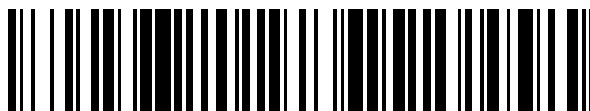


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 551 610**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 9/04 (2006.01)

C12N 9/12 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.06.2012 E 12732785 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.08.2015 EP 2718438**

54 Título: **Moduladores de la glucoquinasa dependiente de ADP (ADPGK) para terapia**

30 Prioridad:

09.06.2011 EP 11004729

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

20.11.2015

73 Titular/es:

**DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM
(100.0%)**

**Im Neuenheimer Feld 280
69120 Heidelberg, DE**

72 Inventor/es:

**KRAMMER, PETER;
KAMINSKI, MARCIN M.;
GÜLOW, KARSTEN y
SAUER, SVEN W.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 551 610 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

Moduladores de la glucoquinasa dependiente de ADP (ADPGK) para terapia

5 La presente invención proporciona un compuesto capaz de modular (a) la actividad biológica de la glucoquinasa dependiente de ADP (ADPGK) o (b) la expresión del gen codificante de AFGK para uso en el tratamiento de un neoplasma, una enfermedad autoinmune o la Enfermedad de Rechazo Inverso (GvHD),

La inhibición de la glicólisis en conexión con el efecto Warburg para el tratamiento del cáncer ha sido descrita por Pelicano, H. et al. (50).

Scatena, R. et al. describen inhibidores de las enzimas glicolíticas para el tratamiento del cáncer en conexión con el efecto Warburg (51).

10 Algunas estrategias terapéuticas posibles para el tratamiento del cáncer y/o enfermedades autoinmunes han sido descritas por Maciver, N.J. et al. (52). Asimismo, en esta referencia se describen un metabolismo modificado de la glucosa, la glicólisis y el efecto Warburg.

15 Krawczyk, C. et al. describen cambios en el metabolismo glicolítico para la regulación de la activación de las células dendríticas (53). Dicho documento se refiere a agonistas del receptor tipo Toll (TLR), describiéndose en particular la proteína AMP.

20 A pesar de enormes inversiones de recursos financieros y humanos, el cáncer sigue siendo una de las causas principales de muerte. Existen muchas opciones de tratamiento para el cáncer, que incluyen: quimioterapia, terapia de radiación, cirugía, terapia con anticuerpos monoclonales y otros métodos. El o los tratamientos que se utilicen dependen del tipo de cáncer, la localización y el grado del tumor, y la fase de la enfermedad, así como del estado general de salud de una persona. La eliminación completa del cáncer sin deterioro del resto del cuerpo es el objetivo del tratamiento para la mayoría de los cánceres. A veces esto puede realizarse por cirugía, pero la tendencia de los cánceres a invadir el tejido adyacente o propagarse a sitios distintos por metástasis microscópica limita a menudo su eficacia. La cirugía requiere a menudo la eliminación de un amplio margen quirúrgico o un margen libre. La amplitud del margen libre depende del tipo de cáncer, el método de eliminación (CCPDMA, cirugía de Mohs, POMA, etc.). El
25 margen puede ser tan pequeño como 1 mm para cáncer de células basales utilizando CCPDMA o cirugía de Mohs, hasta varios centímetros para cánceres agresivos. La eficacia de la quimioterapia se ve limitada a menudo por la toxicidad para otros tejidos del cuerpo. La radiación puede causar también deterioro del tejido normal. Dado que el cáncer es una clase de enfermedades, es improbable que pueda disponerse en algún momento de una sola "curación del cáncer" con mayor probabilidad que exista un tratamiento simple para todas las enfermedades
30 infecciosas. Se pensó tiempo atrás que los inhibidores de la angiogénesis tendrían potencial como tratamiento de tipo "bala de plata" aplicable a muchos tipos de cáncer, pero esto no ha sucedido en la práctica.

35 La inmunoterapia del cáncer se ha descrito también en la técnica para cierto número de métodos, que incluyen intentos precoces de vacunas del cáncer basadas en células constituidas por células tumorales autólogas muertas o lisadas de células tumorales mezclados con adyuvantes, tales como el "bacilo" Calmette Guerin (BCG) y *Corynebacterium parvum*, en un intento de ampliar las respuestas inmunes específicas de tumores. Estrategias inmunoterapéuticas adicionales incluyen terapia génica, administración de inhibidores y activadores de moléculas pequeñas, oligonucleótidos antisentido, vacunas, células autólogas activadas, anticuerpos, así como citocinas y quimiocinas, proteínas naturales o recombinantes, y células autólogas modificadas in vitro.

40 A pesar del largo tiempo que se han investigado estas terapias, persiste la necesidad de estrategias mejoradas para terapia de los tumores, así como la terapia de las enfermedades inmunes.

Por tanto, es el objeto de la presente invención proporcionar un medio seguro y eficaz para dichas terapias.

45 Conforme a la invención, esto se consigue por las materias objeto definidas en las reivindicaciones. La activación por el receptor de las células T (TCR) estimula las células T a proliferación y diferenciación rápidas. En la etapa de inducción de PLC γ 1, la respuesta de TCR se divide en dos caminos. El inositol-3,4,5-trifosfato induce un aumento en la concentración intracelular de Ca $^{2+}$ y activación de factores de transcripción dependientes de Ca $^{2+}$, v.g., NF-AT. El diacilglicerol (DAG) activa las proteínas PKC θ y RasGRP que conducen al disparo de NF- κ B y AP-1. Estos tres factores de transcripción controlan esencialmente la expresión del gen inducido por activación de las células T. Así, el tratamiento simultáneo con el ionóforo Ca $^{2+}$, v.g., ionomicina (Iono), y un mimético de DAG, 12miristato-13-acetato

de forbol (PMA), produce una respuesta de transcripción completa estimulada por activación de las células T. Se ha demostrado que la activación de las células T es paralela a la generación transitoria de niveles bajos, fisiológicamente relevantes de ROS, es decir una señal oxidativa mediada por H_2O_2 , lo que facilita la activación de factores de transcripción dependientes de oxidación, NF- κ B y AP-1 (1,2). La señal oxidativa es indispensable para activación de las células T. Junto con el aflujo de Ca^{2+} , la misma constituye un requerimiento mínimo para la expresión de genes inducida por activación de las células T (v.g. IL-2, IL-4, CD95L). Ninguna señal es suficiente por sí misma (1,3,4).

arias fuentes enzimáticas diferentes, tales como la cadena respiratoria mitocondrial, lipooxigenasas y NADPH-oxidasas, NOX2 y DUOX2, fueron descritas como participantes en la producción de ROS disparada por activación de las células T (1,3,5-8). Un trabajo previo demuestra un papel crucial para las mitocondrias como la fuente de la señal oxidativa. Utilizando una diversidad de métodos experimentales, pudo demostrarse que la activación de PKC θ mediada por signalosomas proximales estimula la producción de ROS por el complejo respiratorio mitocondrial I. Adicionalmente, se demostró que la generación de la señal oxidativa era bloqueada por metformina, un fármaco antidiabético (3).

La expresión de genes inducida por activación de las células T depende de la absorción de glucosa (9,10). Adicionalmente, la activación de las células T va acompañada por un cambio metabólico desde la producción de ATP mitocondrial a la glicólisis aerobia, es decir, el efecto Warburg (11-13), un fenómeno característico también para las células de cáncer de proliferación rápida (11,14). Adicionalmente, las células del cáncer están dotadas a menudo de producción intrínseca alta de ROS y activación constitutiva del camino NF- κ B (15-18). Curiosamente, se demostró que un metabolismo de la glucosa regulado en sentido creciente en condiciones hiperglucémicas e hipóxicas induce liberación de ROS mitocondrial en diferentes sistemas celulares (18-21). Estos descubrimientos demuestran que, después de la activación de las células T, la cadena respiratoria mitocondrial cambia desde una maquinaria productora de ATP a una maquinaria de señalización.

Durante los experimentos que dieron como resultado la presente invención, se estudiaron los cambios metabólicos que acompañan a la generación de la señal oxidativa (es decir que existen en el transcurso de 1 hora después del disparo de TCR o PMA (1,3)) en células proliferantes parcialmente glicolíticas - células T humanas periféricas expandidas *in vitro* (13,22) y células T Jurkat (23). Pudo demostrarse que la activación desencadenada por TCR de la glucoquinasa dependiente de ADP (ADPGK), una enzima glicolítica alternativa, típicamente arqueal, media la generación de la señal oxidativa. El aumento del flujo glicolítico estimulado por ADPGK coincide con la absorción de glucosa inducida por TCR, la regulación decreciente de la respiración mitocondrial y la desviación de la glicólisis hacia la lanzadera mitocondrial glicerol-3-fosfato (GPD), es decir un cambio metabólico de Warburg. La activación de GPD2 asociada a la cadena respiratoria da como resultado la hiper-reducción de ubiquinona y liberación de ROS del complejo mitocondrial I. En paralelo, se alteran la bioenergética mitocondrial y la ultraestructura. Dado que la señal oxidativa estimula la expresión de genes mediada por NF- κ B, la regulación decreciente de ADPGK y GPD2 inhibe la inducción de NF- κ B, mientras que la sobreexpresión de ADPGK potencia la misma. Curiosamente, una expresión mejorada de ADPGK y GPD2 en las células de la leucemia linfocítica crónica (CLL) sugiere una función tumorigena. El nuevo camino de señalización y el metabolismo descritos pueden tener un significado profundo para la tumorigénesis y pueden proporcionar nuevos medios para terapia.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1

(A) Se monitorizó la tasa respiratoria de células T periféricas expandidas *in vitro* después de estimulación con anticuerpo anti-CD3 soluble o PMA. La disminución de la "tasa respiratoria mitocondrial" calculada entre el estado de "control" (15 minutos antes de la inducción) y el estado "estimulado" (intervalos de tiempo indicados); (n = 3) experimentos (es decir, donantes).

(B) Absorción de glucosa D-[3- 3 H] medida en células T 1 hora después de activación (como en A). Los resultados se muestran como [%] del control (GAM - para anti-CD3; sin tratar - para PMA), (n = 8) experimentos +/- SD.

(C) Contenido de ATP intracelular de células T activadas (como en A y B), resultados de (n = 3) experimentos +/- SD.

(D-J) Las células se estimularon durante 1 hora con anticuerpo CD3 fijado a placa (30 pg/ml) o PMA (10 ng/ml). D y

- E**, señal oxidativa inducida por estimulación, medida después de preincubación: (**D**) en tampón HANKS + 110 µg/ml de piruvato + Glc/DOG (30 min) o (**E**) en medio de cultivo + BrPyr (20 min). **F**, se determinó la expresión de IL-2 e IκBα en células T tratadas como en (**E**) - medida representativa por triplicado. **G**, las células se congelaron bruscamente, se permeabilizaron y se midieron las actividades enzimáticas en estado estacionario de los complejos ETC. Los resultados para los experimentos (n = 8, panel superior) o (n = 4, panel inferior) se representan como [%] del control sin tratar (ajustado a 100%, línea de trazos) +/- SD. **H** e **I**, las células se pretrataron (20 min) con BIM. En (**H**) la generación de la señal oxidativa se midió y se muestra la medida +/- SD triplicada representativa. En (**I**) se midieron las actividades enzimáticas en estado estacionario y se presentan como en (**G**). **J**, se midió el flujo de electrones desde complejo I (CI)/complejo II (CII) a complejo III (CIII) en células permeabilizadas o fracciones mitocondriales. Se presentan los datos para (n) experimentos +/- SD (como en **G**). **K**, se separaron los extractos celulares y se analizaron por HPLC. El cambio en el estatus redox de la ubiquinona presentado como [%] de diferencia entre la ratio ubiquinol/-ona de células de control (ajustadas a 0) y células activadas. Los datos se presentan como valor medio +/- SD para (n) experimentos (es decir donantes). Test t de Student: p < 0,001 (***); p < 0,01 (**); p < 0,05 (*).
- 15 **Figura 2: Cambios ultraestructurales rápidos de las mitocondrias después de la activación de las células T**
- (**A-C**) Células T humanas periféricas expandidas *in vitro* se dejaron sin tratar (**A**) o se activaron durante 1 hora (**B**, **C**) con PMA (10 mg/ml) (**B**) o anticuerpo anti-CD3 fijado a placa (30 µg/ml) (**C**). Las células se fijaron, se tiñeron y se sometieron a microscopía electrónica. Se presentan imágenes representativas. Barras de escala: 1 µM (aumento 7000 X) o 200 nM (aumento 50.000 X).
- 20 **Figura 3: La activación de las células T desvía el flujo glicolítico hacia la lanzadera mitocondrial GPD**
- (**A**) Camino glicolítico (las flechas de bloque indican el flujo metabólico desviado). Se estimularon durante 1 hora células T expandidas *in vitro* con anticuerpo CD3 fijado a placa (30 µg/ml) (**B**, **C**, **E**), anticuerpo anti-CD3 reticulado con GAM (10 µg/ml) (**D**, control - GAM solo) o PMA (10 ng/ml) (**E**, **G**).
- (**B**) Estatus de las enzimas glicolíticas después de activación de las células T (acrónimos - véase **A**). Los resultados se muestran como [%] del control sin tratar (ajustado a 100%, línea de trazos); (n = 3) experimentos (es decir donantes) +/- SD.
- (**C**) Flujo metabólico de fructosa-6-fosfato (F6P) hacia GPD1/GAPDH medido en el citosol de células T activadas. Activación y presentación de los datos como en (**B**).
- (**D**) Cambio de la concentración de lactato después de activación de células T expandidas; (n) experimentos +/- SD.
- (**E**) Cambio de la actividad de GPD2 en fracciones mitocondriales de células T activadas +/- pre-tratamiento con BIM, representado como [%] del control no estimulado; (n) experimentos (es decir donantes) +/- SD.
- (**F**) Análisis qRT-PCR en tiempo real (panel izquierdo) y WB (panel derecho) de la silenciamiento de GP2 mediada por siRNA en células Jurkat.
- 35 (**G-I**) La expresión de GPD2 se silenció en células Jurkat (**G**, **I**) o células Jurkat estables del informador NF-κB-luciferasa (**H**). Las células se activaron con PMA (10 ng/ml) +/- Iono (1 µM) y se ensayaron ROS (**G**), la activación de NF-κB (**H**) o la inducción de la expresión de IL-2 (**I**). Los datos se presentan como experimentos representativos o valor medio de (n) experimentos +/- SD. Test t de Student: p < 0,001 (***); p < 0,01 (**); p < 0,05 (*).
- 40 **Figura 4: La activación de las células T dispara la actividad enzimática de ADPGK. Las células se estimularon durante 1 hora con un anticuerpo CD3 fijado a placa (30 µg/ml) (**B-D**) o PMA (10 ng/ml) (**C**, **E**)**
- (**A**) Una disposición experimental para medir la actividad de hexoquinasa (HK) acoplada a la respiración en mitocondrias de células T expandidas (fracción "rica en g").
- (**B**) Resultados del experimento representado en (**A**); CCCP (0,125 µM), NaCN (10 mM).
- (**C**) Panel izquierdo, actividad de ADPGK medida en las mitocondrias (fracción "rica en g") de células T activadas o células Jurkat +/-pretratamiento con BIM (20 min). Los resultados para (n) experimentos (es decir donantes) se

muestran como [%] del control sin tratar +/- SD. Panel derecho, WB de ADPGK humana en los lisados totales de células T humanas expandidas o células Jurkat.

(D) Análisis WB de fracciones mitocondrial ("rica en g") y citosólica de células T expandidas activadas.

5 (E) Expresión del constructo FLAG-ADPGK en células Jurkat (F-ADPGK Jurkat, EV Jurkat - células de control de vector vacío). Panel izquierdo, WB (flechas - proteínas F-ADPGK y ADPGK) y qRT-PCR en tiempo real del contenido y la expresión de (F-) ADPGK. Panel derecho superior, un constructo retroviral. Panel derecho inferior, actividad de ADPGK en fracciones "enriquecidas en ER" de células activadas F-ADPGK y EV Jurkat. Se presenta un experimento representativo triplicado +/- SD como en C (actividad para muestras de células Jurkat EV sin tratar ajustada a 0).

10 (F) Panel superior, WB de F-ADPGK inmunoprecipitada (IP; flechas: proteínas F-ADPGK y ADPGK; FLAG WB - anticuerpos anti-FLAG de conejo; ADPGK WB - anticuerpos de ratón, banda superior en ADPGK WB en la cadena H del anticuerpo anti-FLAG de ratón (M2) del linaje de "lavado" de EV Jurkat). Panel inferior, actividad de ADPGK en los inmunoprecipitados ("eluido"). Test t de Student: $p < 0,001$ (***) ; $p < 0,01$ (**).

15 Figura 5: El contenido reducido de ADPGK inhibe la generación de señal oxidativa inducida por activación y la respuesta de NF- κ B

(A) Las células Jurkat se transfectaron con siRNA, y se analizaron la expresión y el contenido de ADPGK por qRT-PCR en tiempo real y WB.

20 (B-D) Después de silenciamiento de ADPGK, células Jurkat (B, D) o células Jurkat estables del informador de NF- κ B-luciferasa (C), activaron con PMA (10 ng/ml) +/- Iono (1 μ M) y se analizaron la generación de la señal oxidativa (B), activación de NF- κ B (C), o inducción de la expresión de IL-2 (D). Se presentan experimentos representativas realizados por triplicado (C y D, panel superior) o comparación inter-experimental (B y D, panel inferior).

(E) Niveles de proteína ADPGK en células T humanas "en reposo" y expandidas *in vitro* ("pre-activadas").

25 (F) Cambio de actividad de ASDPGK y GPD2 en fracciones mitocondriales "ricas en g" de células T humanas "en reposo" estimuladas durante 1 hora con anticuerpos anti-CD3 unidos a placa (30 μ g/ml). Se muestran los resultados para (n) experimentos (es decir donantes) como [%] de los controles no estimulados +/- SD.

(G) Panel izquierdo, un análisis qRT-PCR en tiempo real de la silenciamiento mediado por siRNA de la expresión de ADPGK en células T "en reposo". Panel derecho, después de la silenciamiento de ADPGK, las células T se estimularon con PMA (10 ng/ml) durante 1 hora y se midió la generación de la señal oxidativa (n = 3 experimentos). Test t de Student: $p < 0,001$ (***) ; $p < 0,01$ (**); $p < 0,05$ (*).

30 Figura 6

35 (A-C) Células Jurkat que expresaban establemente la proteína FLAG-ADPGK (F-ADPGK) (A, C) o células Jurkat (C) y células Jurkat del informador de NF- κ B-luciferasa (B) que sobre-expresaban transitoriamente la proteína WT-ADPGK durante 24 horas (B, C) se activaron con PMA (10 ng/ml) +/- Iono (10 μ M) durante 1 hora (A, C) o 6 horas (B). Después de ello, se analizaron (A) la señal oxidativa, (B) la activación de NF- κ B, (C) la inducción de la expresión de IL-2, IL-8 o I κ B α . Se presenta la comparación estadística de (n) experimentos triplicados (respuesta de las células de control EV ajustada a 100). (B, análisis WB de la sobreexpresión transitoria de WT-ADPGK.

(D) Se midieron las actividades enzimáticas específicas de ADPGK y HK en fracciones mitocondriales "ricas en g" de células T humanas expandidas a 25°C, 30°C, 35°C y 42°C. La actividad de ADPGK a 25°C se ajustó a 100%.

40 (E) La expresión de los genes ADPGK y GPD2 en células B normales (n = 9) y células CLL (n = 10) se analizó por qRT-PCR en tiempo real. Los valores de los niveles de "expresión relativa del gen" (normalizados a transcritos de actina) de dos reservas experimentales se presentan como "registros z". Test t de Student: $p < 0,001$ (***) ; $p < 0,01$ (**); $p < 0,05$ (*), los valores "aberrantes" se marcan con círculos. (F) esquema del camino descrito. Flechas de bloque: cambios en actividad enzimática, transporte (glucosa), contenido de ubiquinol o dirección del flujo metabólico desviado.

45 Figura 7:

(A) Tasa de consumo de oxígeno mitocondrial representada como ΔCO_2 [ml O_2 /l] de células T periféricas humanas expandidas *in vitro* antes y después de la activación. Flechas - estimulación con anticuerpos anti-CD3 soluble (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ + 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ GAM) o PMA (10 ng/ml). Se muestran registros representativos para tres experimentos independientes.

5 (B y C) Se tiñeron células T Jurkat o células T humanas primarias con $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ y se trataron con glucosa (Glc), 2-desoxi-glucosa (DOG) o 3-bromopiruvato (BrPyr) y se activaron luego como se describe en la Figura 1D y E. B, el estatus oxidativo intracelular se estimó por intensidad de tinción (unidades MFI relativas). C, señal oxidativa anti-CD3 medida como en la Figura 1E. D, las células se trataron y se estimularon como en la Figura 1F y la expresión del gen IL-4 se ensayó por qRT-PCR en tiempo real.

10 Figura 8

(A) Las células T periféricas humanas expandidas *in vitro* se estimularon con anticuerpo anti-CD3 fijado a placa (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante los periodos de tiempo indicados. A continuación, el contenido intracelular de los componentes seleccionados de la cadena respiratoria se analizó por WB.

15 (B) Panel izquierdo, fracciones mitocondriales de células T tratadas con anti-CD3 (como en A; dos donantes) se solubilizaron en tampón que contenía 0,01% de digitonina y se resolvieron por BN-PAGE. Líneas rectas - influencia de la digitonina sobre el comportamiento migratorio del complejo III (complejo DC1). Recuadro de guiones - codos para el complejo III/GPD2. Panel derecho, marcador de masa molecular y análisis WB del gel BN-PAGE para GPD2.

Figura 9

20 (A) Células T periféricas humanas expandidas *in vitro* se tiñeron con $\text{H}_2\text{DCF-DA}$, se pretrataron durante 15 minutos con el inhibidor respectivo y se estimularon con anticuerpo anti-CD3 fijado a placa (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) o PMA (10 ng/ml) durante 1 hora. A continuación, se midió la generación de la señal oxidativa por FACS.

(B) Actividad específica de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial en mitocondrias aisladas a partir de células T periféricas humanas expandidas *in vitro* o tejido muscular de corazón de ratón.

