CD95, mientras que la reconstitución de estas células con PLC α_1 de tipo salvaje restablecía una respuesta de calcio similar a la de la línea de células T parentales (Fig. 7B). A continuación, los autores de la presente invención investigaron si los componentes principales del DISC eran decisivos en la señal de calcio mediada por CD95. Con este fin, se evaluó la señal de calcio en células Jurkat con deficiencia de FADD y caspasa-8 estimuladas con cl-CD95L (Fig. 7C). Curiosamente, aunque la eliminación de estas moléculas bloqueó la transmisión de la vía de señalización apoptótica, no afectó a la señal de Ca²⁺ mediada por CD95 (Fig. 7C) lo que indica que la activación de PLC α_1 se producía independientemente de la formación de DISC y la implementación de la señal de muerte celular. Estos datos llevaron a los autores de la presente invención a analizar si el propio CD95-DD era necesario para desencadenar la respuesta de Ca²⁺. Se generaron construcciones de CD95 desprovistas de todo el dominio intracelular (CD95¹⁻¹⁷⁵), el DD (CD95¹⁻²¹⁰) o solo los últimos 15 aminoácidos implicados en el reclutamiento de FAP-1 (CD95¹⁻³⁰³) (Fig. 7D). Se informa de que la proteína-tirosina fosfatasa FAP-1 interactúa con los 15 aminoácidos del extremo carboxilo terminal de CD95 (Sato et al., 1995) y evita su exportación desde el citoplasma a la superficie celular (Ivanov et al., 2003). Estas construcciones se expresaron en una línea de células T seleccionada por su bajo nivel de expresión de CD95, a saber, CEM-IRC ((Beneteau et al., 2008). Si bien las células CEM-IRC mostraron una sensibilidad trivial a CD95L citotóxica, la expresión de CD95¹⁻³⁰³ o CD95 de tipo salvaje en células CEM-IRC a un nivel similar al de CD95 endógeno en células CEM parentales restableció la transmisión de la vía de señalización apoptótica. Por el contrario, altos niveles de CD95¹⁻¹⁷⁵ o CD95¹⁻²¹⁰ no lograron inducir la muerte celular y, como se observó anteriormente, se comportaron como receptores dominantes negativos (Siegel et al., 2000). Además, la reconstitución de células CEM-IRC con CD95 de tipo salvaje y CD95¹⁻³⁰³ restauró la señal de Ca²⁺ mediada por CD95 (Fig. 7E). Sorprendentemente, mientras que la pérdida del dominio de la muerte en la construcción CD95¹⁻²¹⁰ impedía la implementación de la señal apoptótica, no afectaba a la inducción de la señal de Ca²⁺ (Fig. 7E). Dado que una construcción de CD95 desprovista de toda su región intracelular no pudo evocar una respuesta de Ca²⁺, los autores de la presente invención concluyeron que la respuesta de Ca²⁺ proviene de los primeros 36 aminoácidos en la región intracelular de CD95. Para confirmar que los residuos de aminoácidos 175 a 210 de CD95 eran responsables de la respuesta de Ca²⁺, los autores de la presente invención determinaron si este dominio era capaz de interactuar con PLC α_1 . Con este fin, las construcciones de CD95 fusionadas con GFP y PLC α_1 de tipo salvaje se transfectaron primero transitoriamente en células HEK, las células se estimularon con CD95L, se lisaron y el complejo inmunitario asociado con CD95 se analizó mediante inmunotransferencia. Aunque las células expresaron niveles similares de las diferentes construcciones quiméricas de CD95 (Fig. 8A), la presencia de PLC α_1 en el inmunoprecipitado de CD95 solo se perdió con la construcción CD95¹⁻¹⁷⁵ (Fig. 8B), mientras que tanto CD95¹⁻²¹⁰ como CD95¹⁻¹⁷⁵ perdieron su capacidad de reclutar la proteína adaptadora FADD. Curiosamente, una construcción de CD95 desprovista de DD mostró una mayor capacidad de unión para PLC α_1 en comparación con CD95 de tipo salvaje (Fig. 8B), lo que sugiere que esta región puede interferir estructural o funcionalmente en la unión de PLC α_1 al dominio 175-210. En segundo lugar, los autores de la presente invención generaron una construcción que consistía en los aminoácidos 175 a 210 que denominaron dominio inductor de calcio (CID) fusionado a mCherry. A diferencia de mCherry solo, CD95⁽¹⁷⁵⁻²¹⁰⁾-mCherry interactuó con PLC α_1 e inhibió su reclutamiento a CD95 (Fig. 8C), lo que indica que la interferencia con este dominio yuxtamembrana puede representar una forma de prevenir la señal de Ca²⁺ mediada por CD95. Finalmente, para confirmar esta hipótesis, los autores de la presente invención sintetizaron un péptido de penetración celular que conectaba el tramo de 36 aminoácidos del CID con la secuencia de VIH-TAT de 9 aminoácidos (Fig. 8D), que sirve como transportador para translocar la proteína completa a través de la membrana plasmática (Vives et al., 1997). La preincubación de las líneas de células T Jurkat y CEM con el péptido TAT-CID perjudicó el reclutamiento de PLC α_1 (Fig. 8D) y abolió la inducción de la señal de Ca²⁺ mediada por CD95 (Fig. 8E). De manera similar, la preincubación de linfocitos T activados de sujetos sanos con TAT-CID inhibió la unión de PLC α_1 a CD95 (Fig. S4A) y anuló la respuesta de Ca²⁺ mediada por CD95, de manera similar a la xestospingina C, un antagonista de la acción liberadora de calcio del inositol-1,4,5-trisfosfato (IP3), el sustrato generado por la activación de PLC α_1 (Fig. 8F). Por otra parte, la preincubación de TAT-CID inhibió la fosforilación de Akt en su serina 473 (un sello distintivo de la activación de la vía de señalización de PI3K) en los PBL expuestos a cl-CD95L. Es de destacar que, aunque el tratamiento con TAT-CID inhibió las señales de Ca²⁺ y PI3K mediadas por CD95, no afectó

a la ejecución de la vía de señalización apoptótica. En conclusión, los autores de la presente invención mapearon un nuevo dominio nuevo en CD95 denominado dominio iniciador de calcio que reclutó PLC γ 1 y provocó la respuesta de Ca $^{2+}$.

Debido a que la cisteína en la posición 183 está sujeta a la palmitoilación que promueve la agregación de CD95 (Feig et al., 2007) y su redistribución en balsa lipídica (Chakrabandhu et al., 2007), los autores de la presente invención se preguntaron si este aminoácido era decisivo en la implementación de la señal de Ca $^{2+}$ mediada por CD95. Para abordar esta pregunta y evitar cualquier interferencia de la señalización apoptótica en la respuesta de Ca $^{2+}$ mediada por CD95, los autores de la presente invención reconstituyeron células CEM-IRC con un CD95 $^{1-210}$ (sin dominio de muerte) en el que la cisteína 183 fue reemplazada por una valina. Ni CD95 $^{1-210}$ ni CD95 $^{1-210}(C183V)$ lograron desencadenar la muerte celular en presencia de Ig-CD95L, pero provocaron una respuesta de Ca $^{2+}$ similar, lo que sugiere que el mecanismo de palmitoilación no era decisivo en la inducción de esta señal. Para confirmar esta observación, se sintetizó un péptido TAT-CID en el que la cisteína fue reemplazada por una valina. La preincubación de las células Jurkat y los PBL activados con este péptido mutado todavía inhibió la respuesta de Ca $^{2+}$ mediada por CD95, lo que confirma que esta cisteína no contribuía a la respuesta de Ca $^{2+}$ en células expuestas a cl-CD95L. Finalmente, los autores de la presente invención evaluaron si el efecto inhibitorio del TAT-CID era selectivo de la señal de Ca $^{2+}$ mediada por CD95. Es de destacar que, aunque la estimulación de TCR condujo a una respuesta de Ca $^{2+}$ dependiente de PLC γ 1, el pretratamiento con TAT-CID no alteró esta señal. Del mismo modo, la respuesta de Ca $^{2+}$ impulsada por PLC β evocada por carbacol, un agonista colinérgico que se sabe que evoca la respuesta de Ca $^{2+}$ a través de la activación de receptores acoplados a proteína G no se vio afectada por el tratamiento con TAT-CID. Estos hallazgos indicaron que el péptido TAT-CID ejerció una inhibición selectiva de la señal de calcio mediada por CD95.

La inhibición de la señal de Ca $^{2+}$ mediada por CD95 evita la trans migración de células Th17 y alivia los signos clínicos en ratones Lpr.

Para abordar si el régimen TAT-CID puede representar una estrategia terapéutica en el lupus, los autores de la presente invención evaluaron en primer lugar su efecto sobre la trans migración de células Th17. Como se muestra en la Figura 9A, TAT-CID inhibió la trans migración endotelial mediada por CD95 de células Th17 humanas de una manera dependiente de la dosis. El alineamiento de las proteínas CD95 humanas y de ratón indicó una divergencia de secuencia en la región CID, lo que sugiere que el CID humano (TAT-hCID) puede resultar ineficaz para prevenir la respuesta de Ca $^{2+}$ inducida en células T de ratón. Para determinar la actividad inhibitoria de TAT-hCID sobre la respuesta de Ca $^{2+}$ inducida por CD95 murino, los autores de la presente invención reconstituyeron en primer lugar células CEM-IRC con CD95 de ratón de tipo salvaje. Las señales tanto apoptóticas como de Ca $^{2+}$ mediada por CD95 fueron restauradas en estas células en comparación con las células CEM-IRC parentales. Es importante destacar que TAT-hCID no pudo inhibir la respuesta de Ca $^{2+}$ mediada por CD95 en células CEM-IRC que expresaban CD95 de ratón. Por el contrario, el reemplazo de la secuencia CID humana por su ortólogo de ratón (TAT-mCID) abolió la respuesta de Ca $^{2+}$ mediada por CD95 en estas células. Del mismo modo, TAT-mCID también inhibió la señal de Ca $^{2+}$ mediada por CD95 en linfocitos T de ratón, lo que confirma que, a pesar de la divergencia entre las secuencias CD95-CID humanas y de ratón (48,9% de identidad de secuencia a lo largo de las secuencias CD95 humanas y de ratón completas frente a 21,2% sobre las dos CID), estos dominios conservaron la propiedad para activar la señal de Ca $^{2+}$ en estas especies.