Figura 10

25 (A y B) las células T humanas expandidas *in vitro* se pretrataron con bis-indolil-maleimidato I (BIM) durante 20 minutos y se estimularon con anticuerpos anti-CD3 unidos a placa (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 1 hora. Las fracciones mitocondriales "ricas en g" se evaluaron respecto al contenido de HK1 y HK2 (A) o LA actividad de HK (B). En A, las flechas indican bandas WB para anticuerpos anti-HK2. En B, se muestran los resultados para (n) experimentos independientes (es decir donantes) como [%] del control sin tratar (ajustado a 100%, línea de trazos) +/- SD inter-experimental, test t p > 0,05 (no significativo).

30 Figura 11

Células T Jurkat que expresaban de manera estable la proteína FLAG-ADPGK (F-ADPGK) y (B) células T humanas periféricas expandidas *in vitro* (anticuerpo anti-CD3 fijado a placa estimulado +/-, 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) se sometieron a fraccionamiento sub-celular en fracciones citosólicas, "enriquecidas en mitocondrias" y "enriquecidas en ER". Los contenidos de ADPGK se analizaron por WB; MnSOD - marcador mitocondrial, calreticulina - marcador ER soluble, ZnCuSOD - marcador citoplásmico. B, banda superior en ADPGK WB - cadena H de anticuerpo anti-CD3 de ratón utilizado para estimulación.

Figura 12:

40 Células T Jurkat después de regulación decreciente mediada por siRNA de la expresión de ADPGK (72 horas después de la transfección) se estimularon durante 1 hora con PMA (10 ng/ml) y ionomicina (Iono, 1 μM). La inducción de la expresión de los genes IL-8 e I κ B α (normalizada para transcritos de actina) se analizó por qRT-PCR en tiempo real.

Figura 13:

Niveles de expresión de los genes basales IL-2, I κ B α e IL-8 en células Jurkat no estimuladas que expresan de

manera estable la proteína FLAG-ADPGK (F-ADPGK) o que sobre-expresan transitoriamente la proteína WT ADPGK (WT-ADPGK, 24 horas después de la transcripción). Los niveles de transcrito se normalizaron para expresión de actina y se compararon con los niveles de expresión de células de control de vector vacío (EV) respectivas (ajustado a 1, línea de trazos). Se muestran los resultados para (n) experimentos independientes +/-SD inter-experimental.

Figura 14: Comparación de las secuencias de aminoácidos (aa) y estructuras secundarias de proteínas ADPGK de *Homo sapiens* y *Pyrococcus horikoshii* OT3

Para *H. sapiens* - Predicción de la estructura secundaria por Jpred v.3 (14) (UniProtKB, secuencia canónica Q9BRR6-1), para *P. horikoshii* - motivos de estructura secundaria basados en la estructura cristalina (código del Bancos de Datos de Proteínas: 1L2L) (15) comunes para estructuras cristalinas conocidas de proteínas termófilas ADPGK (16). Cuadrados grises - aas homólogos; cuadrados vacíos - aas similares; motivos NXXD y GXGD - centro activo conservado; recuadro - péptido señal predicho.

Así, la presente invención se refiere a un compuesto capaz de reducir o inhibir (a) la actividad biológica de glucoquinasa dependiente de ADP (ADPGK) o (b) la expresión del gen codificante de ADPGK para uso en un método de tratamiento de un neoplasma, una enfermedad autoinmune o la enfermedad de rechazo inverso (GvHD).

La reducción o inhibición de la actividad biológica puede efectuarse por interacción directa o fijación de un compuesto a ADPGK o por interacción indirecta, v.g., por interacción con un compuesto que está asociado con la actividad biológica de ADPGK. La reducción o inhibición de la actividad biológica puede conseguirse también por aplicación de formas alteradas, v.g. inactivas de ADPGK preferiblemente en exceso.

Ejemplos de compuestos adecuados que reducen o inhiben la actividad biológica de ADPGK, v.g., moduladores inmunosupresores, o la expresión del gen correspondiente con objeto de conseguir un efecto terapéutico son:

- un oligonucleótido antisentido,
- siRNA que reduce o inhibe la expresión del gen codificante de ADPGK,
- un anticuerpo dirigido contra ADPGK o un fragmento del mismo que tenga la misma especificidad,
- una versión inactiva de ADPGK, o
- un poli(ácido nucleico) que codifica una versión inactiva de ADPGK.

Compuestos adicionales adecuados para los propósitos de la presente invención y métodos para identificar/seleccionar tales compuestos se describen con mayor detalle más adelante.

Preferiblemente, en una composición farmacéutica, compuestos tales como los descritos arriba y más adelante están combinados con un portador farmacéuticamente aceptable. "Farmacéuticamente aceptable" debe entenderse que abarca cualquier portador, que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica del ingrediente activo y que no es tóxico para el paciente al que se administra. Ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Tales portadores pueden formularse por métodos convencionales y el compuesto activo puede administrarse al individuo a una dosis eficaz.

Una "dosis eficaz" se refiere a una cantidad del ingrediente activo que es suficiente para afectar al curso y la gravedad de la enfermedad, v.g., neoplasia, conduciendo a la reducción o remisión de dicha patología. Una "dosis eficaz" útil para tratamiento puede determinarse utilizando métodos conocidos para un experto en la técnica.

La administración de las composiciones adecuadas pueden efectuarse por vías diferentes, v.g. por administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica o intradérmica. La ruta de administración, por supuesto, depende de la clase de terapia y la clase de compuesto contenido en la composición farmacéutica. El régimen de dosificación será determinado por el médico encargado del tratamiento y otros factores clínicos. Como es bien sabido en las técnicas médicas, la dosificación para cualquier patente depende de muchos factores, que incluyen el volumen del paciente, el área de la superficie corporal, la edad, el sexo, el compuesto particular a administrar, el tiempo y la ruta de administración, la clase de terapia, el estado general de salud y otros fármacos

que se administren concurrentemente.

La persona experta en la técnica puede identificar o generar fácilmente compuestos útiles para los tratamientos de la presente invención basándose en el conocimiento de las secuencias de aminoácidos de ADPGK, y las secuencias de nucleótidos de los genes que codifican estas proteínas (ADPGK, secuencia de nucleótidos: NCBI NM_031284.4 (isoforma de 496 aa) + M_031284.2 (isoforma de 497 aa); secuencia de aminoácidos UniProtKB, secuencia canónica Q9BRR6-2 (isoforma de 496 aa) + Q9BRR6-1 (isoforma de 497 aa)).

En una realización adicionalmente preferida de la presente invención, el compuesto útil para reducir o inhibir la expresión del gen codificante de ADPGK es un oligonucleótido antisentido o siRNA específico para dicho gen.

La generación de oligonucleótidos antisentido adecuados incluye determinación de un sitio o sitios en el gen codificante de ADPGK para que ocurra la interacción antisentido de tal modo que resulte el efecto deseado, v.g., inhibición de la expresión de la proteína. Un sitio intragénico preferido es (a) la región que abarca el codón de iniciación o terminación de la traducción del marco de lectura abierto (ORF) del gen o (b) una región del mRNA que es un "bucle" o "protuberancia", es decir no forma parte de una estructura secundaria. Si se han identificado uno o más sitios diana, se seleccionan oligonucleótidos que sean suficientemente complementarios a la diana, es decir, se hibriden suficientemente bien y con suficiente especificidad, para producir el efecto deseado. En el contexto de esta invención, "hibridación" significa unión por enlaces de hidrógeno, que pueden ser enlaces de hidrógeno Watson-Crick, Hoogsteen o Hoogsteen inversos, entre bases complementarias nucleosídicas o nucleotídicas. "Complementario", como se utiliza en esta memoria, alude a la capacidad para apareamiento preciso entre dos nucleótidos. Por ejemplo, si un nucleótido en cierta posición de un oligonucleótido es capaz de formar enlaces de hidrógeno con un nucleótido en la misma posición de una molécula de DNA o RNA, entonces el oligonucleótido y el DNA o RNA se considera que son complementarios uno a otro en dicha posición. El oligonucleótido y el DNA o RNA son complementarios uno a otro cuando un número suficiente de posiciones correspondientes en cada molécula están ocupadas por nucleótidos que pueden formar enlaces de hidrógeno unos con otros. Así, "específicamente hibridable" y "complementario" son términos que se utilizan para indicar un grado suficiente de complementariedad o apareamiento preciso de tal modo que ocurre fijación estable y específica entre el oligonucleótido y la diana de DNA o RNA. En la técnica se entiende que la secuencia de un compuesto antisentido no precisa ser complementaria 100% a la de su ácido nucleico diana para ser específicamente hibridable. Un compuesto antisentido es específicamente hibridable cuando la fijación del compuesto a la molécula diana de DNA o RNA interfiere con la función normal del DNA o RNA diana para causar una pérdida de utilidad, y existe un grado suficiente de complementariedad para evitar la fijación inespecífica del compuesto antisentido a las secuencias distintas de la diana en condiciones en las cuales se desea fijación específica, es decir, en el caso de tratamiento terapéutico.

Una persona experta puede generar compuestos antisentido y siRNAs conforme a la presente invención sobre la base de las secuencias de DNA conocidas para ADPGK.

"Oligonucleótido" se refiere a un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (RNA) o ácido desoxirribonucleico (DNA) o miméticos de los mismos. Este término incluye oligonucleótidos compuestos de nucleobases existentes naturalmente, azúcares y enlaces internucleosídicos covalentes (cadena principal) así como oligonucleótidos que tienen porciones no existentes naturalmente que funcionan de modo análogo. Tales oligonucleótidos modificados o sustituidos se prefieren a menudo a las formas nativas debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, absorción celular mejorada, afinidad mejorada para el ácido nucleico diana y estabilidad incrementada en presencia de nucleasas. Si bien los oligonucleótidos antisentido son una forma preferida del compuesto antisentido, la presente invención comprende otros compuestos antisentido oligómeros, que incluyen, pero sin carácter limitante, miméticos de oligonucleótidos tales como los descritos más adelante. Los compuestos antisentido conforme a la presente invención comprenden desde aproximadamente 8 a aproximadamente 50 nucleobases (es decir desde aproximadamente 8 a aproximadamente 50 nucleósidos enlazados). Compuestos antisentido particularmente preferidos son oligonucleótidos antisentido, y aún más preferiblemente aquéllos que comprenden desde aproximadamente 15 a aproximadamente 25 nucleobases. Los compuestos antisentido incluyen ribozimas, secuencias guía externas (EGS), oligonucleótidos (oligozimas), y otros RNAs catalíticos cortos u oligonucleótidos catalíticos que se hibridan al ácido nucleico diana e inhiben su expresión.

Alternativamente, el compuesto de la invención es un vector que permite transcribir un oligonucleótido antisentido de la invención, v.g., un hospedador mamífero. Preferiblemente, un vector de este tipo es un vector útil para terapia génica. Vectores preferidos útiles para terapia génica son vectores virales, v.g. adenovirus, herpesvirus, vaccinia, o, más preferiblemente, un virus de RNA tal como un retrovirus. Todavía más preferiblemente, el vector retroviral es un

derivado de un retrovirus murino o aviar. Ejemplos de tales vectores retrovirales que pueden utilizarse en la presente invención son: el virus de la leucemia murina de Moloney (MoMuLV), el virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), el virus de tumor mamario murino (MuMTV) y el virus del sarcoma de Rous (RSV). Muy preferiblemente, se emplea un vector retroviral de primate no humano, tal como el virus de la leucemia del mono gibón (GaLV), que proporciona una gama de hospedadores más amplia comparado con los vectores murinos. Dado que los retrovirus recombinantes son defectuosos, se requiere ayuda a fin de producir partículas infecciosas. Dicha ayuda puede proporcionarse, v.g., por utilización de linajes de células adyuvantes que contienen plásmidos que codifican la totalidad de los genes estructurales del retrovirus bajo el control de secuencias reguladoras en la LTR. Linajes adecuados de células adyuvantes son bien conocidos por los expertos en la técnica. Dichos vectores pueden contener adicionalmente un gen que codifique un marcador seleccionable a fin de que puedan identificarse las células transducidas. Además, los vectores retrovirales pueden modificarse de tal modo que se lleguen a ser específicos de la diana. Esto puede conseguirse, v.g., por inserción de un polinucleótido que codifica un azúcar, un glicolípido, o una proteína, preferiblemente un anticuerpo. Los expertos en la técnica conocen métodos adicionales para generación de vectores específicos de la diana. Vectores adecuados adicionales y métodos para terapia génica in vitro o in vivo se describen en la bibliografía y son conocidos por las personas expertas en la técnica; véase, v.g., WO 94/29469 o WO 97/00957.

Para lograr la expresión únicamente en el órgano diana, las secuencias de DNA para transcripción de los oligonucleótidos antisentido pueden enlazarse a un promotor específico de tejido y utilizarse para terapia génica. Tales promotores son bien conocidos por los expertos en la técnica.

En una estructura de oligonucleótido, se hace comúnmente referencia a los grupos fosfato como formadores de la cadena principal internucleosídica del oligonucleótido. El enlace o cadena principal normal de RNA y DNA es un enlace 3' a 5' fosfodiéster. Ejemplos específicos de compuestos antisentido preferidos en la presente invención incluyen oligonucleótidos que contienen cadenas principales modificadas o enlaces internucleosídicos no naturales. Los oligonucleótidos que tienen cadenas principales modificadas incluyen aquéllos que retienen un átomo de fósforo en la cadena principal y aquéllos que no tienen un átomo de fósforo en la cadena principal. Cadenas principales de oligonucleótidos modificados que pueden dar como resultado estabilidad incrementada son conocidas por las personas expertas en la técnica, siendo preferiblemente dicha modificación un enlace fosforotioato.

Un mimético de oligonucleótido preferido es un mimético de oligonucleótido que se ha demostrado tiene propiedades de hibridación excelentes, y se hace referencia al mismo como ácido nucleico peptídico (PNA). En los compuestos PNA, la cadena principal de azúcar de un oligonucleótido está reemplazada con una cadena principal que contiene amida, en particular una cadena principal de aminoetilglicina. Las nucleobases se retienen y están unidas directa o indirectamente a átomos de nitrógeno aza de la porción amida de la cadena principal.

Oligonucleótidos modificados pueden contener también uno o más restos azúcar sustituidos o modificados. Oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-, S-, o N-alquilo; O-, S-, o N-alqueniilo; O-, S- o N-alquinilo; u O-alquil-O-alquilo, en donde el alquilo, alqueniilo y alquinilo pueden ser alquilo C₁ a C₁₀ o alqueniilo y alquinilo C₂ a C₁₀ sustituidos o insustituidos. Un resto azúcar modificado particularmente preferido es un resto azúcar 2'-O-metoxietilo.

Los oligonucleótidos de la invención pueden incluir también modificaciones o sustituciones de nucleobases. Nucleobases modificadas incluyen otras nucleobases sintéticas y naturales tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetil-citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil- y otros alquil-derivados de adenina y guanina, 2-propil y otros alquil-derivados de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, etc., siendo preferidas sustituciones de 5-metilcitosina, dado que se ha demostrado que estas modificaciones aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico.

Otra modificación de los oligonucleótidos de la invención implica enlazar químicamente al oligonucleótido uno o más restos o conjugados que mejoran la actividad, la distribución celular o la absorción celular del oligonucleótido. Tales restos incluyen restos lipídicos tales como un resto colesterol, ácido cólico, un tioéter, un tiocolesterol, una cadena alifática, v.g., residuos dodecanodiol o undecilo, un fosfolípido, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, o ácido adamantano-acético, un resto palmitilo, o un resto octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicoolesterol.

La presente invención incluye también compuestos antisentido que son compuestos quiméricos. Compuestos antisentido "quiméricos" o "quimeras", en el contexto de esta invención, son compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos, que contienen dos o más regiones químicamente distintas, constituida cada una por al menos una

unidad monómera, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto oligonucleotídico. Estos oligonucleótidos contienen típicamente al menos una región en la cual el oligonucleótido está modificado a fin de conferir al oligonucleótido resistencia incrementada a la degradación por las nucleasas, absorción celular incrementada, y/o afinidad de fijación incrementada para el ácido nucleico diana. Una región adicional del oligonucleótido puede servir como sustrato para enzimas capaces de escindir híbridos RNA:DNA o RNA:RNA. A modo de ejemplo, la RNasa H es una endonucleasa celular que escinde la cadena de RNA de un dúplex RNA:DNA. La activación de la RNasa H, por tanto, da como resultado la escisión de la diana RNA, aumentado con ello notablemente la eficiencia de inhibición del oligonucleótido de la expresión génica. Por consiguiente, pueden obtenerse a menudo resultados comparables con oligonucleótidos más cortos cuando se utilizan oligonucleótidos quiméricos, comparados con los desoxioligonucleótidos de fosforotioato que se hibridan a la misma región diana. Compuestos antisentido quiméricos de la invención pueden formarse como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleosidos y/o miméticos de oligonucleótidos como se han descrito arriba. A tales compuestos se ha hecho referencia también en la técnica como híbridos o gápmers.

Conforme a la presente invención, el compuesto de la presente invención se utiliza para el tratamiento de (i) un neoplasma o (b) una enfermedad autoinmune, o la enfermedad de rechazo inverso (GvHD).

"Neoplasma" es una masa anormal de tejido como resultado de una neoplasia. "Neoplasia" es la proliferación anormal de las células. El crecimiento de las células excede y está descoordinado con respecto a los tejidos normales que se encuentran a su alrededor. El crecimiento persiste de la misma manera excesiva, incluso después de cesación de los estímulos. El mismo causa usualmente un bulto o un tumor. Los neoplasmas pueden ser benignos, pre-malignos (carcinoma-in-situ) o malignos (cáncer). Los neoplasmas a tratar conforme a la presente invención comprenden aquéllos que (sobre)expresan ADPGK. Así, la determinación de ADPGK en un neoplasma es una indicación para el comienzo con una terapia inhibitoria de ADPGK. Un neoplasma a tratar es particularmente leucemia linfocítica crónica de las células B o cualquier neoplasma caracterizado por que la activación de las células T exhibe un efecto beneficioso, es decir, tumores del sistema inmune y tumores caracterizados por activación constitutiva de los niveles de NF-kappaB y/o niveles de ROS incrementados. Ejemplos de tales tumores son Mieloma Múltiple (MM), linfoma de células B grandes difusas, leucemia mielógena aguda (AML), leucemia mielógena crónica (CML), linfoma de las células T adultas (ATL), y leucemia linfoblástica aguda de la infancia/las células T (ALL/T-ALL), linfoma de Hodgkin (HN), linfoma no-Hodgkin, linfoma de Malta, linfoma de las células T cutáneas (CTCL), v.g., Síndrome de Sézary (SS) y Carcinoma Hepatocelular (HCC).

Enfermedades autoinmunes preferidas que pueden tratarse con un compuesto de la presente invención son v.g., reumatismo, lupus eritematoso, psoriasis, dermatitis atópica, esclerosis múltiple, o diabetes.

Ejemplos adicionales de compuestos capaces de reducir o inhibir la actividad biológica de ADPGK son anticuerpos (neutralizantes) dirigidos contra estas proteínas o fragmentos de los mismos que tienen sustancialmente la misma especificidad de fijación, o pseudo-sustratos. El término "anticuerpo", preferiblemente, se refiere a anticuerpos que están constituidos esencialmente por anticuerpos monoclonales agrupados con especificidades epitópicas diferentes, así como preparaciones de anticuerpos monoclonales distintos. Los anticuerpos monoclonales se producen a partir de un antígeno que contiene, v.g., un fragmento de ADPGK por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica (véase, v.g., Köhler et al., Nature 256 (1975), 495). Como se utiliza en esta memoria, el término "anticuerpo" (Ab) o "anticuerpo monoclonal" (Mab) debe entenderse que incluye moléculas intactas así como fragmentos de anticuerpo (tales como, por ejemplo, fragmentos Fab y F(ab')₂) que son capaces de fijarse específicamente a una proteína. Los fragmentos Fab y F(ab')₂ carecen del fragmento Fc del anticuerpo intacto, se aclaran más rápidamente de la circulación, y pueden tener menos fijación a tejidos inespecíficos que un anticuerpo intacto. (Wahl et al., J. Nucl. Med. 24:316-325 (1983)). Por ello, se prefieren estos fragmentos, así como los productos de una biblioteca de expresión de FAB u otra expresión de inmunoglobulinas. Además, los anticuerpos útiles para los propósitos de la presente invención incluyen anticuerpos quiméricos, monocatenarios, y humanizados.

Alternativamente, compuestos preferidos para los propósitos de la invención son versiones inactivas de ADPGK o secuencias de ácido nucleico que codifican versiones inactivas de estas proteínas que pueden introducirse conforme a los métodos/vectores arriba descritos. Tales versiones inactivas pueden generarse conforme a métodos de mutagénesis bien conocidos. Tales compuestos pueden tener un efecto terapéutico en el cuerpo humano por desplazamiento de su contrapartida funcionalmente activa, en particular cuando se aplican en exceso. Análisis de versiones potencialmente inactivas de ADPGK pueden realizarse por ensayo de la transaminación (reversible) de L-aminoácidos de cadena ramificada a alfa-cetoácidos de cadena ramificada, v.g., por determinación de la producción de glutamato. Ensayos adecuados se describen en la bibliografía.

La presente invención se refiere también a un método para identificación de un compuesto capaz de modular la actividad biológica de ADPGK y/o la expresión de ADPGK, que comprende los pasos de:

(a) incubación de un compuesto candidato con un sistema de test que comprende ADPGK o el gen que codifica ADPGK; y

5 (b) ensayo de una actividad biológica de ADPGK;

en donde un aumento o reducción de la actividad biológica de ADPGK, comparada preferiblemente con un sistema de test en ausencia de dicho compuesto de test, es indicativo de la presencia de un compuesto candidato que tiene la propiedad deseada.

10 El aumento o la reducción de la actividad biológica de ADPGK puede ensayarse por determinación de la concentración de la proteína, v.g., por el uso de un anticuerpo específico o por determinación directa de la actividad enzimática de la proteína, v.g., por determinación del cambio de la concentración de un sustrato o producto final específico como se describe, v.g., en el Ejemplo 1.

Ejemplos de tales moléculas candidato incluyen anticuerpos, oligonucleótidos, proteínas, o moléculas pequeñas. Tales moléculas pueden diseñarse racionalmente utilizando técnicas conocidas.