Para investigar más a fondo la supuesta actividad terapéutica de TAT-CID y determinar si este péptido ejercía un efecto inhibitorio sobre el reclutamiento de células T Th17 in vivo, los autores de la presente invención inyectaron a ratones C57B1/6 40 mg/kg de TAT-control o TAT-CID dos horas antes de la inyección intraperitoneal de cl-CD95L y la cantidad de células T infiltradas en la cavidad peritoneal se evaluó 24 horas después. El recuento total de células del PEC reveló que el régimen TAT-CID abolió la acumulación de linfocitos T mediada por CD95 en este compartimento (Fig. 9B). De acuerdo con los datos mostrados en la figura 2, la inyección de cl-CD95L desencadenó un aumento de la producción de IL17 en la cavidad peritoneal que se evitó con el tratamiento con TAT-CID (Fig. 9C). Además, no se observaron diferencias en los niveles de IFN- γ entre los ratones a los que se había inyectado el péptido de control y el péptido TAT-CID, destacando que el reclutamiento preferencial de células T CD4 secretoras de IL-17 por cl-CD95L fue abolido in vivo mediante la administración de TAT-CID

En conclusión, la inhibición selectiva de la señal de Ca $^{2+}$ mediada por CD95 resultó ser una estrategia terapéutica novedosa y prometedora para reducir la acumulación de células Th17 en tejidos inflamados de pacientes con lupus sin alterar la transmisión de la señal apoptótica.

Discusión:

El estudio de los autores de la presente invención proporciona nuevos conocimientos sobre los mecanismos celulares y moleculares mediante los cuales el CD95L escindido con metaloproteasa mejora la inflamación en pacientes con LES. Los autores de la presente invención mostraron que el CD95L transmembrana es expresado ectópicamente por las células endoteliales que cubren los vasos sanguíneos en las pieles inflamadas de los pacientes con lupus. Más importante aún, estos vasos CD95L $^{+}$ están rodeados por un infiltrado inmunitario masivo que sugiere fuertemente que estas estructuras pueden servir como "puertas abiertas" para las células proinflamatorias, entre las cuales se encuentran las células Th17. Expuestas a cl-CD95L, estas células que expresan

IL17 regulan por incremento PSGL-1 y LFA-1, dos moléculas de adhesión involucradas en el rodamiento y la unión de los leucocitos a las células endoteliales. Es de destacar que las células T con los niveles más altos de PSGL-1 funcional también muestran la mayor capacidad para la secreción de citocinas efectoras y para la actividad citotóxica (Baaten et al., 2013). Por lo tanto, cl-CD95L puede alimentar el proceso inflamatorio no solo al promover el reclutamiento de células Th1 y Th17 activadas en los tejidos inflamados, sino también al alterar el patrón de liberación de citocinas en estos órganos.

Recientemente, Coukos y colaboradores demostraron que CD95L está presente en los vasos sanguíneos de ciertos tejidos cancerosos (es decir, ovario, colon, próstata, riñón) (Motz et al., 2014) y asociaron esta tinción con escasa infiltración de CD8⁺. Estos autores mostraron que CD95L unido a la membrana en las células endoteliales eliminaba las células T y, al hacerlo, evitaba la inmunidad antitumoral eficaz (Motz et al., 2014). Los autores de la presente invención evaluaron la infiltración de células T CD8⁺ alrededor de los vasos sanguíneos positivos para CD95L en pacientes con lupus y el análisis densitométrico no reveló una correlación invertida entre las cantidades de CD95L y la cantidad de células T CD8⁺ infiltrantes. Dado que CD95L ejerce su actividad quimioatrayente solo después de su escisión por metaloproteasas (Tauzin et al., 2011), los autores de la presente invención suponen que al menos en parte, la discrepancia en la magnitud de los infiltrados inmunitarios que rodean los vasos sanguíneos CD95⁺ observada en ciertos tipos de cáncer y pacientes con lupus puede ser causada por la ausencia o la presencia, respectivamente, de una metaloproteasa de procesamiento de CD95L que aún no se ha identificado.

El estudio de los autores de la presente invención también revela los residuos de CD95 implicados en la implementación de la vía de señalización de Ca²⁺. Incluso si los datos de los autores de la presente invención muestran que CID interactúa con PLCγ1 en células no estimuladas (Fig. 8C), lo que sugiere que puede ocurrir una interacción directa entre CD95 y esta lipasa, los autores de la presente invención no pueden descartar que un tercer compañero participe en esta asociación. Por ejemplo, un estudio reciente mostró que TRIP6 expresado en exceso en glioblastoma vincula el dominio CID a la vía de señalización NF-κB y, por lo tanto, promueve la migración celular mediada por CD95 en estas células (Lai et al., 2010). Sin embargo, los mismos autores no detectaron TRIP6 en células T Jurkat e impidieron su participación en la señal no apoptótica desencadenada en células T, lo que sugiere una actividad específica de tejido de esta molécula (Lai et al., 2010). Dentro de las células neuronales, el dominio yuxtamembrana de CD95 (residuos de aminoácidos 175 a 188) interactúa con ezrina, una molécula adaptadora que une CD95 a la red de actina y, por lo tanto, promueve el crecimiento de neuritas a través de la activación de Rac1 y la remodelación del citoesqueleto (Desbarats et al., 2003). C1-CD95L induce el reclutamiento de PLCγ1 rápidamente (del orden del minuto) y transitoriamente. Dado que esta señal proviene del CID, este dominio yuxtamembrana de CD95 requerirá un análisis más detallado de su relación de estructura-actividad para comprender cómo puede evocar la respuesta de Ca²⁺ sin implementar la vía de señalización apoptótica impulsada por caspasa y dependiente del dominio de muerte.

En este sentido, los residuos de aminoácido 175-210 de CD95 implicados en la ejecución de la respuesta de Ca²⁺ nunca se han cristalizado probablemente debido al hecho de que esta región corresponde a una región intrínsecamente desordenada (IDR) que carece de una estructura tridimensional única. Utilizando diferentes experimentos de dinámica molecular, los autores de la presente invención confirmaron que este péptido tiene una propensión al plegamiento muy débil. La simulación por ordenador también mostró que el péptido comparte otra propiedad de IDR: los cambios entre los estados de orden y de desorden son frecuentes. Por lo tanto, los autores de la presente invención suponen que el péptido (o una parte del mismo) puede plegarse de manera estable en presencia de compañeros de unión, comenzando desde una región preestructurada, tal como segmentos helicoidales observados por simulaciones atomísticas (Sugase K. et al., Nature, 447, 1021-1025, 2007; Wright y Dyson, Curr. Opin. Struct. Biol., 19, 31-38, 2009). Significativamente, las IDR en las proteínas tienden a tener un papel central en las redes de interacción de proteínas (Cumberworth et al., 2013). De hecho, estas regiones desordenadas pueden interactuar transitoriamente con un gran número de compañeros y, por lo tanto, modular la señalización celular de una manera dinámica. Esta característica molecular es compatible con la participación de este dominio en la inducción de una respuesta de Ca²⁺ rápida y transitoria que promueve la migración celular.

Asimismo, un análisis de mutaciones dentro de CD95 encontrado en diferentes patologías reveló que esta región exhibe una menor cantidad de mutaciones en comparación con el dominio de muerte adyacente, lo que sugiere que, a diferencia del DD, la acumulación de mutaciones en esta región puede no conferir una ventaja selectiva en la carcinogénesis o contribuir al proceso inflamatorio en pacientes con ALPS. Es de destacar que antes de que la etiología de ALPS tipo la se asociara con mutaciones en el gen CD95, estos pacientes fueron diagnosticados erróneamente como pacientes de LES.

Un reciente ensayo clínico de fase I/II encontró que un receptor señuelo (conocido como APG101) capaz de bloquear la interacción CD95/CD95L no mostró ninguna toxicidad en seres humanos que padecían glioblastoma (Tuettenberg et al., 2012). Los autores de la presente invención pueden imaginar que este agente terapéutico puede, en un corto plazo, beneficiar a los pacientes con lupus. Sin embargo, dado que este inhibidor no discrimina entre las funciones antitumorales/infecciosas de CD95L (es decir, la señal apoptótica) y su actividad proinflamatoria, puede provocar efectos secundarios nocivos que impiden su uso en estos pacientes con LES. Debido a que las señales apoptóticas y de calcio provienen de dos dominios separados y distantes en CD95 y esa inhibición de la respuesta de Ca²⁺ mediada por CD95 no impide la vía de señalización apoptótica (Khadra et al., 2011), los autores de la presente invención proponen que la inhibición selectiva de la respuesta de Ca²⁺ mediada por CD95 proporcionará

una excelente oportunidad para bloquear la actividad proinflamatoria de cl-CD95L en ciertos trastornos inflamatorios crónicos sin afectar a las funciones antitumorales e infecciosas de su contraparte unida a la membrana.

Referencias

A lo largo de esta solicitud, varias referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece esta descripción.

5 Alcaide, P., E. Maganto-Garcia, G. Newton, R. Travers, K.J. Croce, D.X. Bu, F.W. Luscinskas, y A.H. Lichtman. 2012. Difference in Th1 and Th17 lymphocyte adhesion to endothelium. *J Immunol* 188:1421-1430.

Baaten, B.J., A.M. Cooper, S.L. Swain, y L.M. Bradley. 2013. Location, Location, Location: The Impact of Migratory Heterogeneity on T Cell Function. *Frontiers in immunology* 4:311.

10 Beneteau, M., S. Daburon, J.F. Moreau, J.L. Taupin, y P. Legembre. 2007. Dominant-negative Fas mutation is reversed by down-expression of c-FLIP. *Cancer Res* 67:108-115.

Beneteau, M., M. Pizon, B. Chaigne-Delalande, S. Daburon, P. Moreau, F. De Giorgi, F. Ichas, A. Rebillard, M.T. Dimanche-Boitrel, J.L. Taupin, J.F. Moreau, y P. Legembre. 2008. Localization of Fas/CD95 into the lipid rafts on down-modulation of the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. *Mol Cancer Res* 6:604-613.

15 Chakrabandhu, K., Z. Herincs, S. Huault, B. Dost, L. Peng, F. Conchonaud, D. Marguet, H.T. He, y A.O. Hueber. 2007. Palmitoylation is required for efficient Fas cell death signaling. *Embo J* 26:209-220.

Crispin, J.C., M. Oukka, G. Bayliss, R.A. Cohen, C.A. Van Beek, I.E. Stillman, V.C. Kytтарыs, Y.T. Juang, y G.C. Tsokos. 2008. Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys. *J Immunol* 181:8761-8766.

20 Cumberworth, A., G. Lamour, M.M. Babu, y J. Gsponer. 2013. Promiscuity as a functional trait: intrinsically disordered regions as central players of interactomes. *Biochem J* 454:361-369.

Desbarats, J., R.B. Birge, M. Mimouni-Rongy, D.E. Weinstein, J.S. Palerme, y M.K. Newell. 2003. Fas engagement induces neurite growth through ERK activation and p35 upregulation. *Nat Cell Biol* 5:118-125.

Feig, C., V. Tchikov, S. Schutze, y M.E. Peter. 2007. Palmitoylation of CD95 facilitates formation of SDS-stable receptor aggregates that initiate apoptosis signaling. *Embo J* 26:221-231.

25 Fouque, A., L. Debure, y P. Legembre. 2014. The CD95/CD95L signaling pathway: A role in carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta*

Herrero, R., O. Kajikawa, G. Matute-Bello, Y. Wang, N. Hagimoto, S. Mongovin, V. Wong, D.R. Park, N. Brot, J.W. Heinecke, H. Rosen, R.B. Goodman, X. Fu, y T.R. Martin. 2011. The biological activity of FasL in human and mouse lungs is determined by the structure of its stalk region. *The Journal of clinical investigation* 121:1174-1190.

30 Ivanov, V.N., P. Lopez Bergami, G. Maulit, T.A. Sato, D. Sassoon, y Z. Ronai. 2003. FAP-1 association with Fas (Apo-1) inhibits Fas expression on the cell surface. *Mol Cell Biol* 23:3623-3635.

Jaffe, E.A., R.L. Nachman, C.G. Becker, y C.R. Minick. 1973. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 52:2745-2756.

35 Khadra, N., L. Bresson-Bepoldin, A. Penna, B. Chaigne-Delalande, B. Segui, T. Levade, A.M. Vacher, J. Reiffers, T. Ducret, J.F. Moreau, M.D. Cahalan, P. Vacher, y P. Legembre. 2011. CD95 triggers Orail-mediated localized Ca²⁺ entry, regulates recruitment of protein kinase C (PKC) beta2, and prevents death-inducing signaling complex formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:19072-19077.

Kiaei, M., K. Kipiani, N.Y. Calingasan, E. Wille, J. Chen, B. Heissig, S. Rafii, S. Lorenzl, y M.F. Beal. 2007. Matrix metalloproteinase-9 regulates TNF-alpha and FasL expression in neuronal, glial cells and its absence extends life in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 205:74-81.

40 Kirkin, V., N. Cahuzac, F. Guardiola-Serrano, S. Huault, K. Luckerath, E. Friedmann, N. Novac, W.S. Wels, B. Martoglio, A.O. Hueber, y M. Zornig. 2007. The Fas ligand intracellular domain is released by ADAM10 and SPPL2a cleavage in T-cells. *Cell Death Differ* 14:1678-1687.

45 Kischkel, F.C., S. Hellbardt, I. Behrmann, M. Germer, M. Pawlita, P.H. Kramer, y M.E. Peter. 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* 14:5579-5588.

Kleber, S., I. Sancho-Martinez, B. Wiestler, A. Beisel, C. Gieffers, O. Hill, M. Thiemann, W. Mueller, J. Sykora, A. Kuhn, N. Schreglmann, E. Letellier, C. Zuliani, S. Klussmann, M. Teodorczyk, H.J. Grone, T.M. Ganten, H. Sultmann, J. Tutenberg, A. von Deimling, A. Regnier-Vigouroux, C. Herold-Mende, y A. Martin-Villalba. 2008. Yes and PI3K bind CD95 to signal invasion of glioblastoma. *Cancer Cell* 13:235-248.

- Lai, Y.J., V.T. Lin, Y. Zheng, E.N. Benveniste, y F.T. Lin. 2010. The adaptor protein TRIP6 antagonizes Fas-induced apoptosis but promotes its effect on cell migration. *Mol Cell Biol* 30:5582-5596.
- 5 Malleter, M., S. Tauzin, A. Bessede, R. Castellano, A. Goubard, F. Godey, J. Leveque, P. Jezequel, L. Campion, M. Campone, T. Ducret, G. Macgrogan, L. Debure, Y. Collette, P. Vacher, y P. Legembre. 2013. CD95L cell surface cleavage triggers a prometastatic signaling pathway in triple-negative breast cancer. *Cancer Res* 73:6711-6721.
- Matsuno, H., K. Yudoh, Y. Watanabe, F. Nakazawa, H. Aono, y T. Kimura. 2001. Stromelysin-1 (MMP-3) in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis has potential to cleave membrane bound Fas ligand. *J Rheumatol* 28:22-28.
- 10 Motz, G.T., S.P. Santoro, L.P. Wang, T. Garrabrant, R.R. Lastra, I.S. Hagemann, P. Lal, M.D. Feldman, F. Benencia, y G. Coukos. 2014. Tumor endothelium FasL establishes a selective immune barrier promoting tolerance in tumors. *Nat Med*
- O' Reilly, L.A., L. Tai, L. Lee, E.A. Kruse, S. Grabow, W.D. Fairlie, N.M. Haynes, D.M. Tarlinton, J.G. Zhang, G.T. Belz, M.J. Smyth, P. Bouillet, L. Robb, y A. Strasser. 2009. Membrane-bound Fas ligand only is essential for Fas-induced apoptosis. *Nature* 461:659-663.
- 15 O'Reilly, K.E., F. Rojo, Q.B. She, D. Solit, G.B. Mills, D. Smith, H. Lane, F. Hofmann, D.J. Hicklin, D.L. Ludwig, J. Baselga, y N. Rosen. 2006. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res* 66:1500-1508.
- Orlinick, J.R., K.B. Elkon, y M.V. Chao. 1997. Separate domains of the human fas ligand dictate self-association and receptor binding. *J Biol Chem* 272:32221-32229.
- 20 Sato, T., S. Irie, S. Kitada, y J.C. Reed. 1995. FAP-1: a protein tyrosine phosphatase that associates with Fas. *Science* 268:411-415.
- Schulte, M., K. Reiss, M. Lettau, T. Maretzky, A. Ludwig, D. Hartmann, B. de Strooper, O. Janssen, y P. Saftig. 2007. ADAM10 regulates FasL cell surface expression and modulates FasL-induced cytotoxicity and activation-induced cell death. *Cell Death Differ* 14:1040-1049.
- 25 Shin, M.S., N. Lee, y I. Kang. 2011. Effector T-cell subsets in systemic lupus erythematosus: update focusing on Th17 cells. *Curr Opin Rheumatol* 23:444-448.
- Siegel, R.M., J.K. Frederiksen, D.A. Zacharias, F.K. Chan, M. Johnson, D. Lynch, R.Y. Tsien, y M.J. Lenardo. 2000. Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science* 288:2354-2357.
- 30 Steinmetz, O.M., J.E. Turner, H.J. Paust, M. Lindner, A. Peters, K. Heiss, J. Velden, H. Hopfer, S. Fehr, T. Krieger, C. Meyer-Schwesinger, T.N. Meyer, U. Helmchen, H.W. Mittrucker, R.A. Stahl, y U. Panzer. 2009. CXCR3 mediates renal Th1 and Th17 immune response in murine lupus nephritis. *J Immunol* 183:4693-4704.
- Suda, T., T. Takahashi, P. Golstein, y S. Nagata. 1993. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75:1169-1178.
- 35 Tauzin, S., B. Chaigne-Delalande, E. Selva, N. Khadra, S. Daburon, C. Contin-Bordes, P. Blanco, J. Le Seyec, T. Ducret, L. Counillon, J.F. Moreau, P. Hofman, P. Vacher, y P. Legembre. 2011. The naturally processed CD95L elicits a c-yes/calcium/PI3K-driven cell migration pathway. *PLoS Biol* 9:e1001090.
- Tuettenberg, J., M. Seiz, K.M. Debatin, W. Hollburg, M. von Staden, M. Thiemann, B. Hareng, H. Fricke, y C. Kunz. 2012. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety and tolerability of APG101, a CD95-Fc fusion protein, in healthy volunteers and two glioma patients. *International immunopharmacology* 13:93-100.
- 40 Vargo-Gogola, T., H.C. Crawford, B. Fingleton, y L.M. Matrisian. 2002. Identification of novel matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) cleavage sites in murine and human Fas ligand. *Arch Biochem Biophys* 408:155-161.
- Vives, E., P. Brodin, y B. Lebleu. 1997. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem* 272:16010-16017.
- 45 Wang, Y., S. Ito, Y. Chino, D. Goto, I. Matsumoto, H. Murata, A. Tsutsumi, T. Hayashi, K. Uchida, J. Usui, K. Yamagata, y T. Sumida. 2010. Laser microdissection-based analysis of cytokine balance in the kidneys of patients with lupus nephritis. *Clin Exp Immunol* 159:1-10.
- Yang, J., Y. Chu, X. Yang, D. Gao, L. Zhu, X. Yang, L. Wan, y M. Li. 2009. Th17 and natural Treg cell population dynamics in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 60:1472-1483.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> INSERM
- 5 <120> Polipéptidos y usos de los mismos para reducir la motilidad celular mediada por CD95
- <130> BIO13374 LEGEMBRE / MC
- <160> 3
- 10 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 319
- 15 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1
- Arg Leu Ser Ser Lys Ser Val Asn Ala Gln Val Thr Asp Ile Asn Ser
 1 5 10 15
- Lys Gly Leu Glu Leu Arg Lys Thr Val Thr Thr Val Glu Thr Gln Asn
 20 25 30
- Leu Glu Gly Leu His His Asp Gly Gln Phe Cys His Lys Pro Cys Pro
 35 40 45
- Pro Gly Glu Arg Lys Ala Arg Asp Cys Thr Val Asn Gly Asp Glu Pro
 50 55 60
- Asp Cys Val Pro Cys Gln Glu Gly Lys Glu Tyr Thr Asp Lys Ala His
 65 70 75 80
- Phe Ser Ser Lys Cys Arg Arg Cys Arg Leu Cys Asp Glu Gly His Gly
 85 90 95
- Leu Glu Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg Thr Gln Asn Thr Lys Cys Arg
 100 105 110
- Cys Lys Pro Asn Phe Phe Cys Asn Ser Thr Val Cys Glu His Cys Asp
 115 120 125
- Pro Cys Thr Lys Cys Glu His Gly Ile Ile Lys Glu Cys Thr Leu Thr
 130 135 140
- Ser Asn Thr Lys Cys Lys Glu Glu Gly Ser Arg Ser Asn Leu Gly Trp
 145 150 155 160
- Leu Cys Leu Leu Leu Leu Pro Ile Pro Leu Ile Val Trp Val Lys Arg
 165 170 175