15 Preferiblemente, dicho sistema de test utilizado para cribado comprende sustancias de propiedades químicas y/o físicas similares, siendo muy preferiblemente dichas sustancias casi idénticas. Los compuestos que se pueden preparar e identificar conforme a un uso de la presente invención pueden ser bibliotecas de expresión, v.g., bibliotecas de expresión de cDNA, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, anticuerpos, compuestos orgánicos pequeños, ligandos, hormonas, peptidomiméticos, PNAs o análogos.

20 WO 98/25146 describe métodos adicionales para cribado de bibliotecas de complejos respecto a compuestos que tengan una propiedad deseada, especialmente, la capacidad de agonizar, fijarse a, o antagonizar un polipéptido o su receptor celular. Los complejos en tales bibliotecas comprenden un compuesto objeto de ensayo, una etiqueta que registra al menos un paso en la síntesis del compuesto, y una atadura susceptible de modificación por una molécula informadora. La modificación de la atadura se utiliza para significar que un complejo contiene un compuesto que
25 tiene una propiedad deseada. La etiqueta puede descodificarse para revelar al menos un paso en la síntesis de un compuesto de este tipo. Otros métodos para identificación de compuestos que interaccionan con ADPGK o moléculas de ácido nucleico que codifican tales moléculas son, por ejemplo, el cribado in vitro con el sistema de presentación de fago así como ensayos de fijación en filtro o medida de la interacción en "tiempo real".

30 Es también bien conocido por las personas expertas en la técnica, que es posible diseñar, sintetizar y evaluar miméticos de compuestos orgánicos pequeños que, por ejemplo, pueden actuar como sustrato o ligando para ADPGK.

Todos estos métodos pueden utilizarse conforme a la presente invención para identificar un compuesto que module, v.g., reduzca o inhiba la actividad biológica de ADPGK o su expresión.

35 El gen que codifica ADPGK puede servir también como diana para el cribado de activadores o inhibidores, v.g., moduladores inmunosupresores. Los inhibidores pueden comprender, por ejemplo, proteínas que se fijan al mRNA de los genes que codifican ADPGK, desestabilizando con ello la conformación natural del mRNA y dificultando la transcripción y/o traducción. Adicionalmente, se describen en la bibliografía métodos para identificación de moléculas de ácido nucleico tales como un fragmento de RNA que mimetiza la estructura de una molécula de RNA
40 diana definida o indefinida a la cual se fija un compuesto en el interior de una célula dando como resultado el retardo del crecimiento de la célula o la muerte de la célula; véase, v.g., WO 98/18947 y las referencias citadas en él. Estas moléculas de ácido nucleico pueden utilizarse para identificar compuestos desconocidos de interés farmacéutico, y para identificar dianas de RNA desconocidas para uso en el tratamiento de una enfermedad. Estos métodos y composiciones pueden utilizarse para identificación de compuestos útiles para reducir los niveles de expresión de ADPGK.

45 Los compuestos que pueden testarse e identificarse conforme al método de la invención pueden ser bibliotecas de expresión, v.g., bibliotecas de expresión de cDNA, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, anticuerpos, compuestos orgánicos pequeños, hormonas, peptidomiméticos, PNAs o análogos. Adicionalmente, los genes que codifican un regulador supuesto de ADPGK y/o que ejerce sus efectos aguas arriba o aguas abajo de ADPGK pueden

- identificarse utilizando mutagénesis de inserción empleando, por ejemplo, vectores de direccionamiento de genes conocidos en la técnica. Dichos compuestos pueden ser también derivados funcionales o análogos de inhibidores, sustratos o moduladores conocidos. Tales compuestos útiles pueden ser por ejemplo factores de transacción que se fijan a ADPGK o secuencias reguladoras del gen que codifica la misma. La identificación de factores de transacción puede llevarse a cabo utilizando métodos estándar en la técnica. Para determinar si una proteína se fija a la proteína propiamente dicha o secuencias reguladoras, pueden realizarse análisis estándar de desplazamiento de gel nativo. Con objeto de identificar un factor de transacción que se fija a la proteína o secuencia reguladora, la proteína o secuencia reguladora puede utilizarse como reactivo de afinidad en métodos estándar de purificación de proteínas, o como una sonda para cribado de una biblioteca de expresión. La identificación de moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos que interactúan con ADPGK puede realizarse también, por ejemplo, por el uso del denominado "sistema de dos híbridos" de levadura. En este sistema, se une ADPGK al dominio de fijación del DNA del factor de transcripción GAL4. La cepa de levadura que expresa este polipéptido de fusión y que comprende un gen informador lacZ estimulado por un promotor apropiado, que es reconocido por el factor de transcripción GAL4, se transforma con una biblioteca de cDNAs que expresará proteínas vegetales o péptidos de las mismas fusionados a un dominio de activación. Así, si el péptido codificado por uno de los cDNAs es capaz de interactuar con el péptido de fusión que comprende un péptido de ADPGK, el complejo es capaz de dirigir la expresión del gen informador. De esta manera, ADPGK y el gen codificante de ADPGK pueden utilizarse para identificar péptidos y proteínas que interactúan con ADPGK. Es evidente para las personas expertas en la técnica que este sistema y sistemas similares pueden ser aprovechados luego para la identificación de inhibidores.
- Finalmente, la presente solicitud describe un método de selección de una modalidad de terapia para un paciente afligido con una enfermedad como se ha caracterizado arriba, que comprende
- (a) obtener una muestra de dicho paciente; y
 - (b) determinar el nivel y/o la actividad de ADPGK;

por el cual el modo de tratamiento depende del nivel y/o actividad de ADPGK.

- Preferiblemente, el nivel de ADPGK se determina sobre el nivel de proteínas utilizando un anticuerpo que se fija específicamente a ADPGK o por determinación de una actividad biológica de la proteína.

En el método que se relaciona con la selección de una modalidad de terapia para un paciente, los términos "modalidad de terapia" o "modo de tratamiento" se refieren a una administración secuencial o simultánea en el tiempo de compuestos que tienen un efecto sobre el nivel/actividad de ADPGK, respectivamente, con tal que los resultados del método de la invención indiquen que la enfermedad está asociada con un nivel/actividad aberrante de ADPGK.

Los ejemplos que siguen explican la invención con mayor detalle.

Ejemplo 1

Materiales y Métodos

- (A) Productos químicos

Si no se indica nada en contrario, todos los reactivos y enzimas utilizados fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Munich, Alemania). El diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H₂DCF-DA) se obtuvo de Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). El Iono se adquirió de Merck (Darmstadt, Alemania). Los anticuerpos primarios para la transferencia Western (WB) eran: de Sigma-Aldrich (Munich, Alemania) - anti-FLAG monoclonal de ratón (M2), anti-FLAG policlonal de conejo, anti- γ -tubulina monoclonal de ratón, anti-GPD2 policlonal de conejo (Human Protein Atlas Antibodies); de Cell Signaling (Denvers, MA, USA) - anti-HK1 policlonal de conejo y anti-HK2 policlonal de conejo; de Abcam (Cambridge, Reino Unido) - ADPGK anti-humana monoclonal de ratón (1E4); de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) - anti-SOD1 policlonal de cabra; de Millipore (Darmstadt, Alemania) - anti-SOD2 policlonal de conejo, de ABR (Golden, CO, USA) - anti-calreticulina policlonal de conejo; de GeneTex, Irvine, CA, USA) - anti- β -actina policlonal de conejo, y de Thermo Scientific (Bonn, Alemania) - anticuerpo anti-PHB1 monoclonal de ratón (11-14-10). El contenido de los complejos respiratorios mitocondriales se analizó utilizando Cóctel de Anticuerpos WB OXPHOS Total de Mito Sciences (Eugene, OR, USA). Los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD20 conjugados a FITC eran de Becton Dickinson (Heidelberg, Alemania). El anticuerpo anti-ratón reticulante policlonal de cabra (GAM) se

obtuvo de Southern Biotech (Birmingham, AL, USA). El anticuerpo monoclonal de ratón (OKT3) contra CD3 humano se preparó como se describe (1).

(B) Aislamiento de células T y células B humanas periféricas

5 Generalmente, los linfocitos T de sangre periférica humana se purificaron como se ha descrito anteriormente (1). Los linfocitos B de sangre periférica humana se prepararon a partir del anillo de la interfase en gradiente Ficoll por clasificación MACS negativa ("B Cell Isolation Kit II", Miltenyi, Bergisch Gladbach, Alemania). La homogeneidad de las células T y B preparadas se comprobó por tinción con anticuerpos anti-CD3 o anti-CD20 conjugados con FITC, seguida por análisis FACS, y se estimó que era > 93% (células B) y > 90% (células T).

(C) Pacientes

10 Se obtuvo consentimiento informado de todos los individuos antes de la inclusión. Nueve de diez pacientes no recibieron tratamiento alguno antes de la terapia. Los datos de los pacientes (edad, sexo y análisis genético de muestras CLL) pueden encontrarse en la Tabla 1. Las células B de los pacientes CLL se aislaron por centrifugación Ficoll-Paque (GE Healthcare; Chalfont St. Giles, Reino Unido). Se estimó que la pureza era > 90%. El estudio se condujo conforme a las orientaciones éticas del Centro de Investigación del Cáncer Alemán (DKFZ, Heidelberg) y la
15 Declaración de Helsinki, y fue aprobado por el Comité de Ética II de la Universidad Ruprecht-Karls de Heidelberg, Alemania.

(D) Cultivo de células

20 Las células J16-145 Jurkat del linaje de células T, sub-clon J16 (2) se cultivaron en RPMI1640 (+L-glutamina), suero de ternero fetal al 10% (FCS). Células J16-145 informadoras NF-κB de luciferasa de *Gaussia* se cultivaron en IMDM, 10% FCS. Células T humanas periféricas aisladas recientemente ("en reposo") o activadas con fitohemaglutinina (PHA) y expandidas *in vitro* durante 6-8 días ("pre-activada") se cultivaron a una concentración inicial de 2×10^6 células/ml en RPMI1640 (+L-glutamina), 10% FCS. Para la expansión inducida por pre-activación, las células T "en reposo" se trataron con 1 µg/ml de PHA durante 16 horas, se lavaron y se cultivaron subsiguientemente en presencia de 25 U/ml de IL-2 durante 6-8 días. Se hace referencia a estas células como "células T" en el texto, si no se indica otra cosa.
25

(E) Determinación de la generación de ROS

30 Se tiñeron las células con H₂DCF-DA (5 µM) durante 30 min. A continuación, las células se dividieron y se estimularon durante 1 h con anticuerpo anti-CD3 fijado a placa (30 µg/ml) o PMA (10 ng/ml). El tratamiento se terminó por PBS enfriado en hielo y la generación de ROS se determinó por análisis FACS (Canto II, Becton Dickinson). La generación de ROS se cuantificó como el aumento en intensidad media de fluorescencia (MFI), calculada conforme a la fórmula siguiente: aumento en MFI (%) = $[(MFI_{estimulada} - MFI_{no\ estimulada}) / MFI_{no\ estimulada}] \times 100$ (3).

(F) Células permeabilizadas con digitonina

35 Células T expandidas *in vitro* (al menos $0,5 \times 10^8$) se congelaron bruscamente en nitrógeno líquido y se incubaron subsiguientemente sobre hielo en tampón ETC (Tris-HCl 20 mM de pH 7,4, sacarosa 250 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM) con 0,015% de digitonina durante 30 min conforme a Chretien *et al.* (4) con modificaciones de menor importancia. Después de ello, las células se lavaron dos veces con tampón ETC enfriado en hielo y se sometieron a los ensayos.

(G) Preparación de fracciones sub-celulares

40 Las células se disgregaron utilizando una aguja de 27x1/2" en tampón ETC enfriado en hielo y los homogeneizados se centrifugaron a 600 x g, 4°C durante 10 min. Para preparación de la fracción mitocondrial "rica en g" (sedimento) así como la fracción citosólica (sobrenadante) se centrifugó el sobrenadante de 600 x g a 11.000 x g, 4°C durante 20 min. Para preparación de las fracciones "enriquecidas en mitocondrias", el sobrenadante de 600 x g se centrifugó 10 min, 4°C a 3.500 x g (sedimento). Subsiguientemente, para preparación de la "fracción enriquecida en ER" se
45 centrifugó el sobrenadante de 3.500 x g a 11.000 x g, 4°C durante 20 min. Las mitocondrias musculares de corazón de ratón se prepararon conforme al procedimiento para fracción "enriquecida en mitocondrias" como se describe en (5).

(H) Cadena de transporte de electrones (ETC) y flujo de electrones

La actividad en estado estacionario de complejos enzimáticos ETC se determinó como se describe (5, 6) utilizando un espectrofotómetro ajustable por computadora (Spectramax Plus Microplate Reader, Molecular Devices; Sunny Vale, CA, USA) que operaba en el modo de longitud de onda dual; las muestras se analizaron en placas de 96 pocillos controladas en temperatura en un volumen final de 300 µL. La adición de inhibidores de la cadena respiratoria estándar se utilizó para comprobar la especificidad de los ensayos enzimáticos. Todas las actividades enzimáticas se normalizaron a la concentración de proteína. Para las células T estimuladas, se midieron las actividades enzimáticas de ETC después de congelación brusca y permeabilización con digitonina (como se ha descrito anteriormente). Para estudiar el flujo de electrones del complejo I o complejo II a complejo III, se incubaron células permeabilizadas con digitonina o fracciones mitocondriales con NADH o succinato y se midió la reducción del citocromo c en presencia de NaCN.

(I) Medida de la actividad de las enzimas glicolíticas

Todas las enzimas aplicadas se adquirieron de Sigma-Aldrich y se prepararon a partir de músculo de conejo.

- La actividad de hexoquinasa (HK) se ensayó como reducción de NADP en tampón ETC que contenía 1 mM ATP, 1 mM glucosa, 0,5 mM NADP, 0,05 U/ml de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa.

- La actividad de gliceraldehído-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) se detectó como reducción de NAD en un tampón que contenía 10 mM KPi, 1 mM NAD, 3,3 mM cisteína, 0,2 mM EDTA, 0,2 mM MgCl₂, 1 mM ADP.

- La actividad de glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa (GPD2) se midió como reducción del citocromo c en tampón de ETC que contenía 5 mM glicerol-3-fosfato, 2 mM NaCN, y 60 µM citocromo c.

- La actividad de triosa-fosfato-isomerasa (TPI) se ensayó como oxidación de NADH en tampón de ETC que contenía 0,2 mM NADH, 4,9 mM DL-gliceraldehído-3-fosfato, 0,4 U/ml de α-glicerofosfato-deshidrogenasa (GPD1).

- La actividad de fosfofructoquinasa (PFK) se detectó como oxidación de NADH en tampón ETC que contenía 4 mM fructosa-6-fosfato, 2 mM ATP, 0,5 mM NADH, 0,2 U/ml aldolasa, 0,8 U/ml TPI, 0,1 U/ml GPD1.

- La actividad de piruvato-quinasa (PK) se detectó como oxidación de NADH en tampón ETC que contenía 1 mM fosfoenolpiruvato, 1 mM ADP, 0,5 mM NADH, 2 U/ml LDH.

- La actividad de lactato-deshidrogenasa (LDH) se registró como oxidación de NADH en tampón ETC que contenía 1 mM piruvato, 0,5 mM NADH.

- La reacción directa de enolasa (ENO) se midió como oxidación de NADH en tampón ETC que contenía 1 mM 2-fosfoglicerato, 1 mM ADP, 0,5 mM NADH, 2 U/ml LDH, 2 U/ml PK. La reacción inversa se ensayó en tampón ETC que contenía 1 mM fosfoenolpiruvato, 1 mM ATP, 0,5 mM NADH, 2 U/ml LDH, 2 U/ml PK.

- La actividad de fosfoglicerato-mutasa (PGM) se registró como oxidación de NADH en tampón ETC que contenía 1 mM 2-fosfoglicerato, 1 mM ATP, 1 mM fosfoenolpiruvato, 0,5 mM NADH, 2 U/ml LDH, 2 U/ml PK. La reacción inversa se ensayó en tampón ETC que contenía 1 mM 3-fosfoglicerato, 1 mM ADP, 0,5 mM NADH, 2 U/ml LDH, 2 U/ml PK.

- La reacción inversa de fosfoglicerato-quinasa (PGK) se ensayó en tampón ETC que contenía 1 mM 3-fosfoglicerato, 1 mM ATP, 0,5 mM NADH, 2 U/ml LDH, 2 U/ml PK.

(J) Flujo de fructosa-6-fosfato

El flujo de fructosa-3-fosfato por el camino GPD se midió como oxidación de NADH en tampón ETC que contenía 1 mM fructosa-6-fosfato, 1 mM ATP, 0,5 mM NADH, 0,1 U/ml GPD1. El flujo a través de la rama GAPDH se registró en tampón ETC que contenía 1 mM KPi, 1 mM fructosa-6-fosfato, 1 mM ATP, 0,5 mM NAD y 0,1 U/ml de GAPDH.

(K) Absorción de glucosa

Después del tratamiento, las células (1-2 x 10⁷ células) se lavaron y se suspendieron en tampón Krebs-Ringer. Subsiguientemente, se incubaron las células con 1 µCi/ml de D-[3-³H]-glucosa durante 10 min a 37°C. Después de

ello, las células se lavaron dos veces con tampón Krebs-Ringer enfriado en hielo y se detectó la D-[3-³H]-glucosa intracelular utilizando un contador de centelleo (LS 6500 Liquid Scintillation Counter Beckman Coulter; Brea, CA, USA).

(L) Electrodo de oxígeno

- 5 La tasa respiratoria mitocondrial se midió conforme a un protocolo descrito previamente (7) utilizando el sistema de oxígrafo Oroboros 1 de alta resolución soportado por computadora (Para, Graz, Austria). Células T expandidas *in vitro* (5-10 x 10⁷ células) se pusieron en la cámara de cada electrodo y se activaron con anticuerpo anti-CD3 soluble (10 µg/ml, reticulado con GAM, 2 µg/ml) o PMA (10 ng/ml). La disposición experimental era como se ha descrito previamente (8). La "tasa respiratoria mitocondrial" se calculó sustrayendo la "tasa de consumo de oxígeno de fondo" (registrada con un electrodo de referencia en presencia de 5 µM oligomicina) de la "tasa de consumo total de oxígeno" (como se describe en (8)).
- 10

(M) Cuantificación de lactato

- Al menos 2 x 10⁷ células T expandidas se suspendieron en medio RPMI 1640 reciente (+ suplementos e IL-2), y se activaron luego con anticuerpo anti-CD3 soluble (10 µg/ml) reticulado con GAM (2 µg/ml) durante 1 hora. Las concentraciones de lactato en el medio se detectaron utilizando un sistema Olympus AU400 (Olympus, Tokyo, Japón) y se normalizaron a la concentración de proteínas de los lisados de células respectivos.
- 15

(N) Ensayo de actividad de glucoquinasa dependiente de ADP (ADPGK)

- La actividad de ADPGK se ensayó como reducción de NADP en tampón ETC que contenía 1 mM ADP, 1 mM glucosa, 0,5 mM NADP, 5 µM diadenosina-pentafosfato, y 0,05 U/ml glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa a pH 6,0 y 37°C o 42°C. El ensayo estaba basado esencialmente en el descrito previamente para la proteína ADPGK recombinante de ratón (9).
- 20

(O) Ensayo de actividad de adenilato-quinasa (AK)

La actividad de AK se ensayó como reducción de NADP en tampón ETC que contenía 1 mM ADP, 1 mM glucosa, 0,5 mM NADP, 1 U/ml HK y 0,05 U/ml glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa a pH 7,5 y 37°C.

- 25 (P) Determinación del contenido de ATP

La concentración de ATP se determinó utilizando un ensayo "CellTiter Glo" (Promega) conforme a las instrucciones del fabricante y un luminómetro de 96 pocillos (Orion L, Berthold; Bad Wildbad, Alemania). Los resultados se normalizaron a la concentración de proteínas.

(Q) Determinación del contenido de ubiquinol/ubiquinona

- 30 Al menos 5 x 10⁷ células T humanas expandidas *in vitro* se trataron con anticuerpo anti-CD3 fijado a placa (30 µg/ml) o PMA (10 ng/ml) durante 1 hora. Las células se lavaron, se redujeron a un sedimento, se congelaron bruscamente en nitrógeno líquido y se pusieron en hielo seco. La extracción de ubiquinol/ona se realizó por adición de 300 µl de hexano:isopropanol (2:1) enfriado en hielo y centrifugación subsiguiente (15.000 g) durante 5 min a 0°C. A continuación, se inyectaron inmediatamente 150 µl del sobrenadante y se separaron por RP-HPLC. Las condiciones de separación e identificación por HPLC estaban basadas en métodos publicados previamente (10, 11). Sistema de cromatografía aplicado: bomba de gradiente de baja presión LaChrom LC-7100 con válvulas de dosificación, columna L-7350 termostaticada con módulo de refrigeración L-7350/L-7351 Peltier, detector de red de diodos L-7450A UV/VIS-DAD (Merck Hitachi; Darmstadt, Alemania), detector amperométrico pulsado (PAD) 817 Bioscan (Metrohm; Herisau, Suiza), columna LiChrospher RP18e 125x4 mm (Merck; Darmstadt, Alemania), desgasificador de 4 canales (Knauer; Berlín, Alemania), elución isocrática con metanol:hexano:isopropanol:ácido acético (83:27,5:1,5:1,5 v/v + acetato de sodio 4,2 g/l; pH = 6), caudal - 1 ml/min, temperatura 25°C. La identificación estaba basada en los espectros de absorción UV/VIS-DAD y se facilitaba por la respuesta redox detectada con detector voltamperométrico. La cuantificación se realizó basándose en cromatogramas UV-VIS a longitudes de onda: 275 nm (ubiquinona) y 289 nm (ubiquinol). Los resultados cualitativos y cuantitativos seleccionados del análisis UV-VIS-DAD se confirmaron por HPLC-MS/ESI (Agilent; Santa Clara, CA, USA).
- 35
- 40
- 45

(R) Ensayo del informador de luciferasa para activación de NF-κB

Las células T Jurkat J16-145 transfectadas de manera estable con el informador NF-κB basado en luciferasa de *Gaussia* fueron proporcionadas amablemente por Dr. Marcus Brechman y Dr. Rüdiger Arnold. Resumidamente, después de intercambiar el medio, las células se indujeron con Iono (10 μM) y/o PMA (10 ng/ml) durante 6 horas por triplicado para cada condición experimental. Se aplicaron 20 μl del medio recogido para lectura de luminiscencia utilizando "Jugo *Gaussia*" (P.J.K.; Kleinblittersdorf, Alemania) y un luminómetro de placa de 96 pocillos (Orion L; Berthold, Bad Wildbad, Alemania). La señal de luminiscencia se normalizó al número de células vivas evaluado por el método de exclusión con Azul Tripán.

(S) Inmunoprecipitación y WB

Al menos 8×10^7 células T Jurkat F-ADPGK o EV se lisaron en un tampón que contenía 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, 0,5% Triton X-100 durante 45 min a 4°C. Los lisados se centrifugaron a 11.000 g, 4°C durante 10 min. Los sobrenadantes se aplicaron sobre glóbulos de agarosa reticulados covalentemente con anticuerpos anti-FLAG M2 (ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel, Sigma). Los pasos de lavado y elución con el péptido FLAG se realizaron conforme al protocolo del fabricante. Los productos eluidos se sometieron directamente al ensayo de actividad de ADPGK o se congelaron y se analizaron por WB (3).

15 (T) Experimentos de sobreexpresión de ADPGK

Para expresión transitoria de WT-ADPGK se utilizaron la secuencia de cDNA de la variante 1 de un transcrito de ADPGK humana (UniProtKB, secuencia canónica Q9BRR6-1) clonada en el plásmido pCMV6-AC (proporcionado por Origene; Rockville, MD, USA) o el vector vacío pCMV6-AC de control (Origene). Células J16-145 o el clon J16-145 informador de luciferasa de *Gaussia* se transfectaron con 2 μg de DNA plasmídico/transfección utilizando tecnología de nucleofección AMAXA ("Cell Line Nucleoceptor® V kit", Lonza; Colonia, Alemania) conforme a las instrucciones del fabricante. 24 horas después de la transfección, se sometieron las células a los procedimientos experimentales. Se generaron agrupaciones de células J16-145 que expresaban establemente la proteína FLAG-ADPGK (células Jurkat F-ADPGK) o vector vacío (células de control), utilizando vectores de expresión retrovirales proporcionados por Addgene (Cambridge, MA, USA): pWZL-Neo-Myr-Flag-ADPGK (plásmido Addgene 20417, etiqueta FLAG N-terminal sobre una cadena principal de proteína, UniProtKB Q9BRR6-1) o pWZL-Neo-Myr-Flag-DEST (plásmido Addgene 15300), respectivamente (12). Se transfectaron vectores retrovirales por el método del fosfato de calcio en células productoras Phenix-Ampfó (Allele Biotechnology; San Diego, CA, USA). La transducción viral se realizó conforme al protocolo del fabricante utilizando Polibrene e infección por rotación (2 h/2000 g). Las células se cultivaron bajo una presión de selección en RPMI1640 (+ L-glutamina), 10% FCS suplementado con 1 μg/ml de G418-sulfato (Roth; Karlsruhe, Alemania).

(U) PCR de transcripción inversa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR en tiempo real)

Se aisló RNA con reactivo TRIzol (Invitrogen) (células CLL y células B de control) o kit "RNeasy Mini" (QIAGEN; Hilden, Alemania) (todas las muestras restantes) conforme a las instrucciones del fabricante. El RNA total (1 μg) se sometió a transcripción inversa con un "Reverse Transcription (RT)-PCR kit" (Applied Biosystems; Carlsbad, CA, USA). Se realizó una PCR cuantitativa en tiempo real utilizando el "Power SYBR Green PCR Master Mix" (Applied Biosystems). La expresión de genes se analizó utilizando los sistemas PCR 7500 en tiempo real y Sequence Detection Software, Applied Biosystems, v.2.0.2. Los niveles de expresión de los genes se normalizaron utilizando expresión de β-actina como referencia endógena. Los ratios de inducción (X) se calcularon utilizando la fórmula $X = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde Ct representa el umbral del ciclo y $\Delta Ct = Ct_{\text{gen de interés}} - Ct_{\text{gen de referencia}}$. $\Delta\Delta Ct$ es la diferencia entre los valores de ΔCt de las muestras "inducidas" y el valor ΔCt de la muestra "no inducida" correspondiente. Se calcularon los ratios de inducción medias. Los niveles relativos de expresión basal de ADPGK en las muestras de células B de los pacientes CLL y donantes sanos se compararon utilizando el factor $Y = 2^{(Ct_{\text{gen de interés}} - Ct_{\text{GAPDH}})} \times 1000$ (1). Para corregir por la variación inter-experimental, los valores obtenidos de dos experimentos separados (dos placas separadas de 96 pocillos con 5 muestras de CLL triplicadas y 4 ó 5 muestras de donantes sanos cada una) se sometieron a transformación z. Se utilizaron los cebadores siguientes para el análisis de la expresión génica: β-actina, sentido 5'-ACCGTGAGAAGATGACCCACA-3', antisentido 5'-TCACCGCAGTCCCATGACGAT-3'; IL-2, sentido 5'-CAACTGGAGCATTTACTGCTG-3', antisentido 5'-TCAGTTCTGTGGCCTTCTTGG-3'; IL-8, sentido 5'-GAATGGGTTTGCTAGAATGTGATA- 3', antisentido 5'-CAGACTAGGGTTGCCAGATTTAAC- 3', ADPGK ,sentido 5'-TCATTGCAGGAAGTGGATGA- 3', antisentido 5'-GCATGGGGAGCTTTTAACTG-3', IκBα, sentido 5'-GTCAAGGAGCTGCAGGAGAT-3', antisentido 5'-GATGGCCAAGTGCAGGAA- 3', GPD2, sentido 5'-ACCCTGGCTGGAGAACT3', antisentido, 5'-CCCTTTCCTGCCTTTTCAA3' y cebadores IL-4 como se ha publicado en otro lugar (1).

(V) Transfección y silenciamiento de siRNA

Los oligonucleótidos de siRNA utilizados para transfección fueron como sigue: control no-silenciador ("AllStars" no-silenciador, siRNA validado, QIAGEN), específico para ADPGK humana (Hs_ADPGK_5-8 FlexiTube siRNA, QIAGEN) o GPD2 humana (Hs_GPD2_1, 4-6 FlexiTube siRNA, QIAGEN). Células T Jurkat o células T humanas "en reposo" se transfectaron por nucleofección ("kit Cell Line Nucleofector® V" o "kit T Cell Nucleofector®", Lonza) realizada con 800 nM de oligonucleótidos siRNA conforme a las instrucciones del fabricante.

(W) Electroforesis en gel de poliacrilamida azul nativo (BN-PAGE) y WB

El análisis BN-PAGE de las fracciones enriquecidas en mitocondrias se realizó conforme a Haeger *et al.* (13) con modificaciones. Los complejos proteínicos de la membrana mitocondrial se solubilizaron en presencia de 1,5 M ácido 6-aminocaproico, 50 mM Bis-Tris y digitonina (6 g/g proteína) a 4°C durante 30 min. Subsiguientemente, se centrifugaron las muestras a 11.000 x g y 4°C durante 30 min. El sobrenadante se suplementó con tampón de muestra (1,5 M ácido 6-aminocaproico, 50% glicerol, 1% (p/v) Azul Coomassie G250) y se aplicó inmediatamente sobre un gel BN (3-13%). El gel se corrió durante 16 h a una corriente continua de 35 V. Las proteínas se transfirieron durante 2 horas con una corriente limitada a 0,8 mA/cm² de membrana. El complejo III purificado de corazón de bovino (complejo BC1) fue un obsequio amable del Prof. Ulrich Brand.

Ejemplo 2

El disparo de TCR induce un cambio metabólico semejante al efecto Warburg en las células T preactivadas.

Una reducción de la respiración mitocondrial y un aumento en la glicólisis son fundamentales para el efecto Warburg (11-14). Se aplicó un electrodo de oxígeno para medir los cambios inducidos por activación en la respiración mitocondrial de células T humanas intactas. En línea con el fenotipo Warburg, el tratamiento con anticuerpo anti-CD3 agonista o PMA dio como resultado una inhibición significativa del consumo de oxígeno mitocondrial (Figura 1A y Figura 7A), mientras que la absorción celular de glucosa marcada radiactivamente aumentaba con rapidez después de la estimulación (Figura 1B). El aumento consecutivo en los niveles de ATP intracelulares (Figura 1C) ponía de manifiesto que, a pesar de la normoxia, el disparo del TCR de las células T periféricas humanas expandidas *in vitro* conducía a un cambio rápido hacia un fenotipo aún más glicolítico.

Para verificar una relación causal entre los cambios metabólicos observados y la producción de ROS mitocondrial incrementada, se testó a influencia de 2-desoxi-glucosa (DOG) y 3-bromopiruvato (PrByr), bloqueantes del metabolismo de la glucosa, sobre la generación de ROS inducida por activación. Después de pre-incubación breve (30 min) con DOG-piruvato, las células T humanas expandidas y las células T Jurkat generaban cantidades menores de ROS inducido por activación en comparación con las células pre-incubadas con concentraciones equimolares de glucosa (Glc)/piruvato (Figura 1D). El tratamiento con el inhibidor más potente, BrPyr, dio como resultado inhibición completa de la generación de ROS mitocondrial inducida por TCR y la expresión de genes IL-2, IL-4 e IκBα dependiente de NF-κB e inducida por activación (Figura 1E y F, Figura 7C y D). Además, ambos agentes reducían el ruido de fondo por oxidación intracelular (Figura 7B). Así, la generación de ROS mitocondrial inducida por activación de las células T está asociada con un cambio metabólico rápido hacia la glicólisis, definido comúnmente como efecto Warburg.

Ejemplo 3

La generación de la señal oxidativa va acompañada por cambios bioenergéticos y ultraestructurales importantes en las mitocondrias

La PKCθ disparada por TCR induce generación de señales oxidativas por el complejo respiratorio mitocondrial I (3). Para comprender mejor la relación entre el cambio metabólico Warburg inducido por activación y el mecanismo de la liberación de ROS mitocondrial, se investigó el estatus bioenergético de los complejos de la cadena respiratoria. A este fin, se aplicaron células T humanas expandidas *in vitro* congeladas bruscamente y permeabilizadas con digitonina. Como se muestra en la Figura 1G (panel superior) el disparo de TCR daba como resultado una disminución importante de las actividades enzimáticas de los complejos I y II, mientras que la actividad del complejo III se incrementaba. Pudo observarse un patrón similar en células tratadas con PMA (Figura 1G, panel inferior). Los datos muestran que estos fenómenos son independientes de la absorción del Ca²⁺ mitocondrial disparada por TCR. Además, los mismos sugieren que está implicado un camino dependiente de DAG/PKCθ. En línea con esta

hipótesis, el pretratamiento de las células T con bis-indolil-maleimidato I (BIM), un inhibidor de la generación de ROS inducida por PKC y TCR, bloqueaba significativamente los cambios observados (Figura 1H e I).

Adicionalmente, el patrón diferencial observado de actividades enzimáticas no se correspondía con los cambios en el contenido de proteínas de los complejos respectivos (Figura 8A) y la migración en geles (BN)-PAGE Azul Nativo (Figura 8B). Curiosamente, la ultraestructura de las mitocondrias cambiaba después de disparo por TCR o PMA (Figura 2). El desordenamiento y la distorsión de los cristales eran particularmente pronunciados en las mitocondrias de las células activadas por TCR (Figura 2C), mientras que el tratamiento con PMA conducía a diversos grados de alteraciones (Figura 2B). No pudo detectarse ruptura alguna de las membranas mitocondriales exteriores e interiores. Además, dado que estos cambios se observaban rápidamente (1 hora) y eran dependientes del fenotipo de activación de las células (v.g., aumento en el nivel de ATP, regulación ascendente del transporte de glucosa, y relajación de la cromatina), su origen apoptótico estaba excluido. Las alteraciones observadas se asemejaban estrechamente a las típicas para células de tumores altamente glicolíticos y se había informado previamente que ocurren como respuesta adaptativa a la hipoxia (24) o adaptación metabólica mitocondrial transitoria a la fase IV de la respiración (contenido de ADP bajo limitante de la velocidad, producción alta de ROS) (25). Así, las micrografías electrónicas de las mitocondrias indican una actividad respiratoria baja, que es paralela al fenotipo glicolítico intensificado de las células T activadas.

Para comprender mejor estos fenómenos, se limitaron las velocidades de flujo electrónico del complejo I/II al complejo III utilizando células permeabilizadas o mitocondrias aisladas (Figura 1J). En el primer caso, la activación de las células T conducía a una tasa de flujo electrónico disminuida entre el complejo I o II y el complejo III, en línea con los resultados presentados en la Figura 1G. El aislamiento de las mitocondrias anulaba estos efectos y daba como resultado un flujo electrónico intensificado hacia el complejo III después de activación de las células T (Figura 1J). Estos resultados sugieren un carácter transitorio de la disminución inducida por activación de las actividades de los complejos I/II debido a la implicación de un agente lábil. El hecho de que la actividad intensificada del complejo III no se deteriora por el procedimiento de aislamiento de las mitocondrias implica una modificación estable del complejo III.

Los cambios bioenergéticos observados podrían atribuirse al estado hiper-reducido de la ubiquinona, el portador de electrones entre los complejos I/II y el complejo III (26,27). La acumulación de ubiquinona reducida (ubiquinol) es probable que disminuya las actividades de los complejos I y II en las células intactas por bloqueo del flujo electrónico. Este efecto se perdería después del aislamiento de las mitocondrias debido a la oxidación del ubiquinol (Figura 1J). Además, la transferencia inversa de electrones (RET), un camino importante de la generación de ROS mitocondrial por la vía del complejo I, esta mediada por una reserva muy reducida de ubiquinona (26, 27). La acumulación de ubiquinol es crucial también para la liberación de ROS mitocondrial inducida por hiperglucemia/hipoxia (18-21).

Para conseguir una mejor comprensión en cuando al estado redox de la ubiquinona después de activación de las células T, se testó la influencia de un panel de inhibidores de la cadena respiratoria sobre la generación de la señal oxidativa. Conforme a la bibliografía, la inhibición observada por los bloqueadores del complejo I, rotenona y metformina (1, 3), así como la inhibición moderada por el bloqueador del complejo II, TTFA, sugieren un camino basado en RET de la liberación de ROS mitocondrial inducida por activación (Figura 9A) (26). La señal de ROS no era bloqueada por NaN_3 , un inhibidor del complejo IV, y oligomicina, un inhibidor de la ATP-sintasa (Figura 9A). Llamativamente, la generación de ROS mitocondrial inducida por activación de las células T era incrementada por la antimicina, un inhibidor del complejo III que se fija al sitio matriz, pero no por mixotiazol, un inhibidor que interacciona con la parte del espacio intermembranal del complejo III (Figura 9A). Estos resultados sugieren la importancia de la ciclación de ubiquinona intra-complejo III como ha sido comunicado para la liberación de ROS mitocondrial inducida por hipoxia (20). Es digno de mención que, en las células T humanas, la actividad del complejo IV endógeno detectada es aproximadamente 8 veces menor que la actividad del complejo III (Figura 9B) formando un cuello de botella para la regeneración de la ubiquinona. Por ello, se investigaron los cambios del estatus redox de la ubiquinona después de activación de las células T. El análisis basado en HPLC de los extractos de células T activadas congeladas bruscamente reveló un aumento significativo en el contenido de ubiquinol sobre ubiquinona, que alcanzaba 30% después del disparo mediado por TCR y 57% después del disparo mediado por PMA (Figura 1K). Los datos obtenidos demuestran un estatus hiper-reducido de la reserva de ubiquinona después de la activación de las células T y sugieren fuertemente un papel causal de RET en la generación de la señal oxidativa.

Ejemplo 4

El flujo glicolítico desviado conduce a una liberación de ROS mitocondrial mediada por GPD2

Es sabido que la función de ROS mitocondrial reducida por ubiquinona hiper-reducida está asociada con un metabolismo incrementado de la glucosa en las células hiperglucémicas o hipóxicas (18-21). Para ensayar el flujo metabólico glicolítico inmediatamente después del disparo por TCR, se midieron las actividades de todas las enzimas glicolíticas importantes (Figura 3A y B). Curiosamente, la única actividad enzimática que cambiaba significativamente después de la estimulación de TCR era la reacción inversa de la enolasa (ENO) (Figura 3B). Dado que el ensayo utilizado detecta únicamente una hidrólisis de ATP específica de fosfoenolpiruvato (PEP) por monitorización de la reducción de piruvato en presencia de NADH, se utilizaron inhibidores para caracterizar adicionalmente la actividad enzimática detectada. NaF, un inhibidor de ENO, bloqueaba la actividad de ENO inversa detectada. Es interesante que NaVO₃, un inhibidor de la fosforilación de histidina (28), reducía la actividad catalítica pero no la bloqueaba. En primer lugar, anulaba su aumento inducido por TCR (datos no presentados). Es notable que la activación de la fosfoglicerato-mutasa (PGM) mediada por fosforilación de la histidina dependiente de PEP, se ha descrito recientemente en células de proliferación rápida normales y de cáncer, que expresan la isoforma M2 de piruvato-quinasa (PK) (PK-M2) (29,30). Dado que PK-M2 se expresa fuertemente en las células T activadas (31), el aumento detectado en la actividad semejante a ENO inversa podría estar mediado por la recientemente descrita histidina-quinasa desconocida que utiliza PEP (29). Esto está respaldado adicionalmente por el descubrimiento de que la actividad semejante a ENO observada era solo parcialmente dependiente de ATP, y su aumento inducido por activación era independiente de ATP.

Se sugirió que la fosforilación de la histidina PGM invierte el flujo por el camino glicolítico inferior iniciado por GAPDH (29), y así, podría redirigirse al flujo alternativo por el camino citosólico de la glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa (GPD 1/2). De hecho, el disparo de TCR aumentaba notablemente el metabolismo de fructosa-6-fosfato en la dirección de GPD1, mientras que la renovación de fructosa-6-fosfato mediada por GAPDH disminuía ligeramente (Figura 3C). Adicionalmente, la producción de lactato, el producto final del camino GAPDH, disminuía a pesar de la absorción incrementada de glucosa (Figura 3D y 1B). Por ello, los inventores investigaron el estatus de actividad de GPD 2, la isoforma mitocondrial de GPD. La actividad de GPD2 estaba regulada crecientemente de modo significativo después del disparo de TCR (Figura 3E). La inhibición de PKC por BIM bloqueaba significativamente la activación de GPD2 inducida por TCR (Figura 3E). Además, en línea con el informe previo (32), el tratamiento con PMA regulaba también moderadamente en sentido creciente la actividad de GPD2 en las fracciones de membrana enriquecidas en mitocondrias de las células T humanas preactivadas (Figura 3E). Dado que GPD2 es una enzima de fijación de Ca²⁺, el aumento inducido por disparo de anti-CD3 en la concentración intracelular de Ca²⁺ converge con la activación dependiente de PMA consignada (DAG) (32, 33).

GPD2 transfiere electrones a la cadena respiratoria por reducción de la ubiquinona. Por tanto, la regulación creciente de su actividad enzimática podría dar como resultado una liberación de ROS mediada por RET debido a ubiquinona hiper-reducida (26, 27, 34-36). Para investigar esta posibilidad, se analizaron los efectos de la regulación decreciente de la expresión de GPD2 sobre la generación de la señal oxidativa dependiente de la activación, el disparo de NF-κB y la expresión génica. La silencianción mediada por siRNA de la expresión de GPD2 daba como resultado una generación reducida de la señal oxidativa (Figura 3F y G). Correspondientemente, la disminución en la abundancia de GPD2 inhibía la activación inducida por PMA o PMA/Iono de un informador de luciferasa NF-κB así como la expresión de IL-2 en las células T Jurkat (Figura 3H e I).

Adicionalmente, WB basado en BN-PAGE sugería fuertemente una asociación de GPD2 con el complejo respiratorio III (Figura 8B). La interacción directa de GPD2 con super-complejos de la cadena respiratoria puede explicar parcialmente el aumento observado en la actividad del complejo III después del disparo de TCR o tratamiento con PMA (Figura 1G, J). En conclusión, la activación de las células T da como resultado una desviación del flujo glicolítico hacia GPD2, activación de GPD2, hiper-reducción de ubiquinona y liberación de ROS mediada por RET.

Ejemplo 5

La actividad enzimática de ADPGK inducida por activación de las células T regula en sentido creciente el flujo glicolítico

Se cree que la hiper-reducción inducida por glucosa de la ubiquinona y la liberación de ROS mitocondrial dependen de un flujo glicolítico regulado en sentido creciente (18, 19). La glicólisis es una secuencia estrechamente regulada de reacciones con puntos de regulación principales en HK, PFK, GAPDH, y PK (Figura 3A). Los resultados de los presentes experimentos demostraron la inexistencia de cambio alguno de cualquiera de estas actividades

enzimáticas (Figura 3B). La asociación de HK con VDAC mitocondrial, que daba como resultado una pérdida de la inhibición del producto HK actúa como otro mecanismo que regula en sentido creciente el flujo de glucosa (37). El análisis WB de las fracciones de membrana enriquecidas en mitocondrias de células T humanas expandidas revelaba niveles altos de HK1 y bajos de HK2 (Figura 10A). Sin embargo, el disparo de TCR no daba como resultado un aumento significativo de la asociación HK1/2 con las mitocondrias o regulación creciente de la actividad de HK asociada a las mitocondrias (Figura 10A y B). A continuación, se investigó la actividad de HK asociada a las mitocondrias acoplada a la generación de ATP mediada por la respiración (Figura 4A). El disparo de TCR inducía claramente una actividad semejante a HK en presencia de los sustratos respiratorios, ADP y succinato (Figura 4B). Esta actividad era bloqueada sólo moderadamente por el inhibidor de adenilato-quinasa (AK) diadenosina-pentafosfato (Ap5A, 5 μ M, hasta 40% de inhibición), mientras que Ap5 inhibía fuertemente la AK mitocondrial (5 μ M, 80-90% inhibición). Y lo que es más importante, el aumento inducido por activación en la actividad semejante a HK no se veía afectado por Ap5A. Sorprendentemente, esta actividad enzimática incrementada era independiente de la adición de succinato, pero claramente dependiente de la presencia de ADP. Adicionalmente, la insensibilidad al inhibidor de la cadena respiratoria NaCN y el desacoplador CCCP demostraba su independencia real del ATP producido por las mitocondrias (Figura 4B). Intrigados por estos resultados, los inventores investigaron la bibliografía y pudo identificarse una proteína capaz de fosforilar glucosa por utilización de ADP - la glucoquinasa dependiente de ADP (ADPGK) (38). Aunque es típico para *Archaea* termófila, ADPGK existe en los mamíferos y se expresa fuertemente en las células hematopoyéticas humanas, con inclusión de las células T (Figura 5E) (31, 39). Adicionalmente, una ausencia comunicada de inhibición por glucosa-6-fosfato hace que ADPGK sea un disparador supuesto particularmente satisfactorio del flujo glicolítico (38).