20

ES 2 796 857 T3

Lys Glu Val Gln Lys Thr Cys Arg Lys His Arg Lys Glu Asn Gln Gly
 180 185 190

Ser His Glu Ser Pro Thr Leu Asn Pro Glu Thr Val Ala Ile Asn Leu
 195 200 205

Ser Asp Val Asp Leu Ser Lys Tyr Ile Thr Thr Ile Ala Gly Val Met
 210 215 220

Thr Leu Ser Gln Val Lys Gly Phe Val Arg Lys Asn Gly Val Asn Glu
 225 230 235 240

Ala Lys Ile Asp Glu Ile Lys Asn Asp Asn Val Gln Asp Thr Ala Glu
 245 250 255

Gln Lys Val Gln Leu Leu Arg Asn Trp His Gln Leu His Gly Lys Lys
 260 265 270

Glu Ala Tyr Asp Thr Leu Ile Lys Asp Leu Lys Lys Ala Asn Leu Cys
 275 280 285

Thr Leu Ala Glu Lys Ile Gln Thr Ile Ile Leu Lys Asp Ile Thr Ser
 290 295 300

Asp Ser Glu Asn Ser Asn Phe Arg Asn Glu Ile Gln Ser Leu Val
 305 310 315

<210> 2
 <211> 16
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Penetratina

10 <400> 2
 Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
 1 5 10 15

15 <210> 3
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> TAT

<400> 3
 Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5 10

25

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que varía del residuo de aminoácido en la posición 175 al residuo de aminoácido en la posición 210 en SEQ ID NO: 1 y que consiste en 36; 37; 38; 39; 40; 41; 42; 43; 44; 45; 46; 47; 48; 49; 50; 51; 52; 53; 54; 55; 56; 57; 58; 59; 60; 61; 62; 63; 64; 65; 66; 67; 68; 69; 70; 71; 72; 73; 74; 75; 76; 77; 78; 79; 80; 81; 82; 83; 84; 85; 86; 87; 88; 89; 90; 91; 92; 93; 94; 95; 96; 97; 98; 99; o 100 aminoácidos.
2. El polipéptido de la reivindicación 1 que comprende menos de 50 aminoácidos.
3. Una proteína de fusión en donde el polipéptido de la reivindicación 1 se fusiona directamente o por medio de un espaciador a al menos un polipéptido heterólogo.
4. La proteína de fusión de la reivindicación 3, en donde el polipéptido heterólogo es un péptido de penetración celular, una secuencia de penetración celular Transactivadora de la Transcription (TAT), un péptido permeable para las células o una secuencia penetrante membranosa.
5. Una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de la reivindicación 1 o la proteína de fusión de la reivindicación 3.
6. Un vector y un casete de expresión en los que la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 5 está asociada con elementos adecuados para controlar la transcripción y, opcionalmente, la traducción.
7. Una célula anfitriona que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 5 o el vector de la reivindicación 6.
8. La célula anfitriona de la reivindicación 7, que es una célula anfitriona procariótica o eucariótica transformada genéticamente con al menos una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 5 o vector de la reivindicación 6.
9. Un método para producir el polipéptido de la reivindicación 1 o la proteína de fusión de la reivindicación 3 que comprende la etapa que consiste en: (i) cultivar la célula anfitriona transformada de la reivindicación 7 en condiciones adecuadas para permitir la expresión de dicho polipéptido o proteína de fusión; y (ii) recuperar el polipéptido o la proteína de fusión expresados.
10. El polipéptido de la reivindicación 1 o la proteína de fusión de la reivindicación 3 para su uso en un método de tratamiento del cáncer o de una enfermedad mediada por Th17 en un sujeto que lo necesite en donde la enfermedad mediada por Th17 se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Behçet, polimiositis/dermatomiositis, citopenias autoinmunitarias, miocarditis autoinmunitaria, cirrosis hepática primaria, síndrome de Goodpasture, meningitis autoinmunitaria, síndrome de Sjögren, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Addison, alopecia areata, espondilitis anquilosante, hepatitis autoinmunitaria, paperas autoinmunitarias, enfermedad de Crohn, diabetes mellitus, diabetes mellitus insulino dependiente, epidermolísis ampollosa distrófica, epididimitis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de Hashimoto, anemia hemolítica, esclerosis múltiple, miastenia gravis, pénfigo vulgar, psoriasis, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, escleroma, espondiloartropatía, tiroiditis, vasculitis, vitíligo, mixedema, anemia perniciosa y colitis ulcerosa.
11. El polipéptido o la proteína de fusión para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el sujeto padece un cáncer de mama triple negativo.
12. El polipéptido o la proteína de fusión para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el sujeto padece lupus eritematoso sistémico.
13. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de la reivindicación 1 o la proteína de fusión de la reivindicación 3 y un portador farmacéuticamente aceptable.
14. Un método *in vitro* para el escrutinio de un fármaco para reducir la motilidad celular mediada por CD95 que comprende las etapas que consisten en a) determinar la capacidad de un compuesto candidato para inhibir la interacción entre CD95 y el polipéptido de la reivindicación 1 o la proteína de fusión de la reivindicación 3 y b) seleccionar positivamente el compuesto candidato que inhibe dicha interacción.