De hecho, la actividad incrementada de ADPGK ocurría en fracciones de membrana enriquecidas en mitocondrias (fracciones "ricas en g"), aisladas de células T humanas tratadas con anti-CD3 (Figura 4C). Una regulación creciente comparable de la actividad enzimática pudo conseguirse por tratamiento con PMA de células T humanas o células Jurkat (Figura 4C), indicando una independencia de la señalización de TCR mediada por Ca^{2+} . Adicionalmente, el aumento inducido por activación de las células T de la actividad enzimática de tipo ADPGK era completamente anulado por el inhibidor BIM de PKC (Figura 4C). No pudo demostrarse regulación creciente alguna del contenido de ADPGK después de estimulación de TCR (Figura 4D). Curiosamente, la secuencia ADPGK contiene un péptido señal supuesto para transporte al retículo endoplásmico (ER) (Figura 4E y Figura 14). Dado que las mitocondrias de las células T son menores que las de otros tejidos (v.g., el hígado), se utilizó un paso de centrifugación a 11.000 x g para aumentar la producción de mitocondrias en las fracciones enriquecidas en mitocondrias (fracciones mitocondriales "ricas en g"). Tales fracciones contienen también ER como se ve en las micrografías electrónicas y en WB (calreticulina - un marcador de ER) (Figura 4D). Para adquirir una idea más clara en cuanto a la localización subcelular de ADPGK, se prepararon fracciones "enriquecidas en mitocondrias" y "enriquecidas en ER" (véase el Ejemplo 1), que demostraban claramente una asociación con ER de la proteína ADPGK en las células T y las células T Jurkat (Figura 11).

La actividad de ADPGK en las fracciones "enriquecidas en ER" se caracterizó con respecto a sus parámetros cinéticos. La enzima revelaba un pH óptimo llamativo de 6,0 y un Km para glucosa de 0,086 mM (pH 6,0, 37°C). Los valores obtenidos se asemejan a los consignados para ADPGK recombinante de ratón (38), y están comprendidos en un intervalo similar a los denominados HKs 1-3 de Km bajo. Adicionalmente, ADPGK era inhibida por el sustrato a concentraciones de glucosa mayores que 5 mM.

A continuación, se generaron células T Jurkat que expresaban de manera estable la proteína ADPGK con una etiqueta FLAG N-terminal (células Jurkat F-ADPGK; Figura 4E). Como para la proteína ADPGK de tipo salvaje (WT-ADPGK), se encontró la proteína FLAG-ADPGK (F-ADPGK) en las fracciones enriquecidas en ER y enriquecidas en mitocondrias, pero no en las fracciones citosólicas (Figura 11A y Figura 4D). Las células que expresaban F-ADPGK exhibían una actividad basal mayor así como una actividad intensificada de tipo ADPGK inducida por PMA en comparación con las células de control (Figura 5E, panel inferior). La proteína FLAG-ADPGK inmunoprecipitada demostraba actividad de ADPGK, que no pudo medirse en los precipitados de los lisados de control (Figura 4F, panel inferior). Los resultados se confirmaron por WB (Figura 4F, panel superior). Así, por primera vez, se demostró una ADPGK humana plenamente activa. En conclusión, se encontró que el disparo de TCR regula en sentido creciente el flujo glicolítico por activación de ADPGK de una manera dependiente de PMA (DAG) y PKC.

Ejemplo 6

ADPGK media la generación de la señal oxidativa

A continuación, se ensayó la influencia de la disminución de la expresión de ADPGK sobre la generación de ROS inducida por activación. La expresión reducida de ADPGK (Figura 5A) inhibía la producción de ROS desencadenada por PMA en las células T Jurkat (Figura 5B). Concomitantemente, la silenciación de ADPGK daba como resultado la inhibición de la activación de NF- κ B disparada por PMA- o PMA-Iono (Figura 5C) y la expresión dependiente de NF- κ B de los genes IL-2, I κ B α e IL-8 (Figura 5D y Figura 12). Las células T "en reposo", no expandidas, generan también la señal oxidativa de las mitocondrias (1). Análogamente, la activación de las células T "en reposo" conducía a un aumento en las actividades enzimáticas de GPD2 y ADPGK (Figura 5F). La inducción baja de las actividades enzimáticas corresponde a una intensidad menor de generación de ROS en las células T "en reposo" en comparación con las células T "preactivadas" expandidas *in vitro* (1). No obstante, la silenciación mediada por siRNA de la expresión de ADPGK en las células T humanas periféricas "en reposo" daba también como resultado una disminución de la señal oxidativa inducida por activación (Figura 5G).

Adicionalmente, la actividad de ADPGK intensificada inducida por PMA en células Jurkat F-ADPGK (Figura 4E) daba como resultado una producción incrementada de ROS seguida por inducción potenciada de los genes dependientes de NF- κ B (IL-2, IL-8 e I κ B α) (Figura 6A, C). Se obtuvieron resultados similares para células T Jurkat que sobreexpresaban transitoriamente WT-ADPGK (Figura 6B y C). En estas células, la activación daba como resultado el disparo de NF- κ B y potenciaba la inducción de genes dependientes de NF- κ B en comparación con las células de control transfectadas con vector vacío (EV) (Figura 6B y C). Es interesante que, debido a un camino desconocido hasta ahora, la sobreexpresión de ADPGK tiende a reducir los niveles basales de transcrito de genes dependientes de NF- κ B (Figura 13). Considerados en su conjunto, los presentes datos demuestran un papel regulador positivo de ADPGK en el proceso de activación de las células T.

Ejemplo 7

La actividad de ADPGK aumenta a temperatura pro-inflamatoria más alta

La actividad de ADPGK se describió por primera vez para *Archaea* termófila (38-40). Es notable que una predicción de estructura secundaria para ADPGK de mamífero revela una semejanza estructural alta con estructuras secundarias conocidas de ADPGK arqueal termoestable a pesar de una baja homología de secuencia (Figura 14) (40, 41). Por esta razón, se testó la dependencia de la actividad de ADPGK respecto a la temperatura en las células T humanas. Como se muestra en la Figura 6D, la velocidad de la reacción catalizada por ADPGK aumentaba exponencialmente dentro del intervalo fisiológico de temperatura y era 3,5 veces mayor a 42°C que a 37°C. En contraste, el aumento de la actividad de HK estimulado por la temperatura se mantenía lineal. Adicionalmente, a 42°C la reacción mediada por ADPGK alcanza una velocidad comparable a la de HK. Estos datos sugieren la estabilidad térmica de la ADPGK humana e intensifican su posible papel en la respuesta inflamatoria y el disparo de NF- κ B. Así, la temperatura incrementada en los sitios inflamatorios podría facilitar la activación de las células T y la expresión dependiente de NF- κ B de las citocinas proinflamatorias.

Ejemplo 8

ADPGK y GPD2 se expresan fuertemente en las células de la leucemia linfocítica crónica (CLL) maligna

Muchos cánceres dependen estrictamente de la activación constitutiva del camino NF- κ B (16). Niveles intrínsecos altos de ROS o del fenotipo Warburg son característicos de muchas enfermedades malignas (11, 14, 42). Por esta razón, se investigó la expresión de ADPGK en células de cáncer. Los cánceres originados por las células T son raros en humanos en comparación con las enfermedades malignas de las células B. Particularmente, CLL constituye una de las leucemias más comunes con prognosis fatal (43). Además, las células CLL están dotadas de actividad incrementada de NF- κ B, glicólisis y niveles intrínsecos altos de ROS (15, 17, 43-45). Por ello, se compararon los niveles de expresión de ADPGK y GPD2 en células CLL malignas y células B normales (Tabla 1).

45

Tabla 1

Información adicional acerca de los pacientes analizados en la Figura 8					
Número	Edad	Sexo	Fase	Terapia	Datos adicionales
028/09	52	M	Binet A	ninguna	FISH - sin cambios
032/09	46	W	Binet A	ninguna	del 13q14
038/09	70	W	Binet B	ninguna	Trisomía 12
041/09	43	M	Binet B	ninguna	FISH - sin cambios
047/09	86	M	Binet A	ninguna	del 13q14
063/09	70	W	Binet A	ninguna	n.d.
090/09	34	M	n.d.	n.d.	n.d.
119/09	51	M	Binet A	ninguna	Trisomía 12q13
120/09	54	M	Binet A	ninguna	FISH - sin cambios
164/09	69	W	Binet A	Leukeran, Alemtuzumab	del17p13, del13q14 y del6q21
n.d. – no determinada					

- 5 Como se muestra en la Figura 6E, los niveles de mRNA de ADPGK y GPD2 están incrementados significativamente en las células CLL. Esto sugiere un papel universal para el mecanismo descrito de la producción de ROS mediada por efecto Warburg/activación de NF- κ B, e indica su posible importancia para la tumorigénesis.

Conclusión

- 10 La activación de las células T está asociada con un cambio metabólico desde respiración mitocondrial a glicólisis aerobia (12). Este denominado "fenotipo Warburg" es un rasgo característico de las células normales de proliferación rápida, pero también de células malignas (11, 14). Un trabajo previo ha demostrado que las células T proliferantes se caracterizan por una producción mitocondrial alta de ROS desencadenada por TCR (1, 3). Esta señal oxidativa generada por las mitocondrias contribuye a la activación de NF- κ B y, por tanto, estimula la proliferación y una respuesta inflamatoria. Curiosamente, las células de cáncer exhiben a menudo un fenotipo glicolítico aerobio y están dotadas de producción intrínseca de ROS elevada y activación constitutiva del camino NF- κ B (14, 16, 18, 42).
- 15 Adicionalmente, se sabe que la regulación creciente de la glicólisis en condiciones hiperglucémicas o hipóxicas aumenta la generación de ROS mitocondrial (18, 19, 21), mientras que la activación de las células T depende de la absorción de glucosa (9, 10). Así, el análisis metabólico de la producción de ROS mitocondrial inducida por activación de las células T puede proporcionar un enlace molecular que conecte estos diferentes fenómenos al nivel

de señalización.

En los experimentos arriba descritos, se demostró que la producción de ROS mitocondrial inducida por activación de las células T y la expresión génica dependen de la activación de ADPGK, una proteína arqueobacteriana con función desconocida hasta ahora en los eucariotas. La activación de ADPGK va acompañada por una absorción rápida de glucosa, regulación decreciente del consumo de oxígeno mitocondrial y desviación de la glicólisis hacia la lanzadera GPD, es decir el efecto Warburg. A su vez, la activación de GPD2 asociada a la cadena respiratoria conduce a una hiperreducción de ubiquinona y liberación de ROS mediada por RET a partir del complejo I (Figura 6F). Esto ocurre paralelamente a cambios importantes de la bioenergética y ultraestructura mitocondrial. Es digno de mención que todos los eventos ocurren en el transcurso de 1 hora después de la activación del TCR. La regulación decreciente de la abundancia de ADPGK o GPD2 inhibe la generación de ROS inducida por activación y la expresión génica dependiente de NF- κ B, mientras que la sobreexpresión de ADPGK da como resultado su regulación creciente.

Curiosamente, las células CLL, dotadas de un nivel intrínseco de ROS y actividad constitutiva de NF- κ B altos (15, 17), exhiben una expresión incrementada de ADPGK y GPD2 (Figura 6E). Adicionalmente, es sabido que la respiración mediada por glicerol-3-fosfato y la activación de GPD2 conducen a producción de ROS (también por la vía RET) (26, 27, 34). Así pues, el descubrimiento de un papel crucial para GPD2 en la generación de ROS desencadenada por TCR respalda un enlace específico del cáncer entre la actividad/expresión incrementada de GPD2 y los niveles altos de ROS (35,36). Además, la misma arroja una nueva luz acerca del fenotipo inflamatorio de las células T en los pacientes diabéticos y obesos (9, 46). Un redireccionamiento del flujo glicolítico a favor de la síntesis de un precursor metabólico por la forma dímera de afinidad baja de PK-M2 es un nuevo foco en el metabolismo del cáncer (47). Un informe reciente describe la activación de PGM mediada por PEP en células de proliferación rápida y expresantes de PK-M2, que da como resultado un camino glicolítico alternativo (29). Paradójicamente, la glicólisis redireccionada omite el segundo paso glicolítico de generación de ATP, un inconveniente energético que puede ser contrarrestado por fosforilación de glucosa mediada por ADP. Así pues, la interacción descrita de los caminos de señalización y metabólico puede tener un significado profundo para la tumorigénesis.

En general, la activación de las células inmunes está conectada con un escenario inflamatorio. El descubrimiento de la actividad incrementada de ADPGK a una temperatura pro-inflamatoria subraya la importancia de esta nueva proteína en la respuesta mediada por NF- κ B. Además, la semejanza estricta entre la estructura secundaria predicha de ADPGK humano y las estructuras cristalinas de las proteínas ADPGK de *Archaea* termófila (Figura 14) es indicativa de la estabilidad térmica de ADPGK (40, 41). Una homología de secuencia relativamente baja podría ilustrar la evolución convergente de una ADPGK humana.

La localización celular de ADPGK presenta un problema interesante no resuelto hasta ahora. Se ha sugerido con anterioridad que la fosforilación de la glucosa mediada por ADP constituye un mecanismo para preservar la reserva intracelular de ATP en condiciones isquémicas o hipóxicas (38). La localización de ER, sin embargo, indica un papel más complejo para esta proteína. ADPGK podría participar en caminos metabólicos mediados por hexosa-6-fosfato-deshidrogenasa (H6PD) (48) o glucosa-6-fosfato-fosfatasa (G6PC3) (49), dos enzimas gluconeogénicas que se expresan también fuertemente en tejidos extrahepáticos. Se ha demostrado recientemente que el reciclo de glucosa-6-fosfato/glucosa por G6PC3 es crucial para la activación de los neutrófilos humanos (49). Alternativamente, la glucosa-6-fosfato generada por ADPGK podría servir como fuente de energía para la generación de NADPH derivada de H6PD, e influir así en el balance ER-redox. Adicionalmente, en el tejido adiposo, hepático y muscular, la NADPH generada por H6PD contribuye directamente a la activación pre-receptorial mediada por 11 β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa tipo 1 (HSD11B1) de los glucocorticoides (48). Así, los caminos ADPGK/H6PD/(HSD11B1) o ADPGK/G6PC3 podrían participar en la regulación de la activación y diferenciación de las células T.

En conclusión, se proporcionan pruebas experimentales de un papel inesperado de ADPGK como nuevo regulador de la activación de las células T. Adicionalmente, basándose en el mecanismo identificado de la liberación de ROS mitocondrial inducida por el flujo glicolítico para las células T, se propone una hipótesis que conecta el fenotipo Warburg con niveles incrementados de ROS mitocondrial y la señalización incrementada de NF- κ B en células de cáncer de proliferación rápida.

Lista de referencias

1. M. M. Kaminski et al., *J Immunol* 184, 4827 (May 1, 2010).
2. W. Droge, *Physiol Rev* 82, 47 (Jan, 2002).
3. M. Kaminski, M. Kiessling, D. Suss, P. H. Krammer, K. Gulow, *Mol Cell Biol* 27, 3625 (May, 2007).
4. K. Gulow et al., *J Immunol* 174, 5249 (May 1, 2005).
5. J. S. Yi, B. C. Holbrook, R. D. Michalek, N. G. Laniewski, J. M. Grayson, *J Immunol* 177, 852 (Jul 15, 2006).
6. S. H. Jackson, S. Devadas, J. Kwon, L. A. Pinto, M. S. Williams, *Nat Immunol* 5, 818 (Aug, 2004).
7. M. Los et al., *Embo J* 14, 3731 (Aug 1, 1995).
8. J. Kwon et al., *Sci Signal* 3, ra59 (Aug 3, 2010).
9. F. B. Stentz, A. E. Kitabchi, *Biochem Biophys Res Commun* 335, 491 (Sep 23, 2005).
10. S. R. Jacobs et al., *J Immunol* 180, 4476 (Apr 1, 2008).
11. O. Warburg, *Science* 124, 269 (Aug 10, 1956).
12. T. Wang, C. Marquardt, J. Foker, *Nature* 261, 702 (Jun 24, 1976).
13. C. J. Fox, P. S. Hammerman, C. B. Thompson, *Nat Rev Immunol* 5, 844 (Nov, 2005).
14. M. G. Vander Heiden, L. C. Cantley, C. B. Thompson, *Science* 324, 1029 (May 22, 2009).
15. Y. Zhou, E. O. Hileman, W. Plunkett, M. J. Keating, P. Huang, *Blood* 101, 4098 (May 15, 2003).

16. S. I. Grivennikov, M. Karin, *Curr Opin Genet Dev* 20, 65 (Feb, 2010).
17. J. Tomic, B. Lichty, D. E. Spaner, *Blood*, (Jan 4, 2011).
18. K. E. Wellen, C. B. Thompson, *Mol Cell* 40, 323 (Oct 22, 2010).
19. M. Brownlee, *Nature* 414, 813 (Dec 13, 2001).
20. E. L. Bell et al., *J Cell Biol* 177, 1029 (Jun 18, 2007).
21. R. B. Hamanaka, N. S. Chandel, *Curr Opin Cell Biol* 21, 894 (Dec, 2009).
22. M. Bental, C. Deutsch, *Magn Reson Med* 29, 317 (Mar, 1993).
23. A. Miccheli et al., *Biochimie* 88, 437 (May, 2006).
24. G. Arismendi-Morillo, *Biochim Biophys Acta*, (Nov 9).
25. C. A. Mannella, *Biochim Biophys Acta* 1763, 542 (May-Jun, 2006).
26. A. J. Lambert, M. D. Brand, *Methods Mol Biol* 554, 165 (2009).
27. S. Miwa, J. St-Pierre, L. Partridge, M. D. Brand, *Free Radic Biol Med* 35, 938 (Oct 15, 2003).
28. J. Krivanek, L. Novakova, *FEBS Lett* 282, 32 (Apr 22, 1991).
29. M. G. Vander Heiden et al., *Science* 329, 1492 (Sep 17, 2010).
30. T. Hitosugi et al., *Sci Signal* 2, ra73 (2009).
31. T. Hruz et al., *Adv Bioinformatics* 2008, 420747 (2008).
32. K. Y. Tu et al., *Biochem Biophys Res Commun* 207, 183 (Feb 6, 1995).
33. R. M. Denton, *Biochim Biophys Acta* 1787, 1309 (Nov, 2009).
34. L. Tretter, K. Takacs, V. Hegedus, V. Adam-Vizi, *J Neurochem* 100, 650 (Feb, 2007).
35. S. K. Chowdhury, A. Gemin, G. Singh, *Biochem Biophys Res Commun* 333, 1139 (Aug 12, 2005).
36. S. K. Chowdhury, S. Raha, M. A. Tamopolsky, G. Singh, *Free Radic Res* 41, 1116 (Oct, 2007).
37. J. E. Wilson, *J Exp Biol* 206, 2049 (Jun, 2003).
38. R. S. Ronimus, H. W. Morgan, *Biochem Biophys Res Commun* 315, 652 (Mar 12, 2004).
39. C. Wu et al., *Genome Biol* 10, R130 (2009).
40. V. Guixe, F. Merino, *IUBMB Life* 61, 753 (Jul, 2009).
41. H. Tsuge et al., *Protein Sci* 11, 2456 (Oct, 2002).
42. E. O. Hileman, J. Liu, M. Albitar, M. J. Keating, P. Huang, *Cancer Chemother Pharmacol* 53, 209 (Mar, 2004).
43. A. Gaiger, D. Heintel, U. Jager, *Eur J Clin Invest* 34 Suppl 2, 25 (Aug, 2004).
44. M. Lopez-Guerra, D. Colomer, *Expert Opin Ther Targets* 14, 275 (Mar).