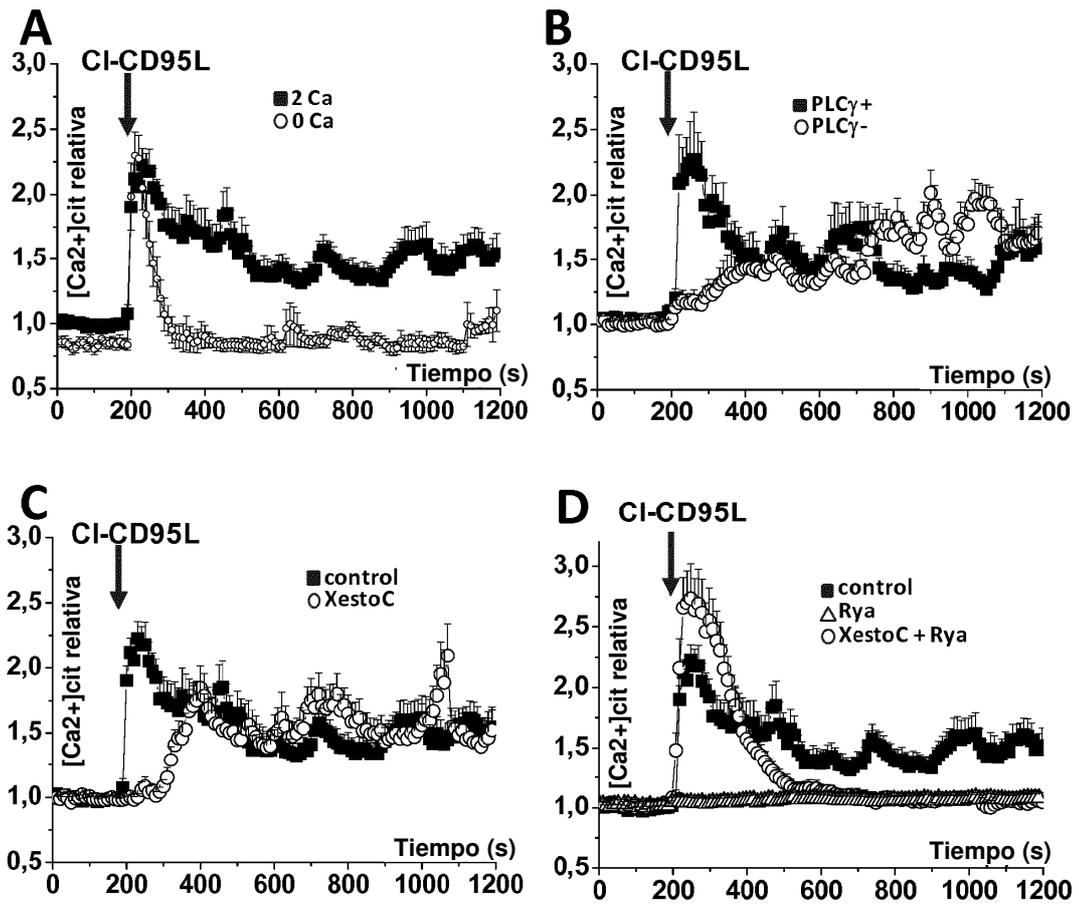


Figura 1

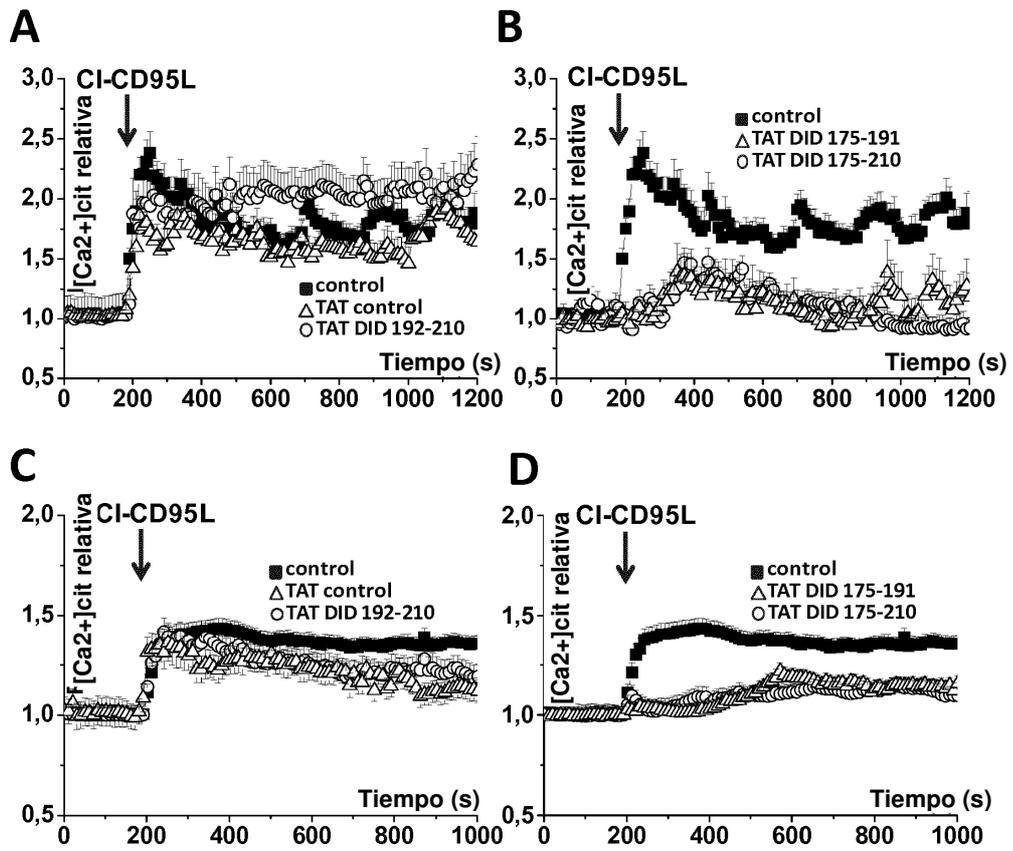


Figura 2

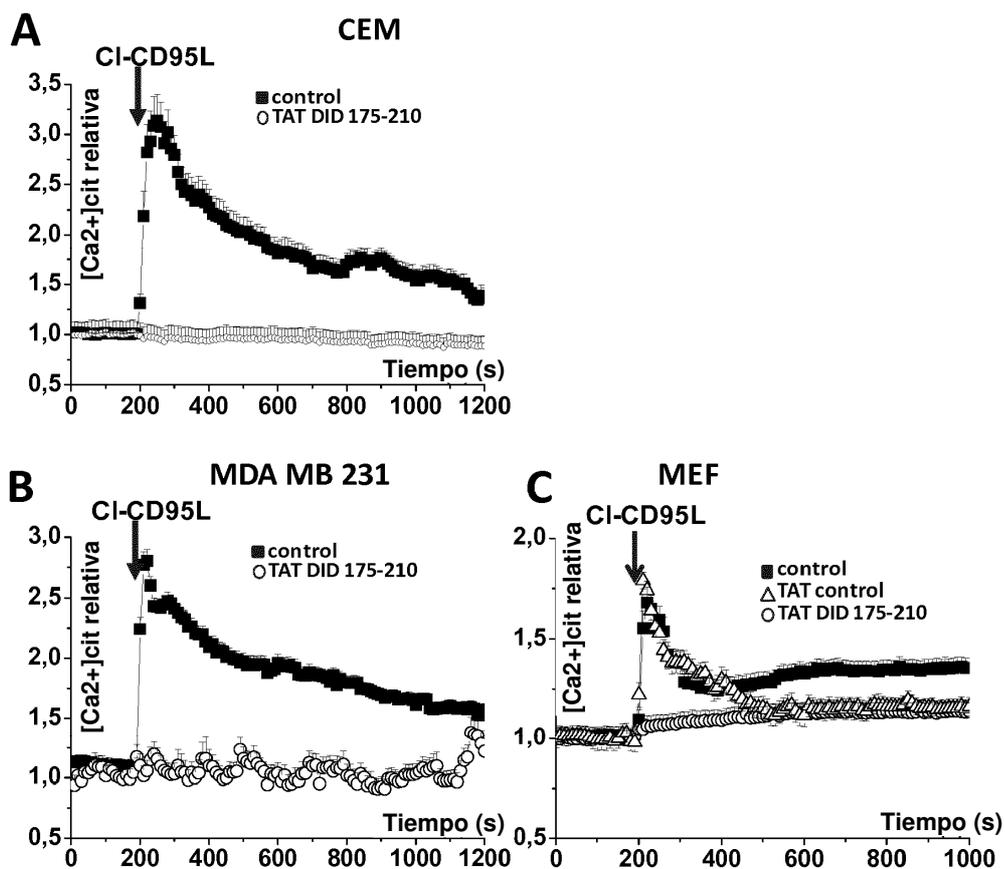


Figura 3

MDA-MB-231

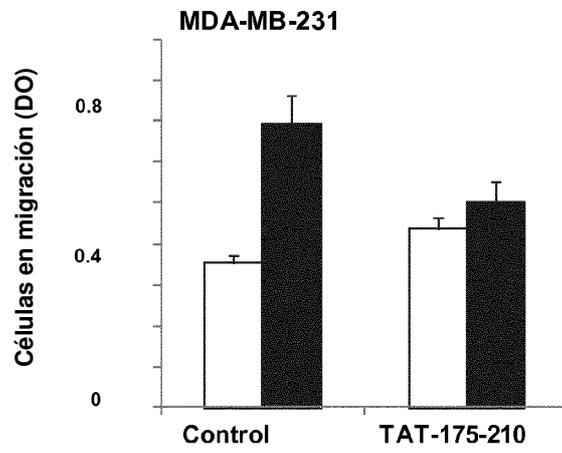
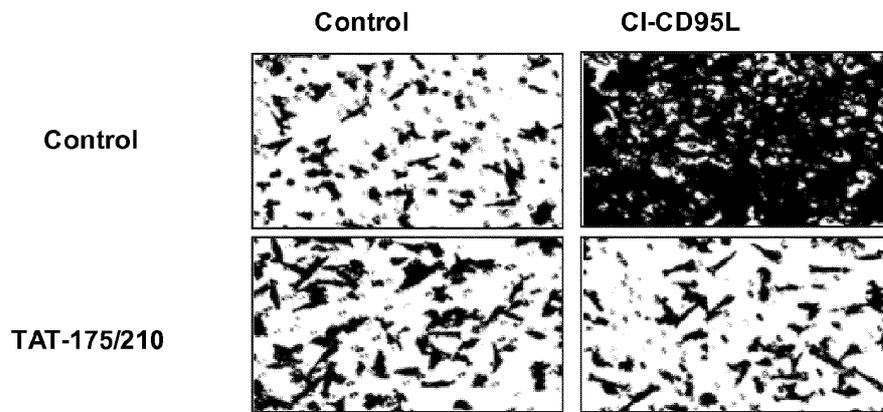


Figura 4

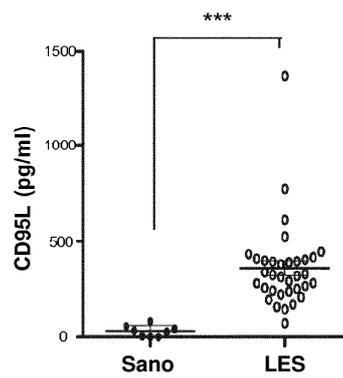


Figura 5A

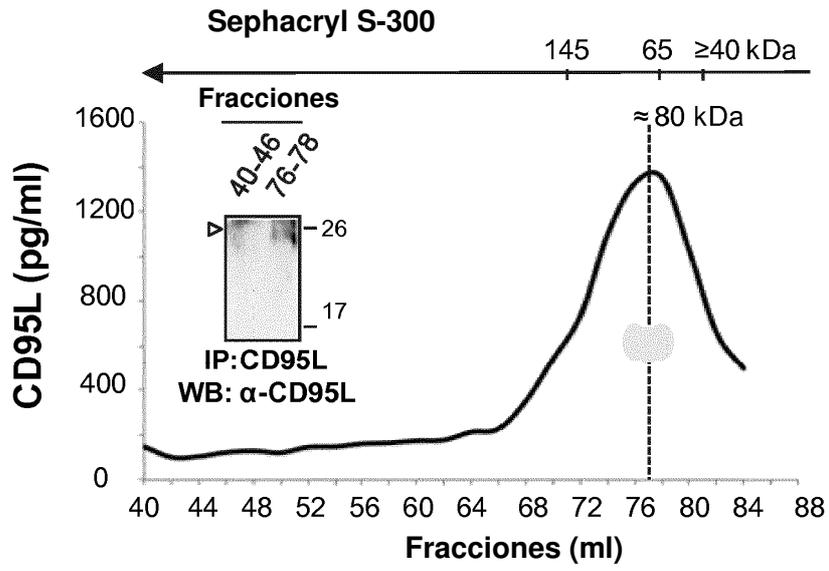


Figura 5B

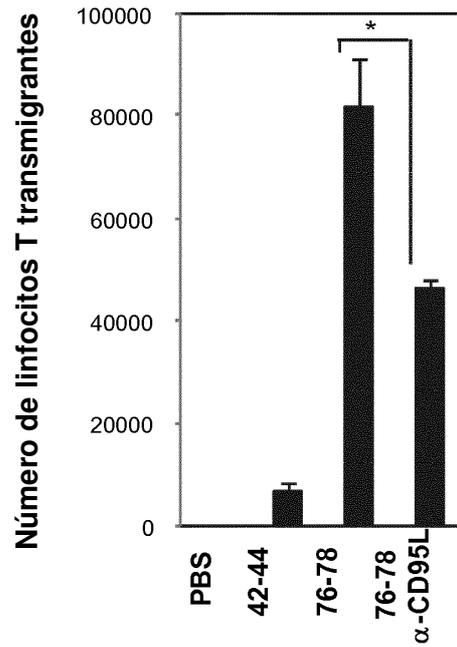


Figura 5C

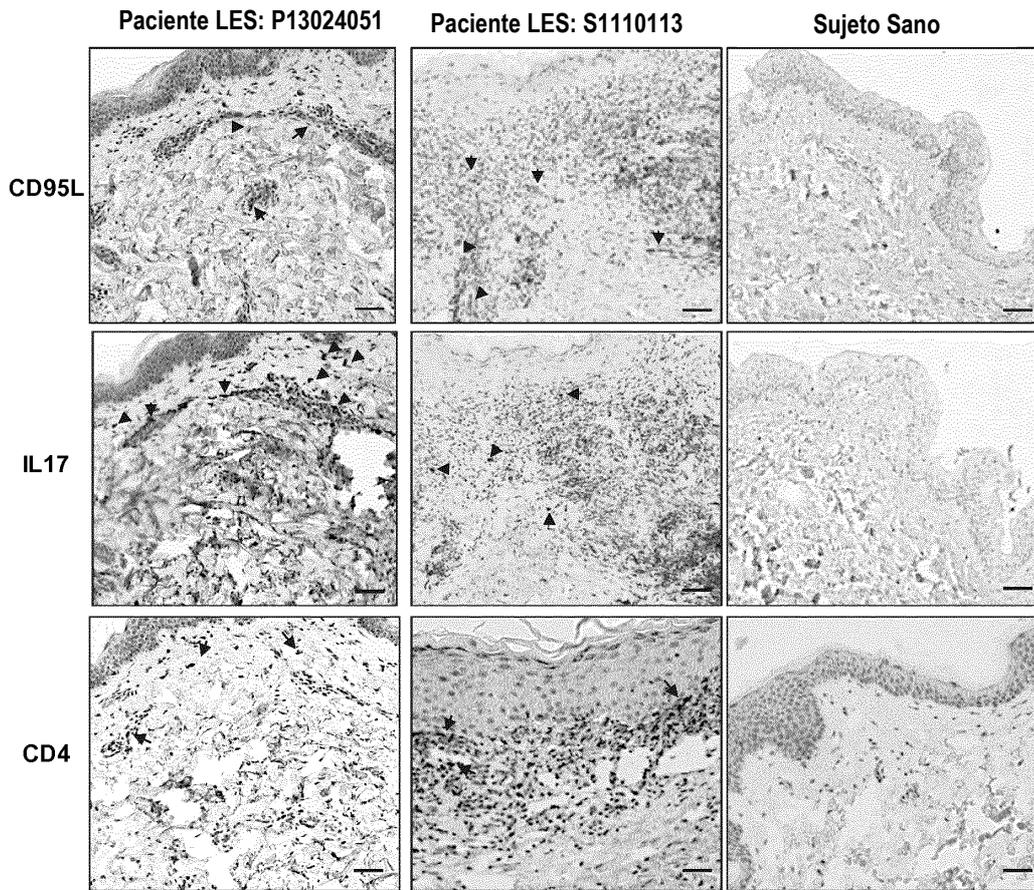


Figura 5D

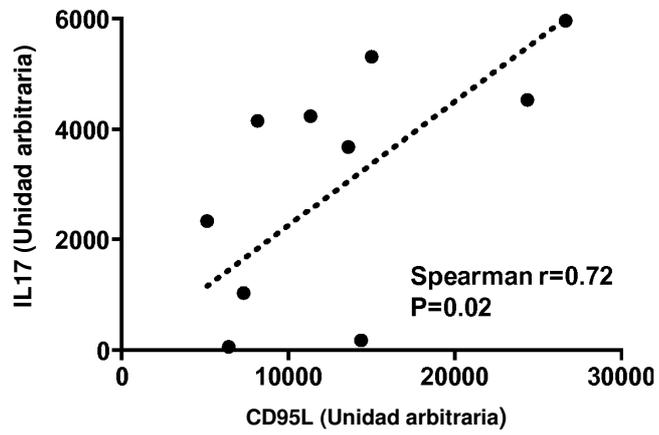


Figura 5E

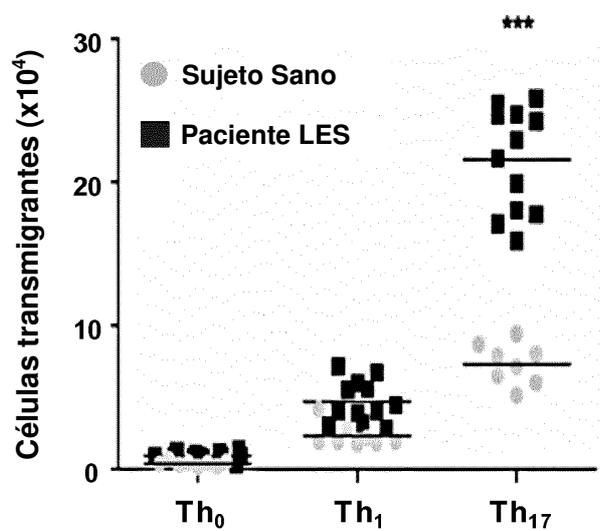


Figura 5F

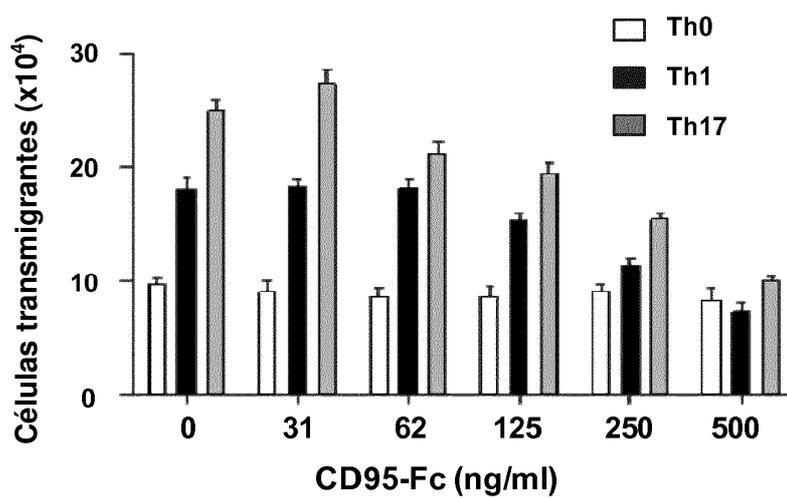


Figura 5G

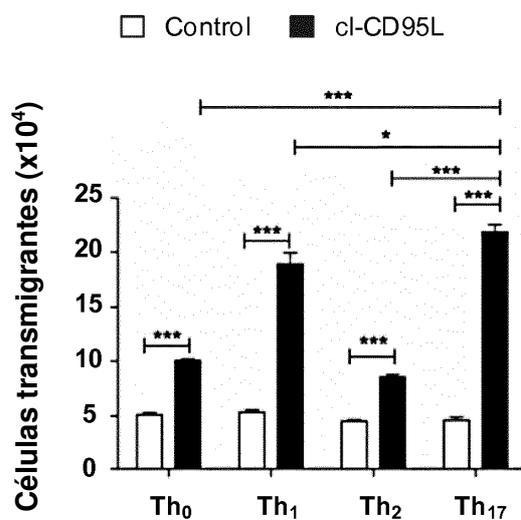


Figura 5H

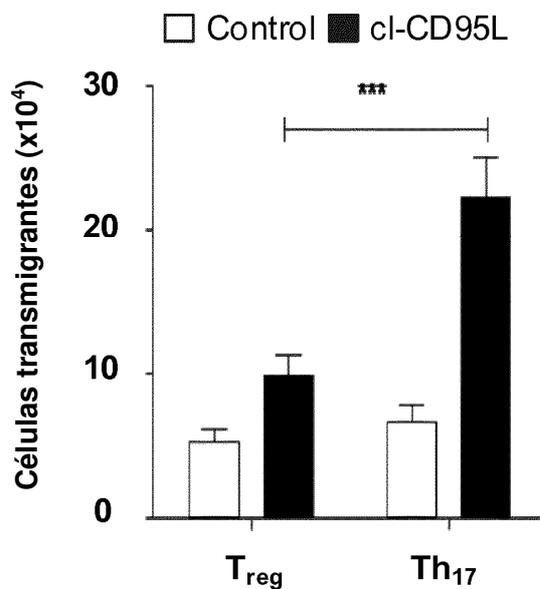


Figura 5I

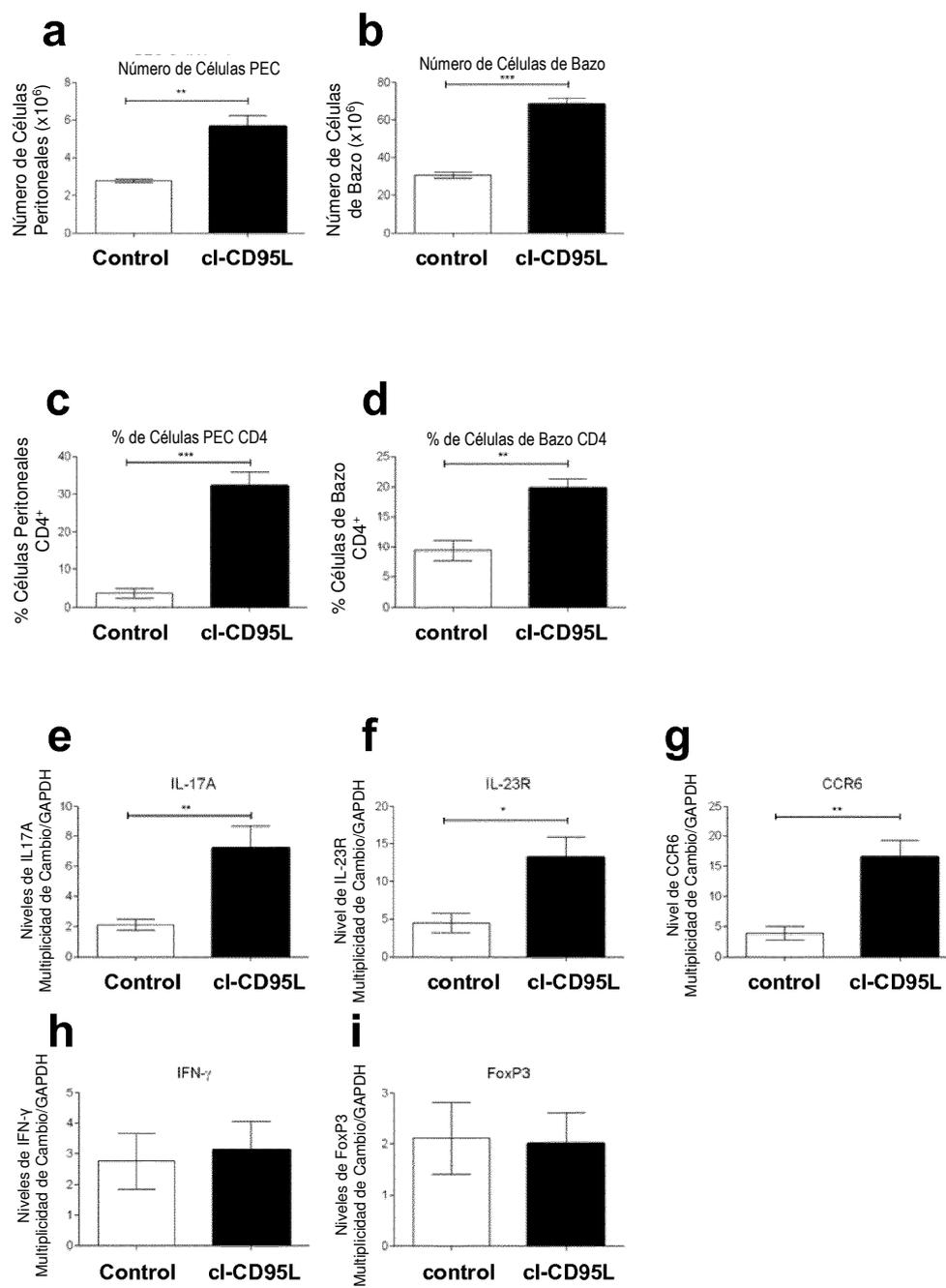


Figura 6

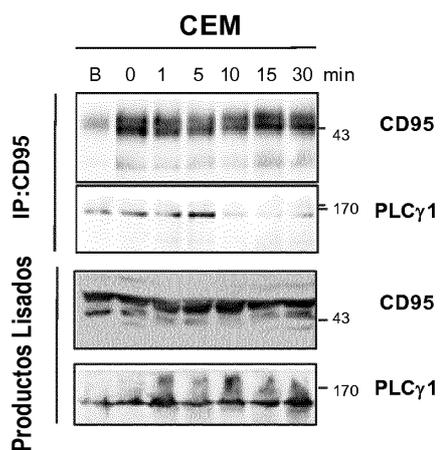


Figura 7A

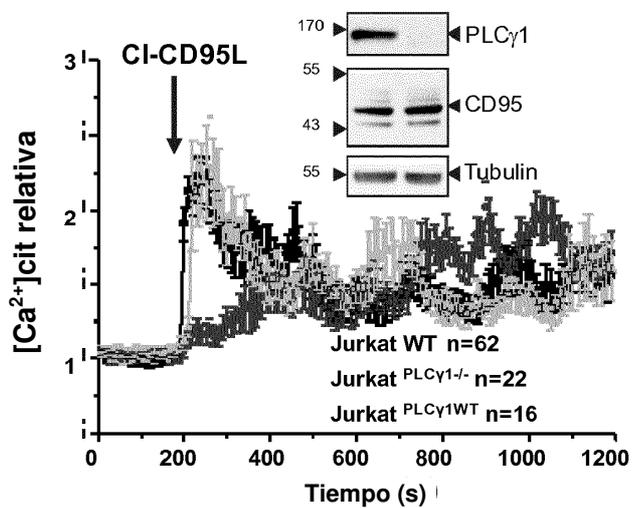


Figura 7B

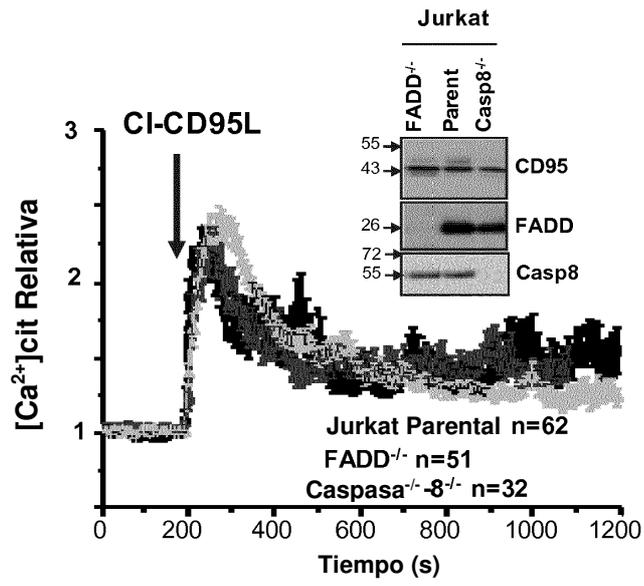


Figura 7C

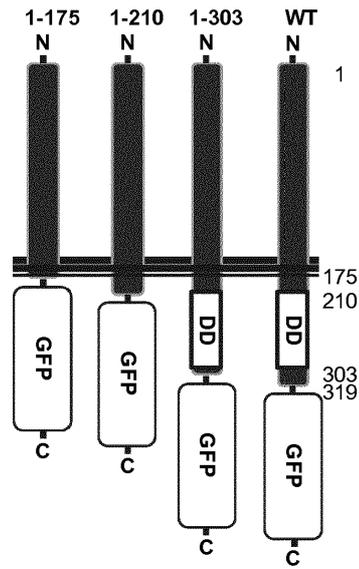


Figura 7D

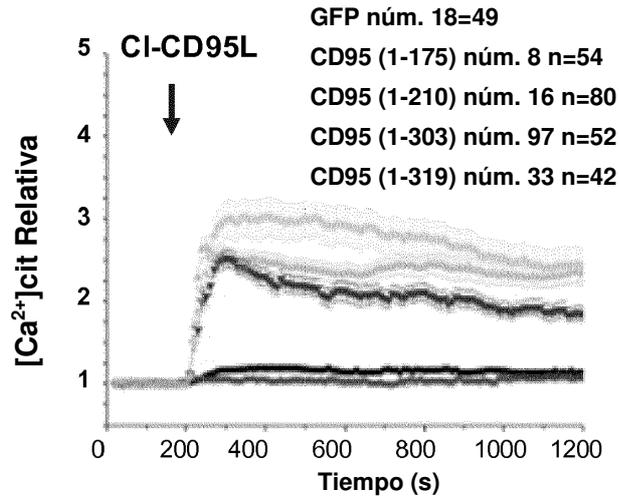


Figura 7E

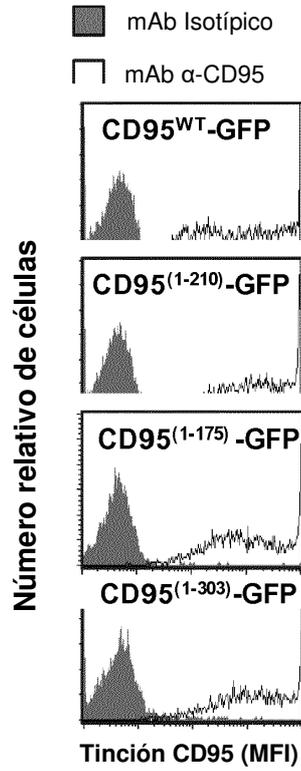


Figura 8A

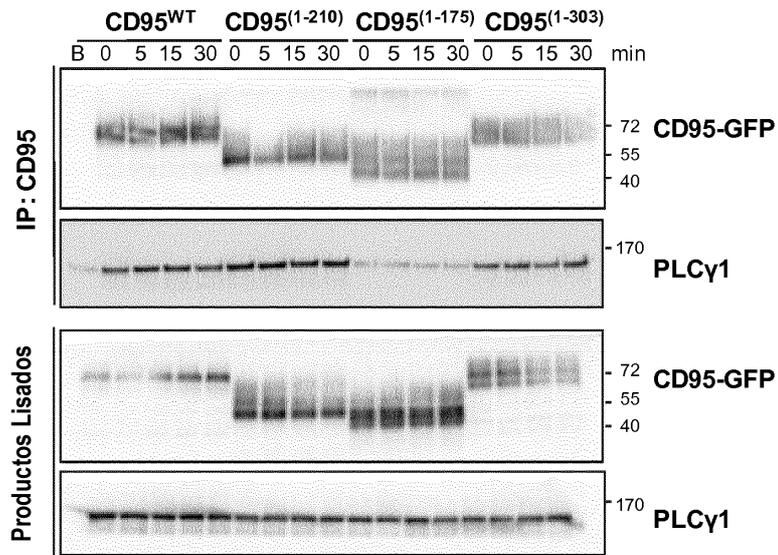


Figura 8B

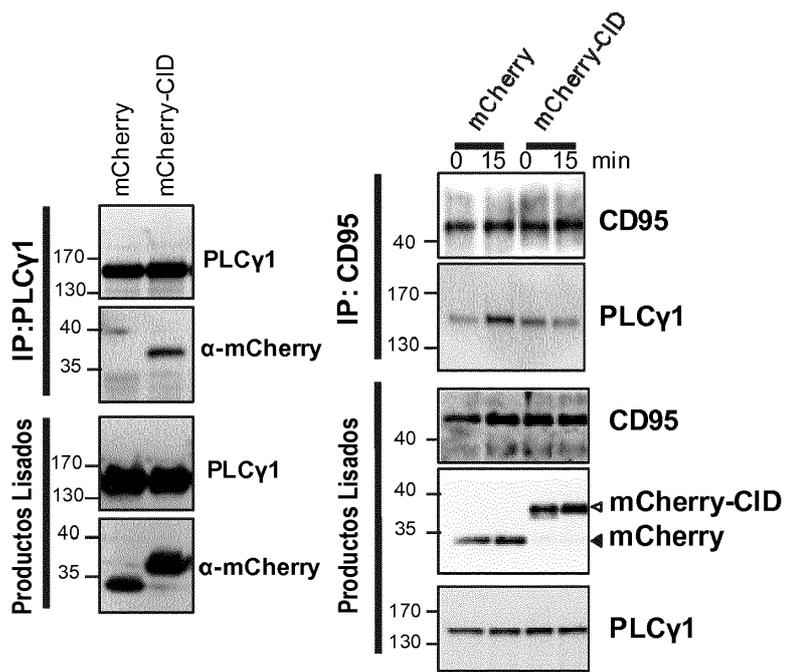


Figura 8C

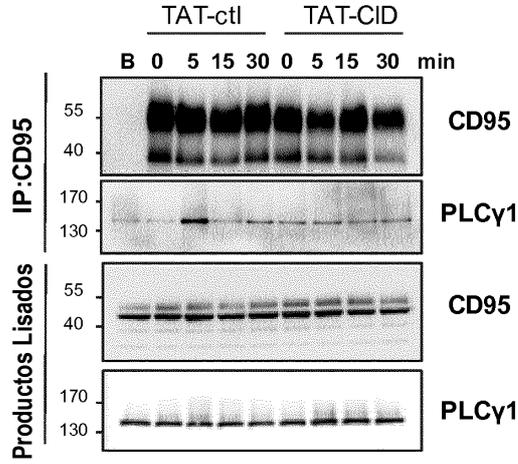


Figura 8D

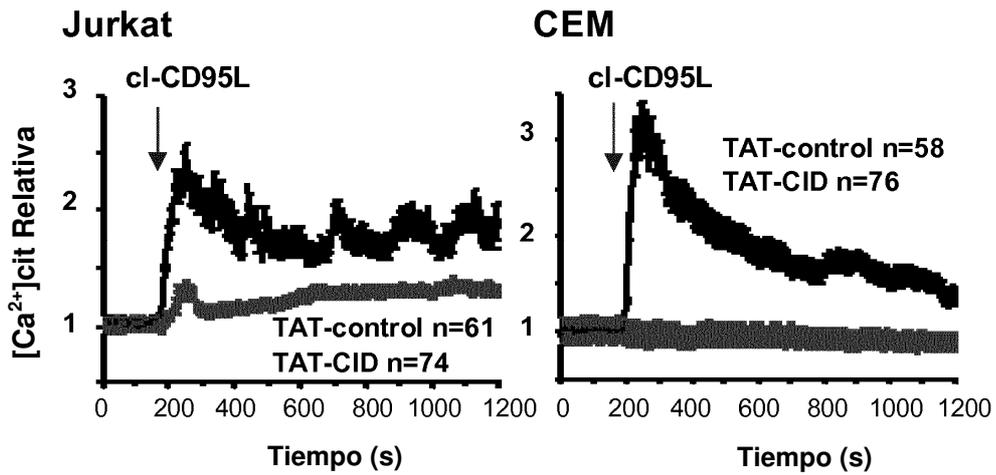


Figura 8E

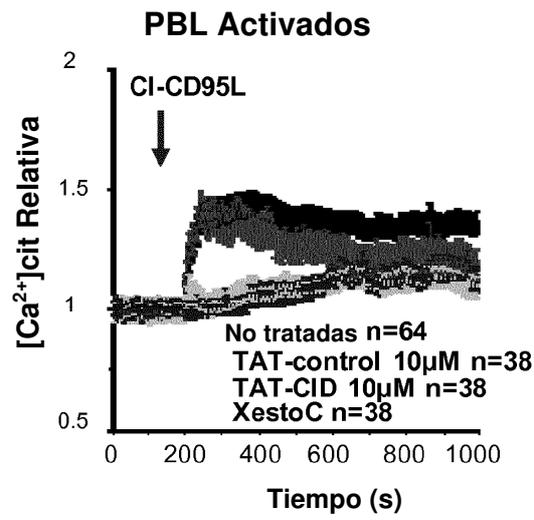


Figura 8F

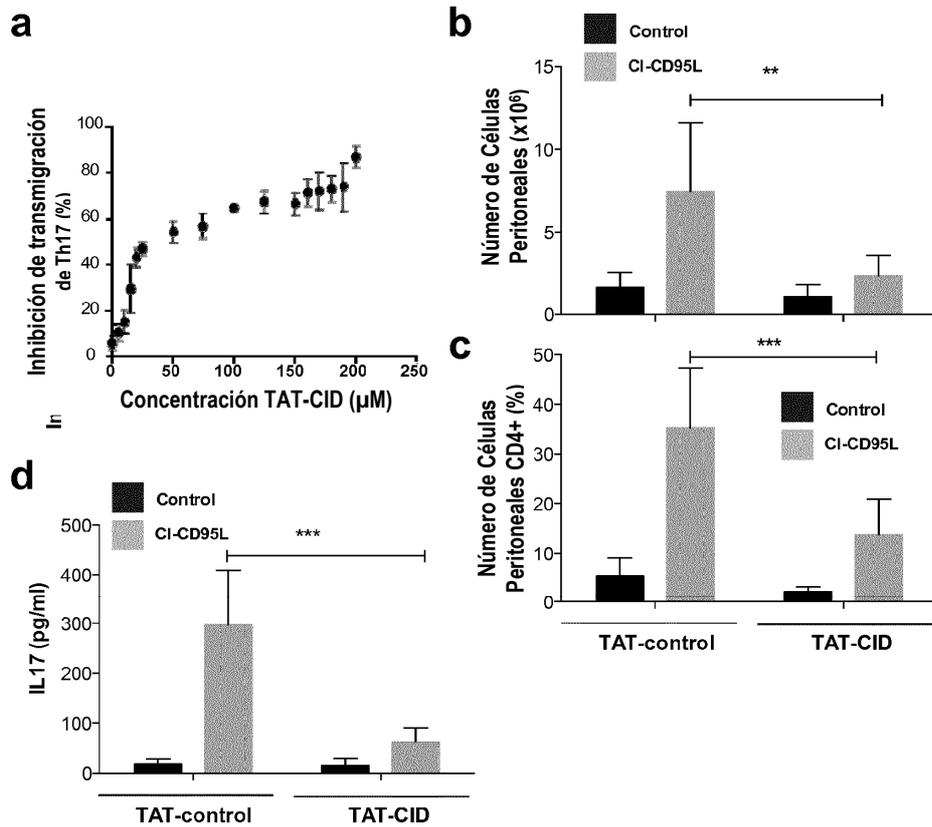


Figura 9