45. D. Colomer, J. L. Vives-Corrons, A. Pujades, R. Bartrons, *Cancer Res* 47, 1859 (Apr 1, 1987).
46. F. B. Stentz, A. E. Kitabchi, *Curr Drug Targets* 4, 493 (Aug, 2003).
47. S. Mazurek, H. C. Drexler, J. Troppmair, E. Eigenbrodt, U. R. Rapp, *Anticancer Res* 27, 3963 (Nov-Dec, 2007).
48. G. Banhegyi, M. Csala, A. Benedetti, *J Mol Endocrinol* 42, 283 (Apr, 2009).
- 5 49. H. S. Jun et al., *Blood* 116, 2783 (Oct 14, 2011).
50. H. PELICANO ET AL: "Glycolysis inhibition for anticancer treatment", *ONCOGENE*, vol. 25, no. 34, 7 August 2006 (2006-08-07), pages 4633-4646, XP055009657
51. SCATENA ROBERTO ET AL: "Glycolytic enzyme inhibitors in cancer treatment.", *EXPERT OPINION ON INVESTIGATIONAL DRUGS*, vol. 17, no. 10, October 2008 (2008-10), pages 1533-1545, XP002661595
- 10 52. N. J. MACIVER ET AL: "Glucose metabolism in lymphocytes is a regulated process with significant effects on immune cell function and survival", *JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY*, vol. 84, no. 4, 1 October 2008 (2008-10-01), pages 949-957, XP055009842
53. KRAWCZYK CONNIE M ET AL: "Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation", *BLOOD*, vol. 115, no. 23, June 2010 (2010-06), pages 4742-4749, XP002661596
- 15 54. RICHTER SUSAN ET AL: "Role of the novel glucose-phosphorylating enzyme ADP-dependent glucokinase in human cancer cell lines featuring knockouts generated by zinc finger nucleases", *PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING*, vol. 51 April 2011 (2011-04), XP002661597 & 101 ST ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-ASSOCIATION-FOR-CANCER-RESEARCH; WASHINGTON, DC, USA; APRIL 17 -21, 2010

20

25

30

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto capaz de reducir o inhibir (a) la actividad biológica de glucoquinasa dependiente de ADP (ADPGK) o (b) la expresión del gen codificante de ADPGK para uso en un método de tratamiento de un neoplasma, una enfermedad autoinmune o la enfermedad de rechazo inverso (GvHD),
- 5 en donde dicho compuesto es
- un oligonucleótido antisentido o un siRNA que reduce o inhibe la expresión del gen codificante de ADPGK,
 - un anticuerpo dirigido contra ADPGK o un fragmento del mismo que tiene igual especificidad,
 - una versión inactiva de ADPGK, o
 - un poli(ácido nucleico) que codifica una versión inactiva de ADPGK.
- 10 2. El compuesto conforme a la reivindicación 1 para uso conforme a la reivindicación 1, en el cual el neoplasma a tratar exhibe (sobre)expresión de ADPGK.
3. El compuesto conforme a la reivindicación 1 para uso conforme a la reivindicación 2, en el cual el neoplasma a tratar es leucemia linfocítica crónica (CLL) de las células B o un tumor que exhibe niveles incrementados de NF- κ B.
- 15 4. El compuesto conforme a la reivindicación 1 para uso conforme a la reivindicación 1, en el cual dicha enfermedad autoinmune es reumatismo, lupus eritematoso, psoriasis, dermatitis atópica, esclerosis múltiple, o diabetes.
5. Un método in vitro para identificación de un compuesto anti-cáncer o un compuesto modulador inmunosupresor, siendo dicho compuesto capaz de modular la actividad biológica de ADPGK o la expresión del gen codificante de ADPGK, que comprende los pasos de:
- 20 (a) incubar un compuesto candidato con un sistema de test que comprende ADPGK o el gen codificante de ADPGK; y
- (b) ensayar una actividad biológica de ADPGK;
- en donde un aumento o reducción de la actividad biológica de ADPGK es indicativo de la presencia de un
- 25 compuesto candidato que tiene la propiedad deseada.
6. El método in vitro de la reivindicación 5, en el cual el aumento o la reducción de la actividad biológica de ADPGK se determina por comparación con un sistema de test **caracterizado por** la ausencia de dicho compuesto de test.

Figura 1 A-C:

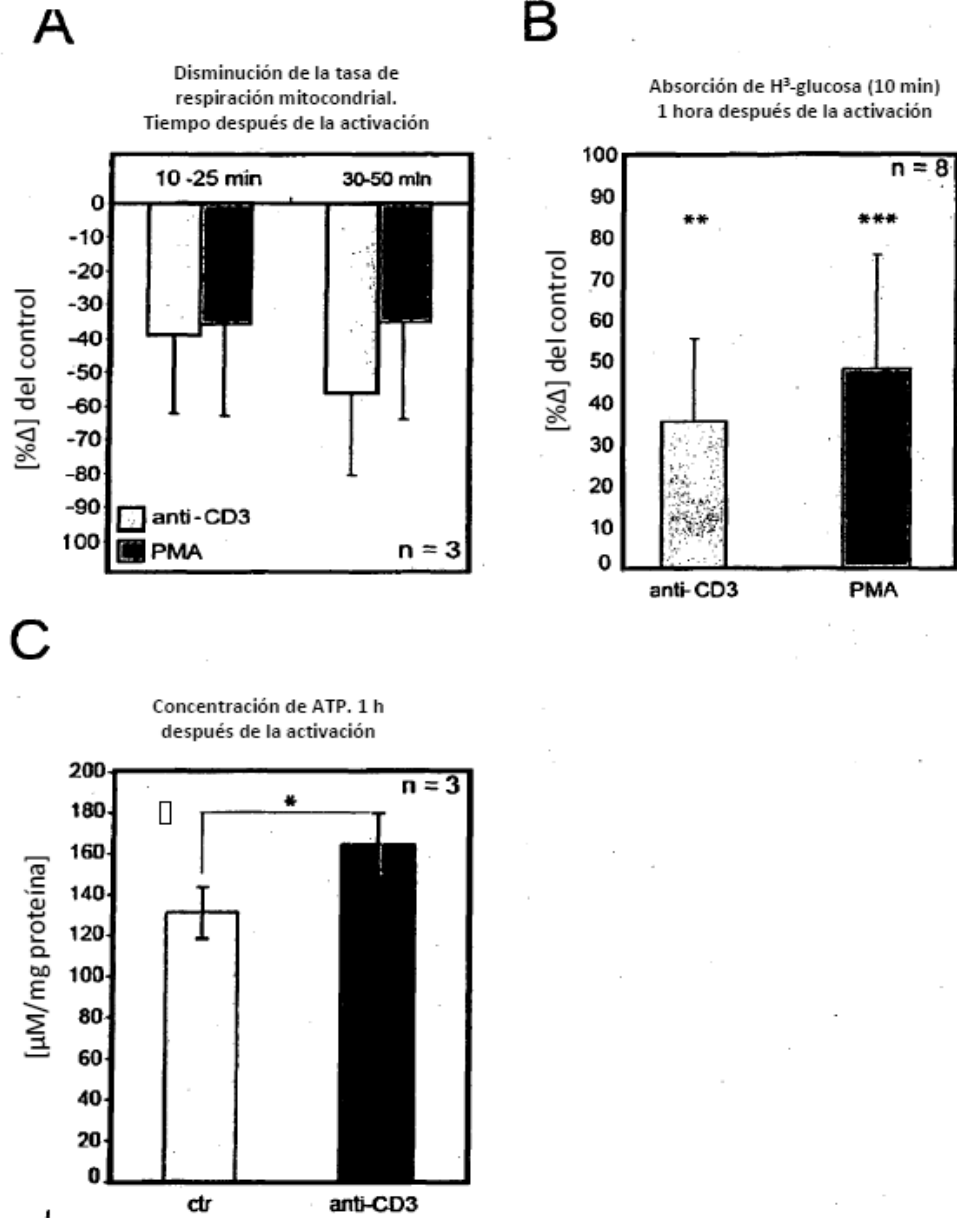
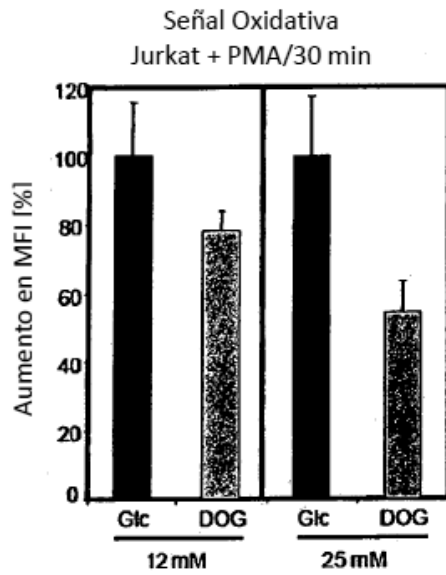


Figura 1 D-E:

D



E

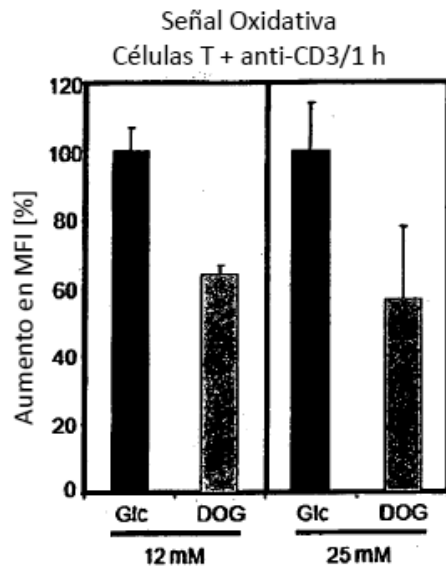
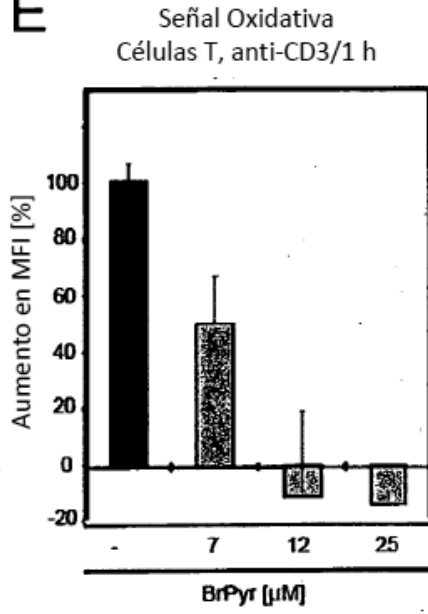


Figura 1 F:

F

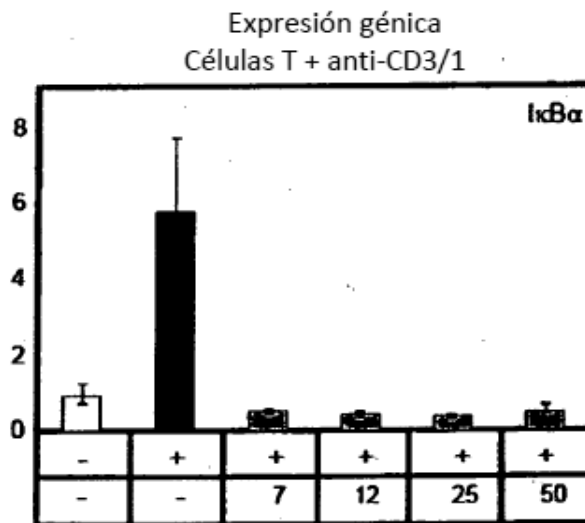
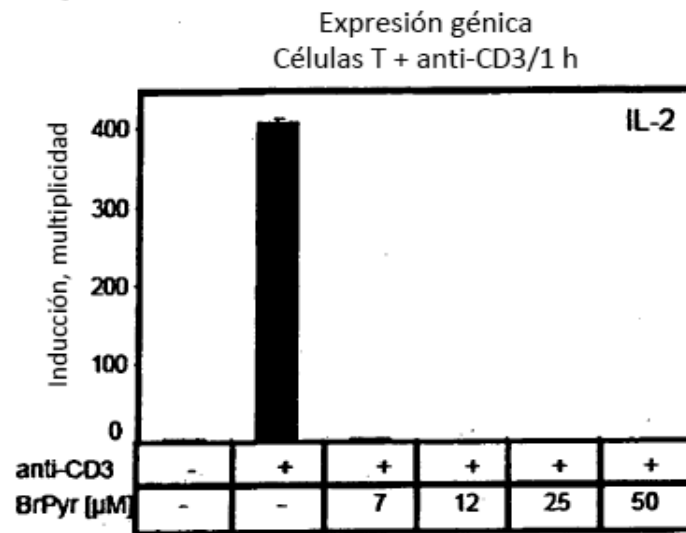


Figura 1 G:

G

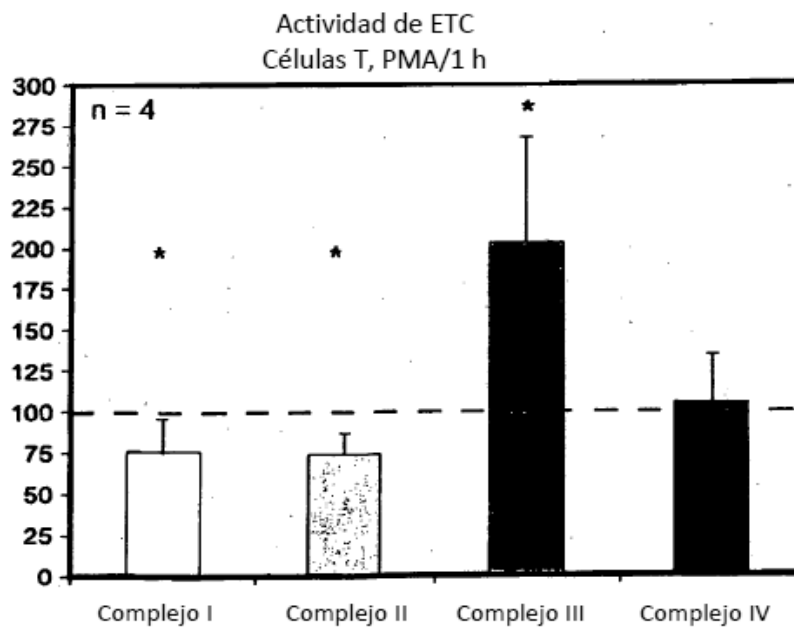
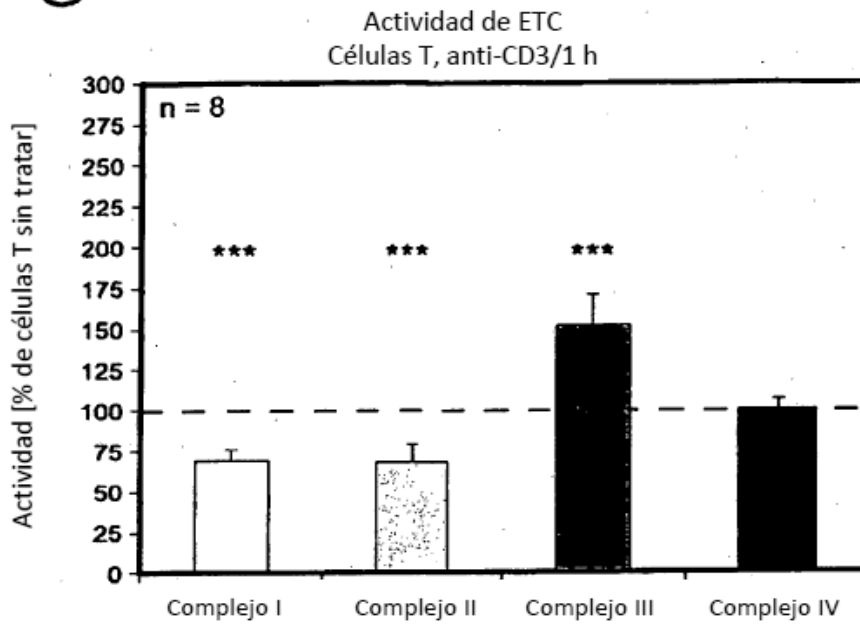


Figura 1 H-K:

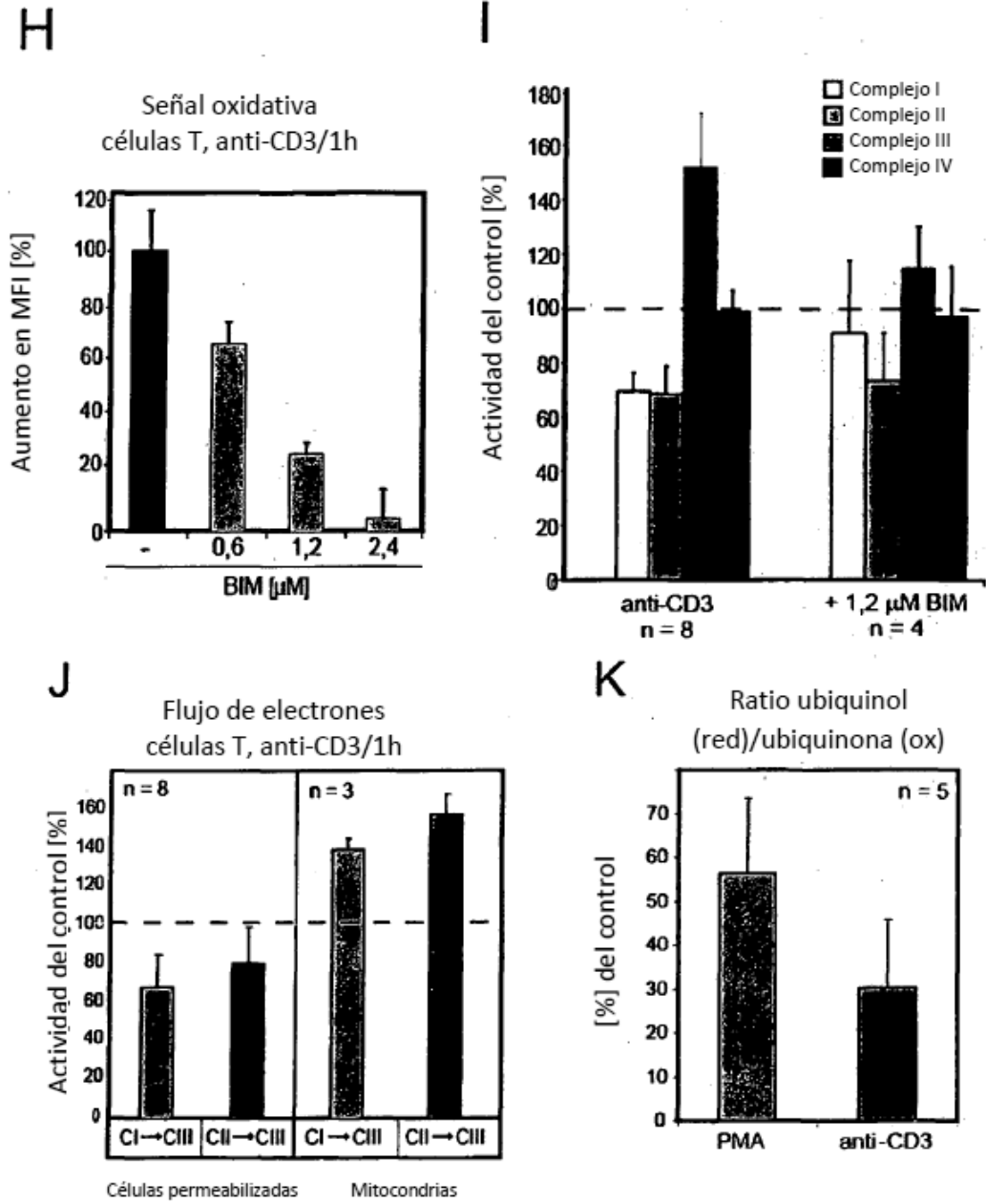


Figura 2 A

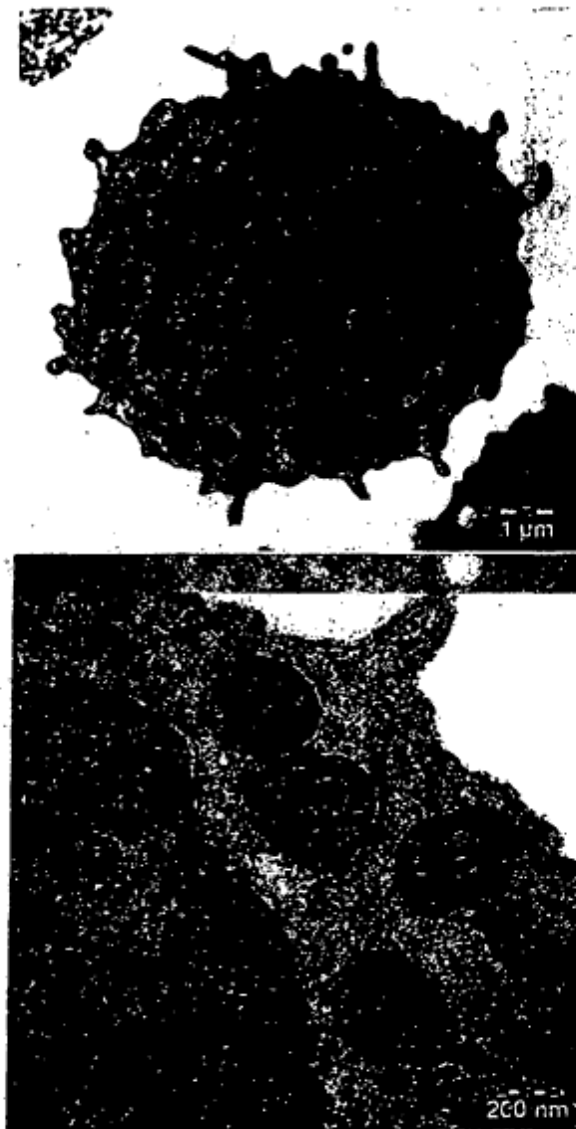


Figura 2 B:



Figura 2 C:

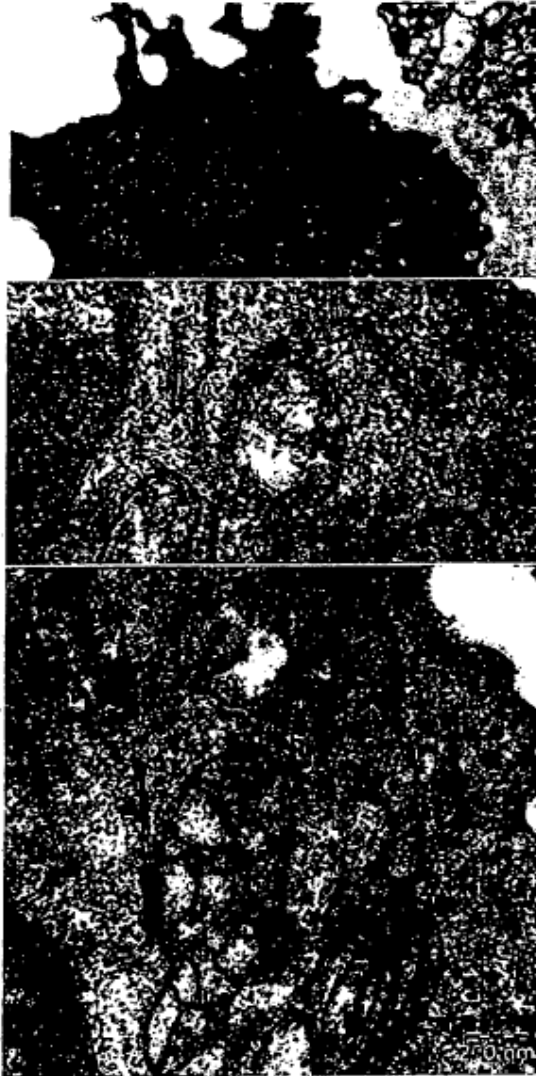


Figura 3 A:

A

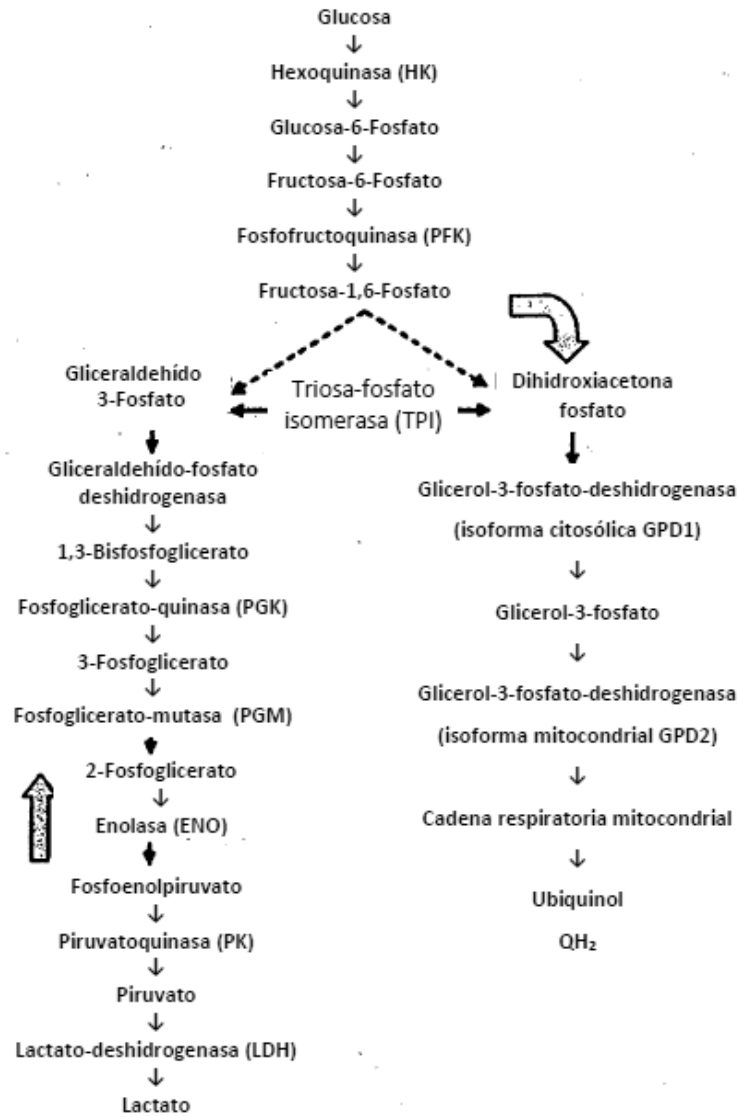


Figura 3 B-D:

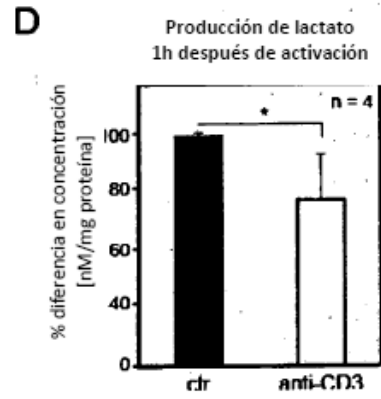
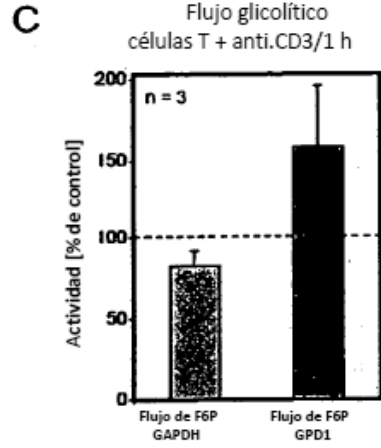
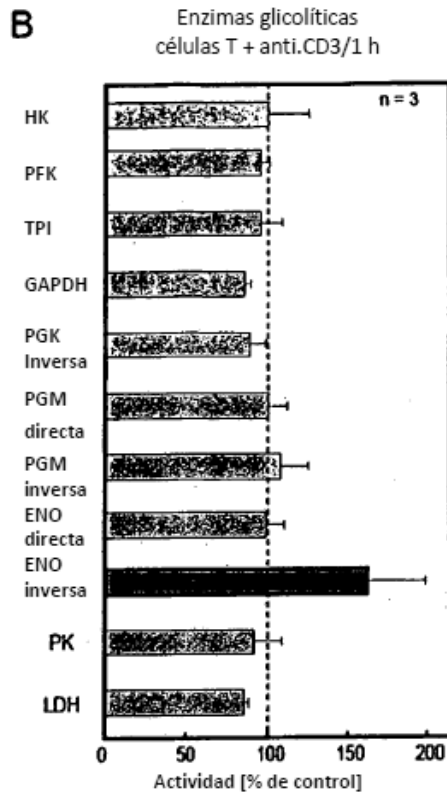


Figura 3 E-F:

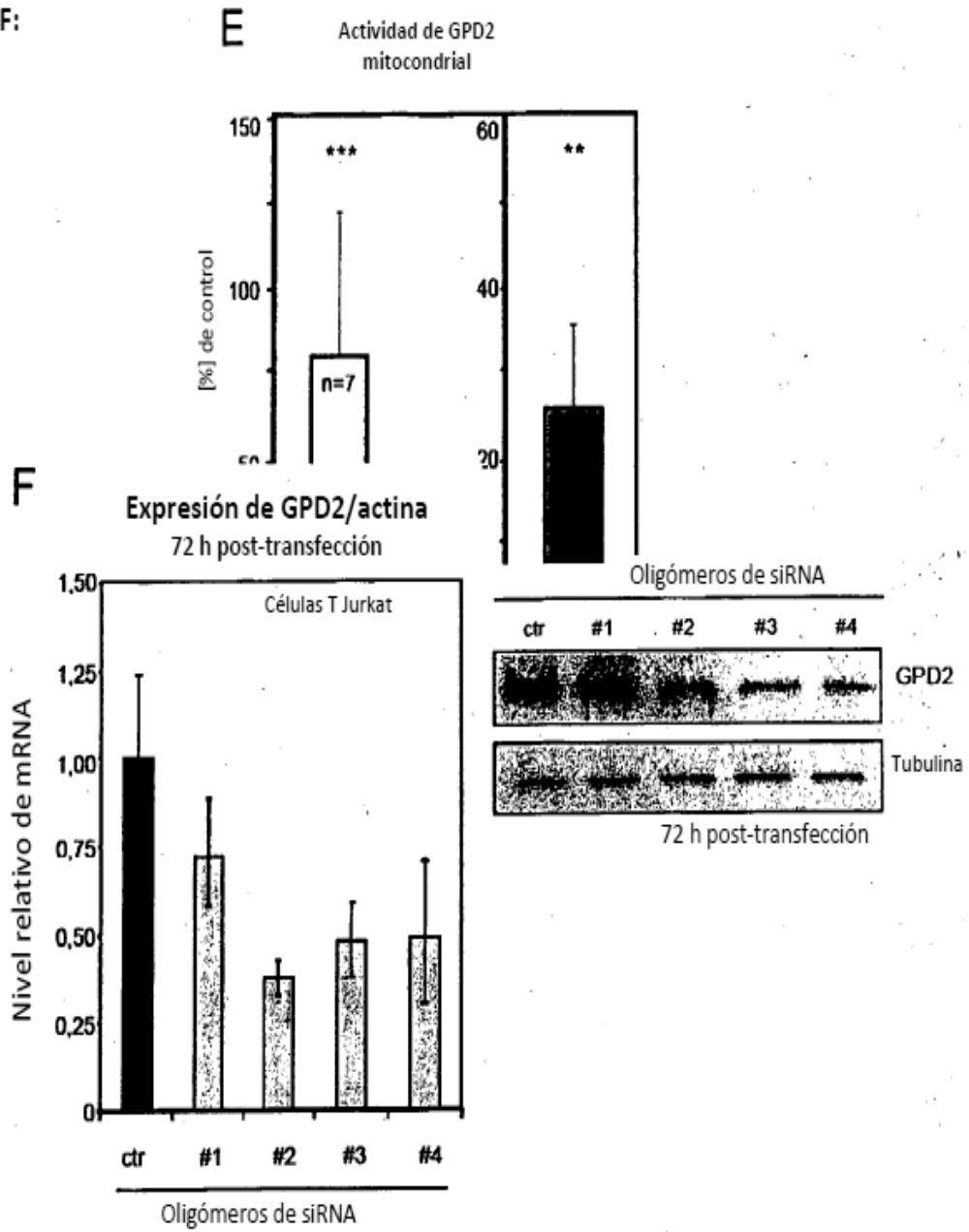


Figura 3 G-H:

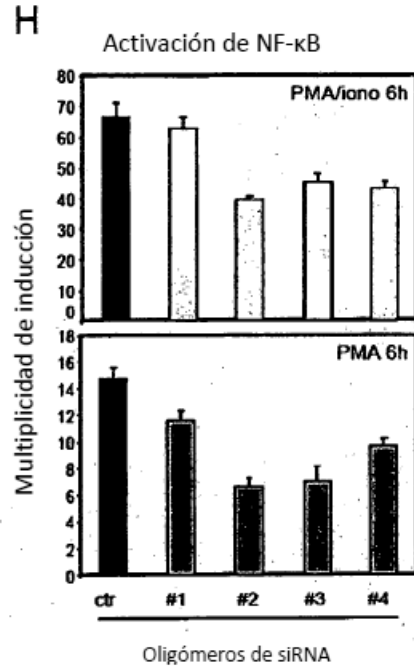
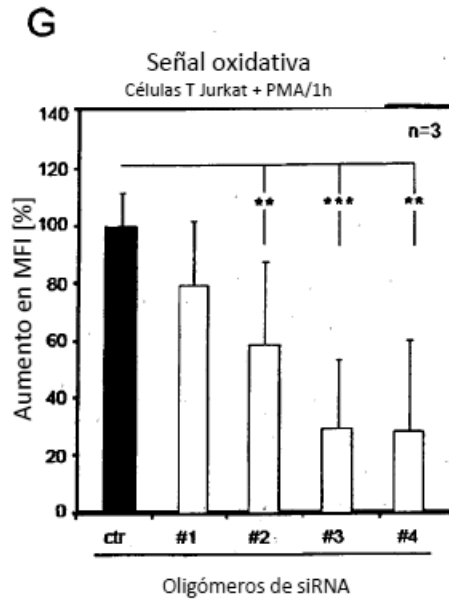


Figura 3 I:

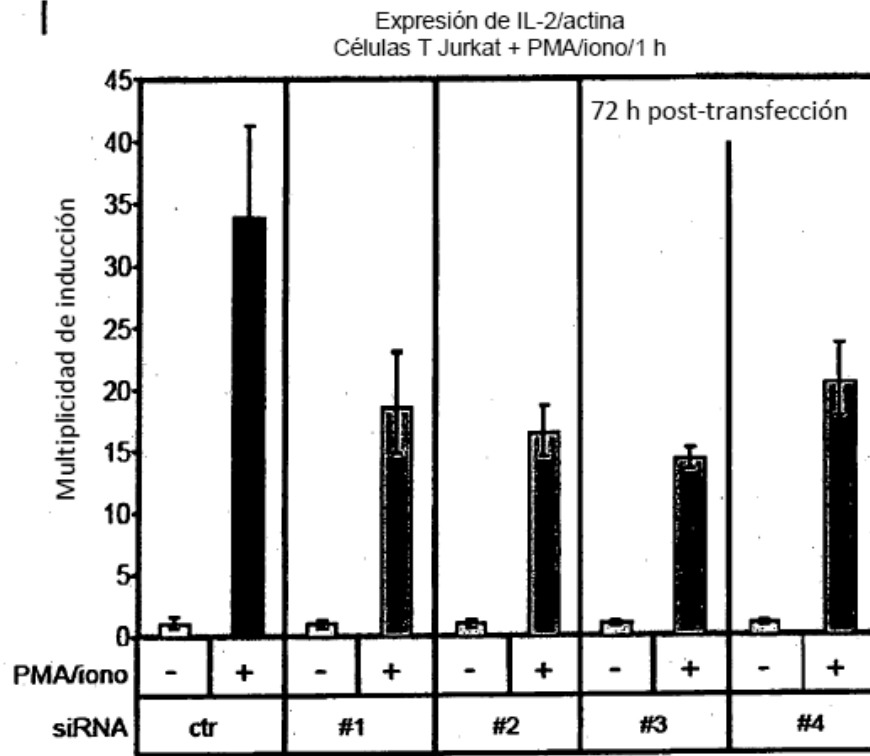
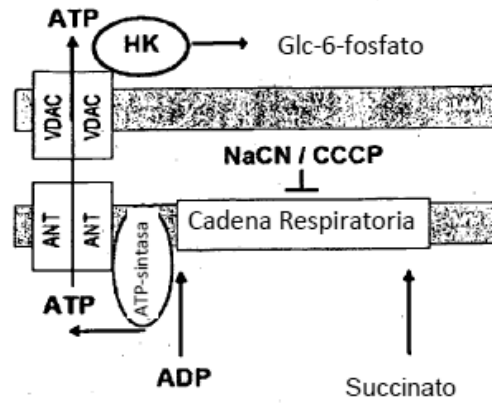


Figura 4 A-B:

A

Disposición experimental



B

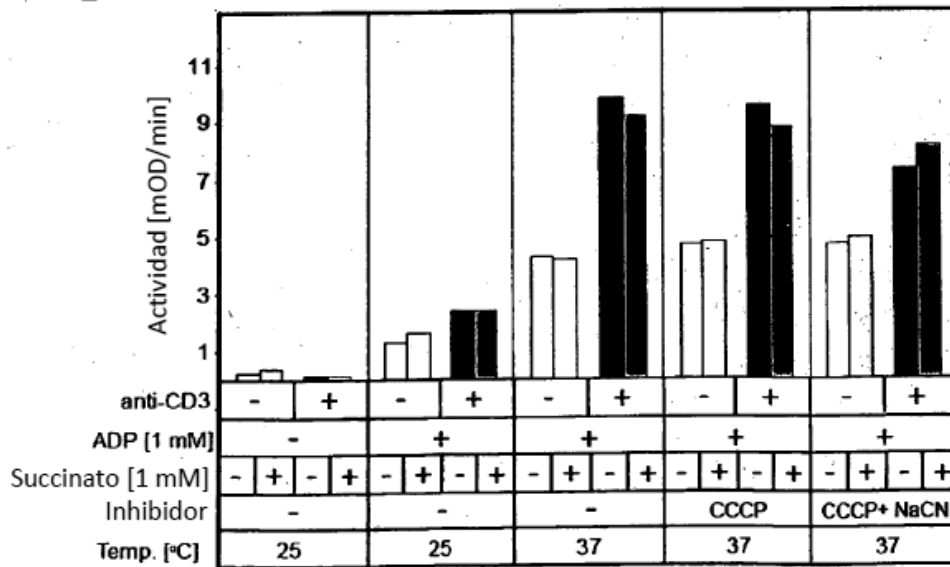


Figure 4 C-D:

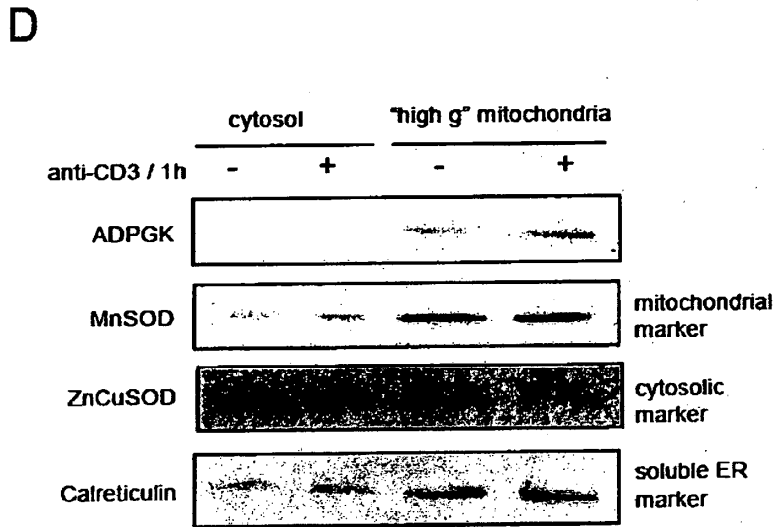
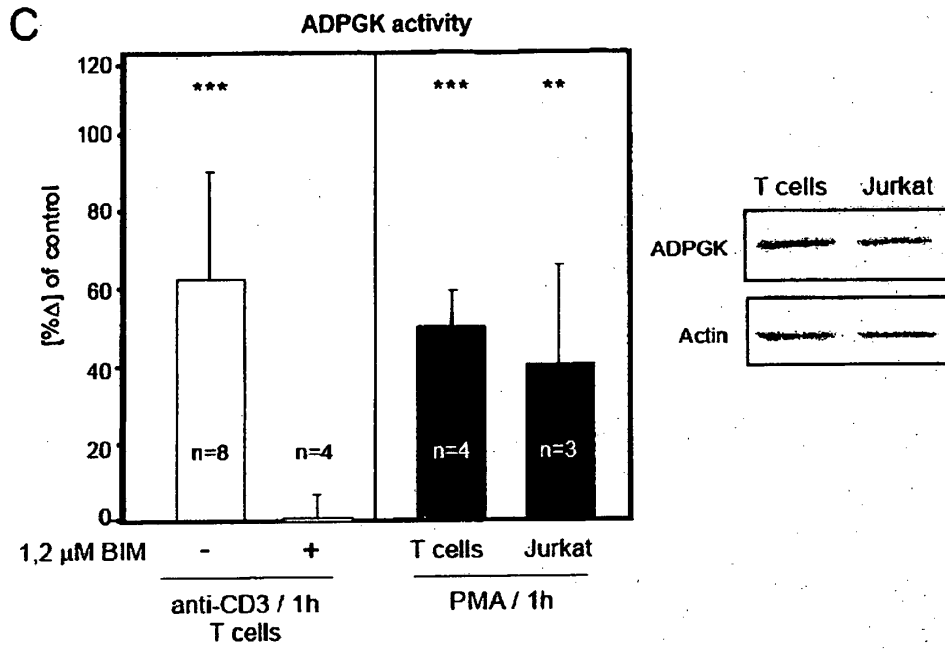


Figura 4 E:

E

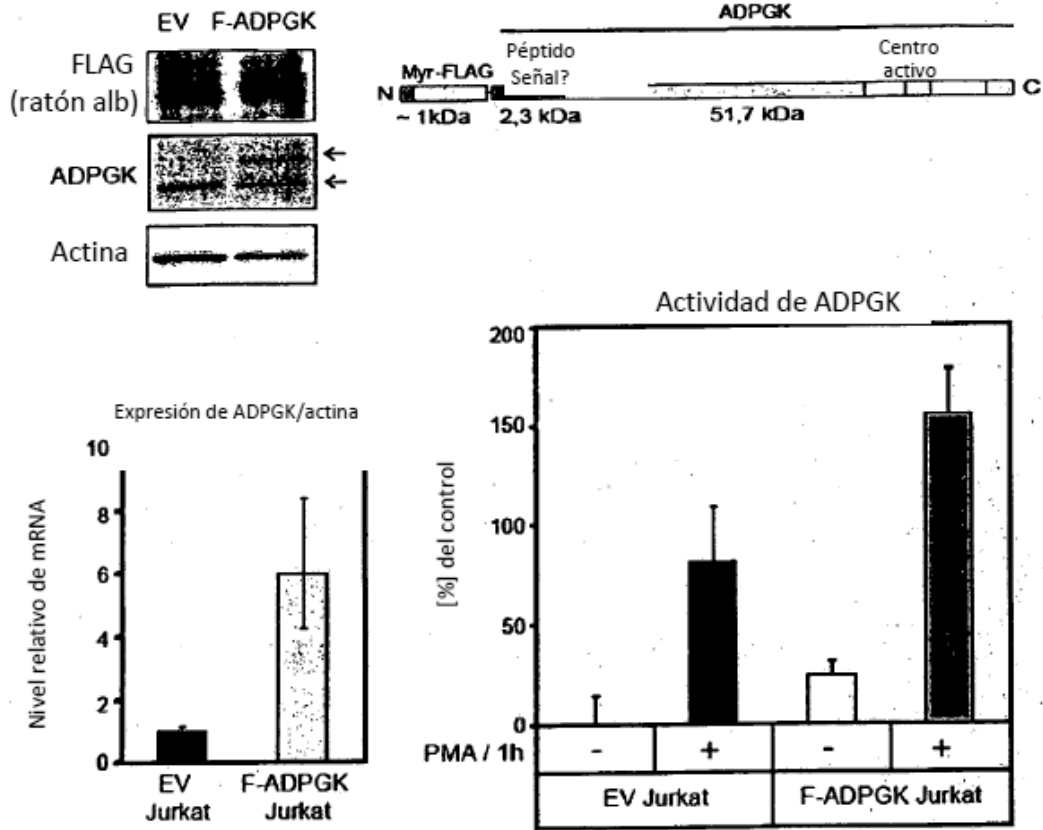
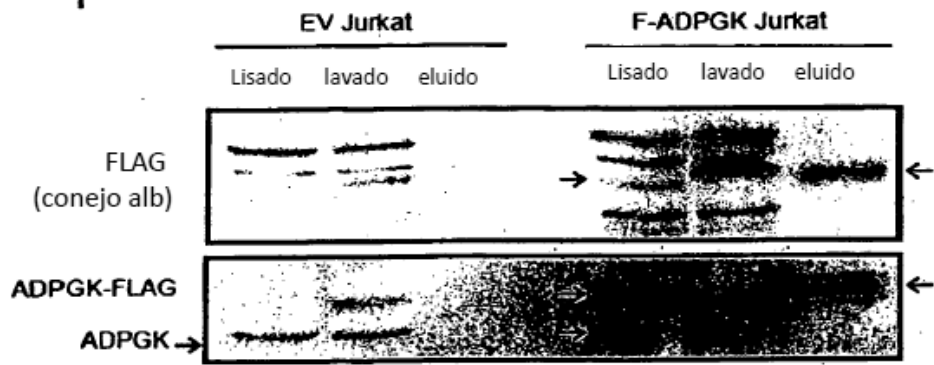


Figura 4 F:

F



Actividad de ADPGK

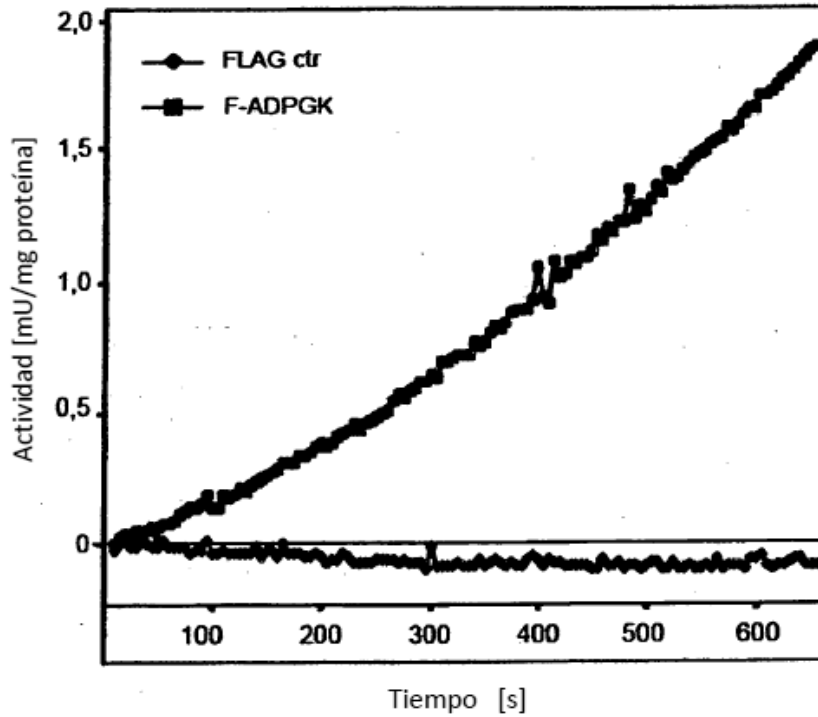
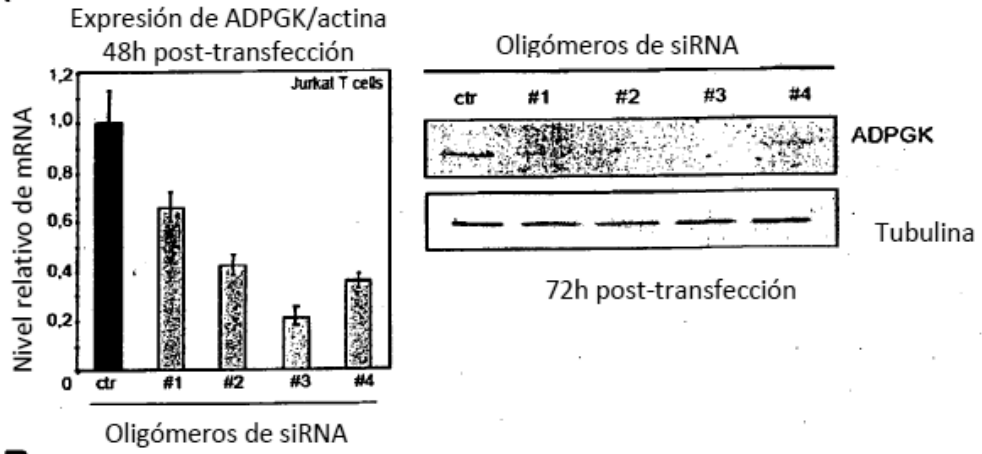


Figura 5A-B:

A



B

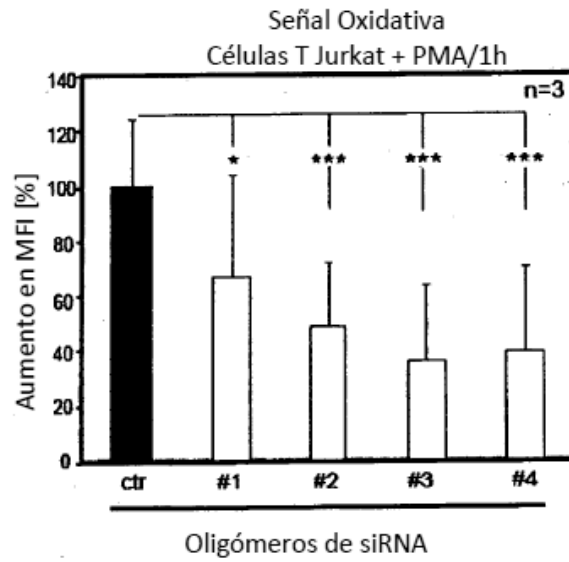


Figura 5C:

C

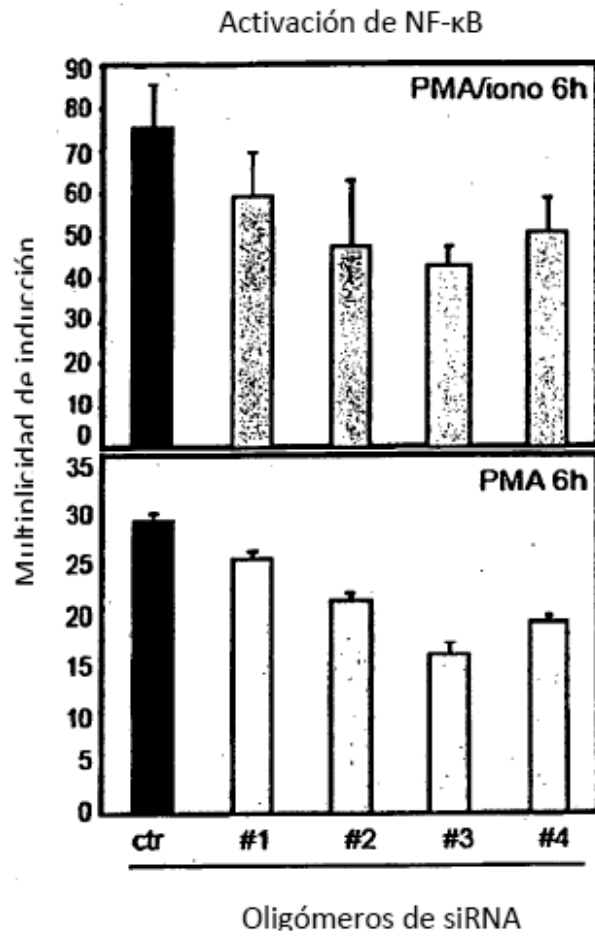


Figura 5D:

D

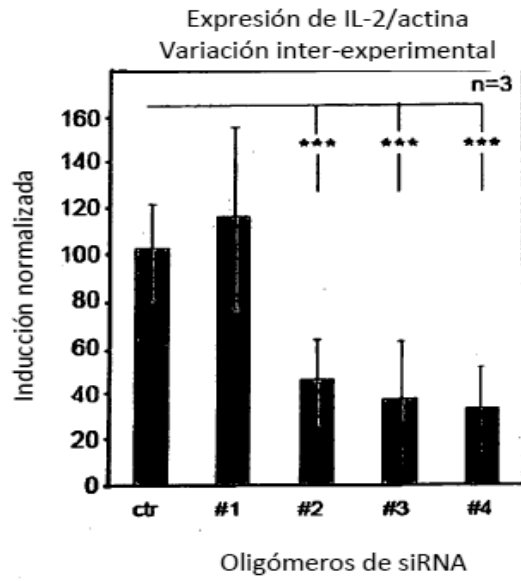
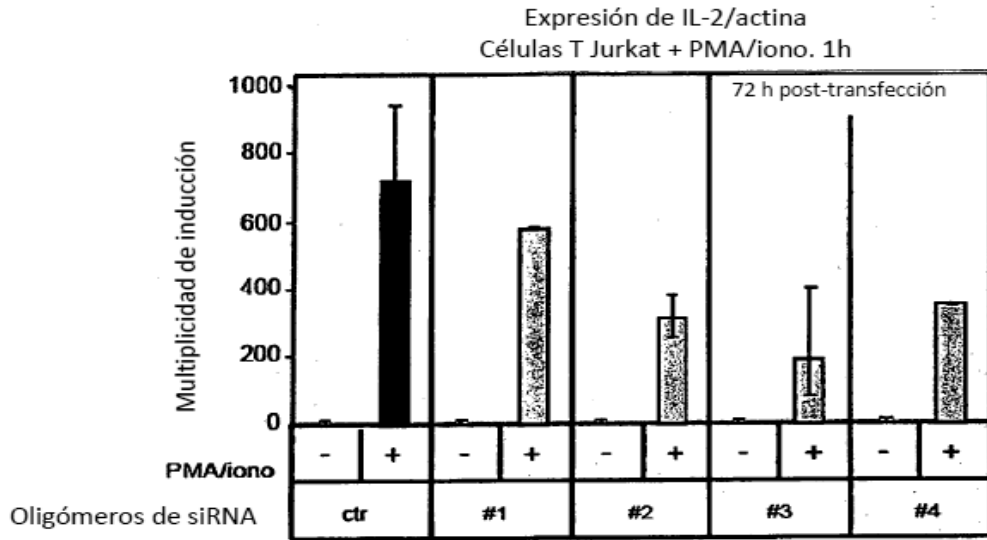
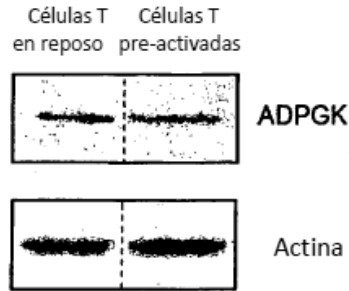


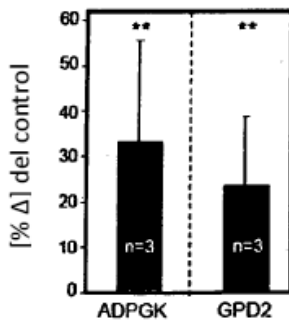
Figura 5E-G:

E



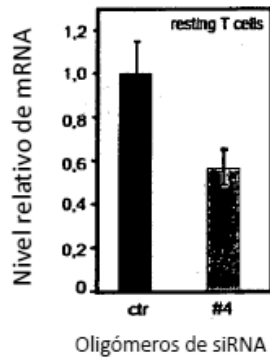
F

Actividad de ADPGK y GPD2
Células T en reposo + anti-CD3/1h



G

Expresión de ADPGK/actina
72h post-transfección



Señal oxidativa
Células T en reposo + PMA/1h

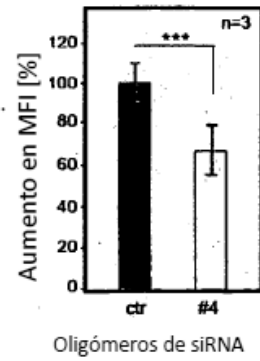
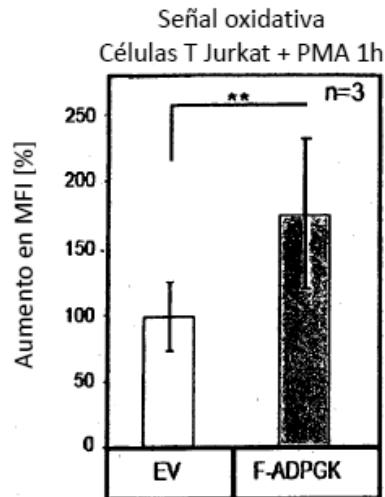


Figura 6A-B:

A



B

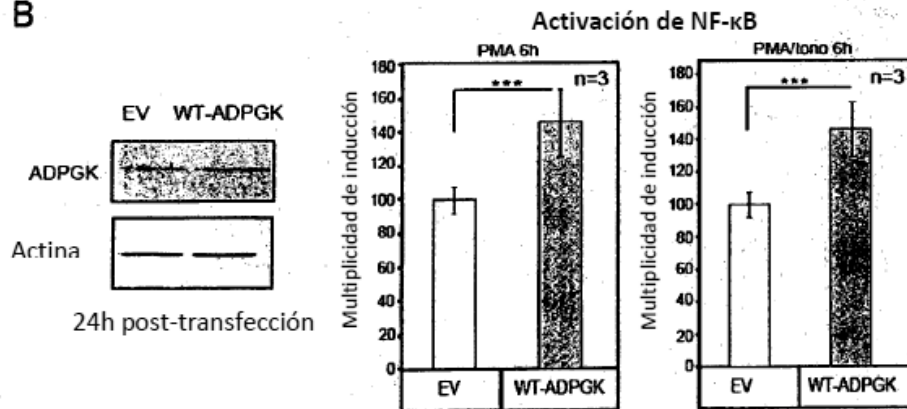


Figura 6C:

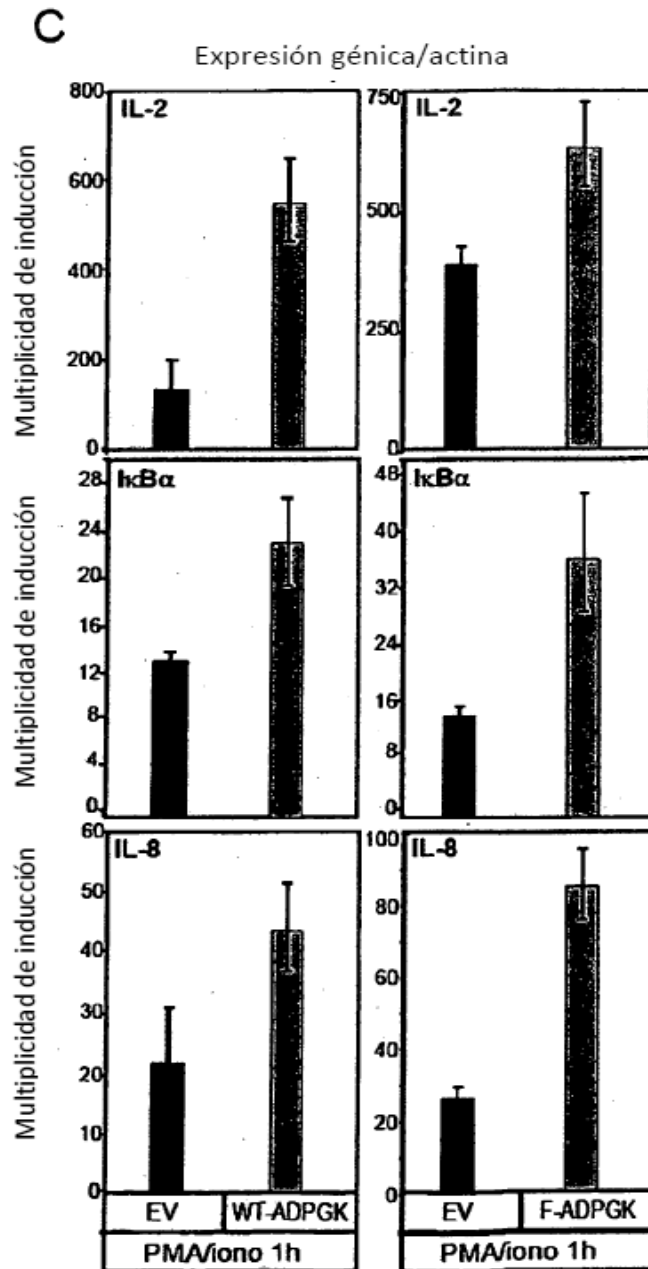
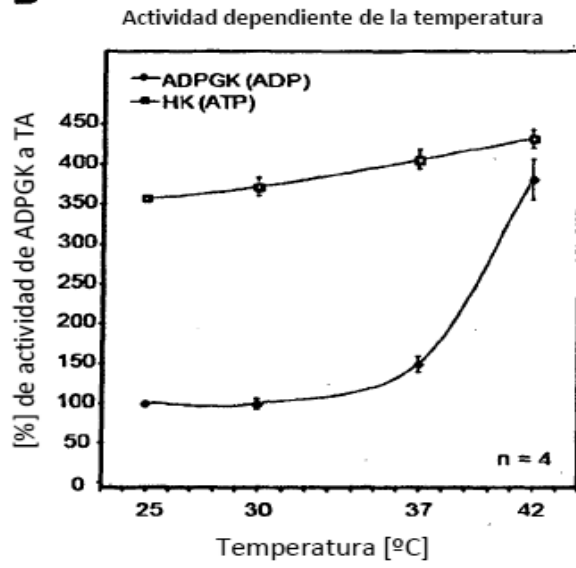


Figura 6D-E:

D



E

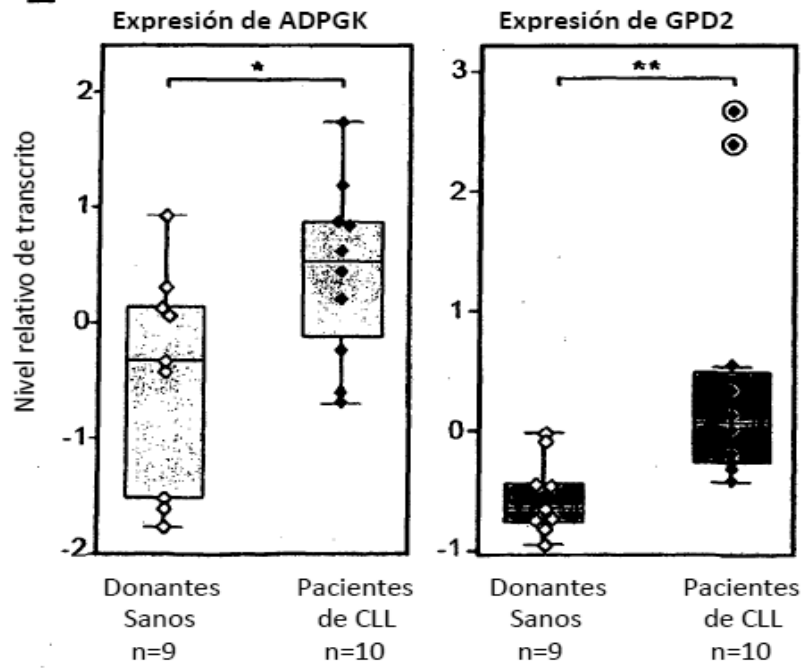


Figura 6F:

F

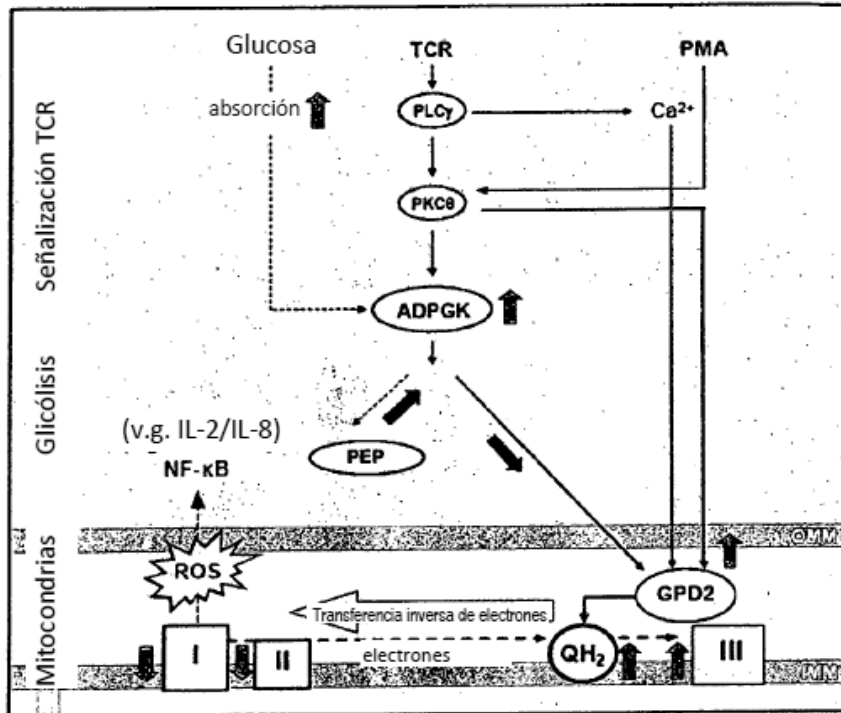


Figura 7 A: A

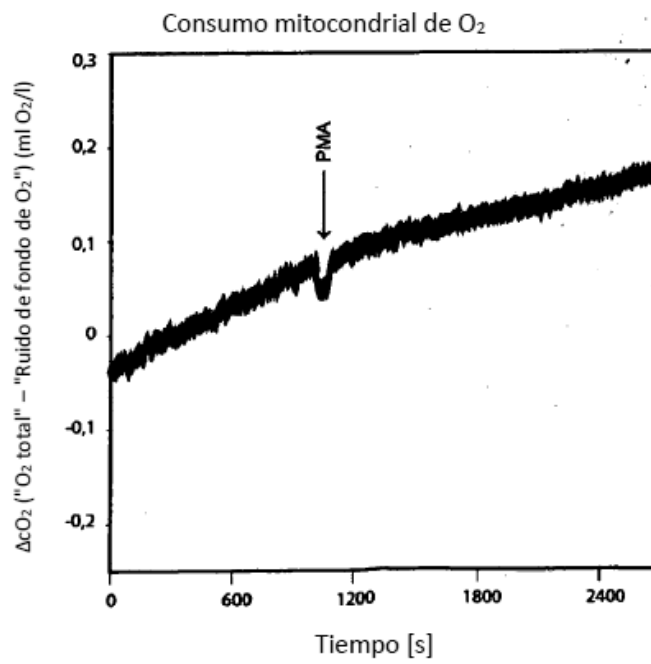
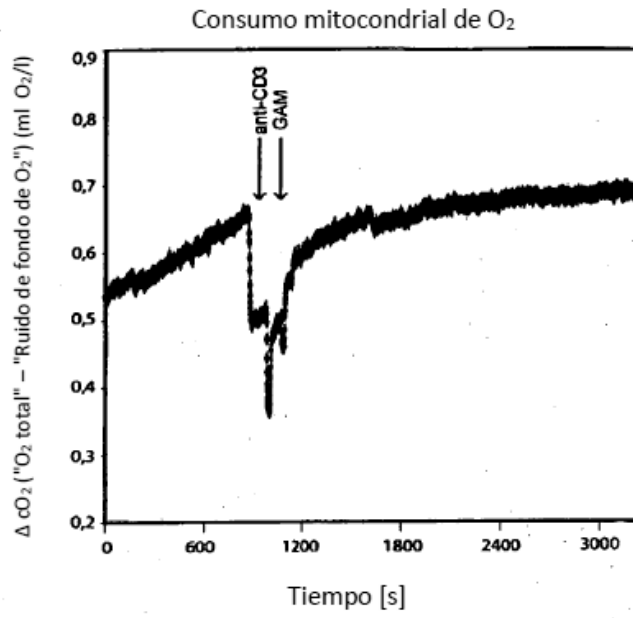


Figura 7 B:

B

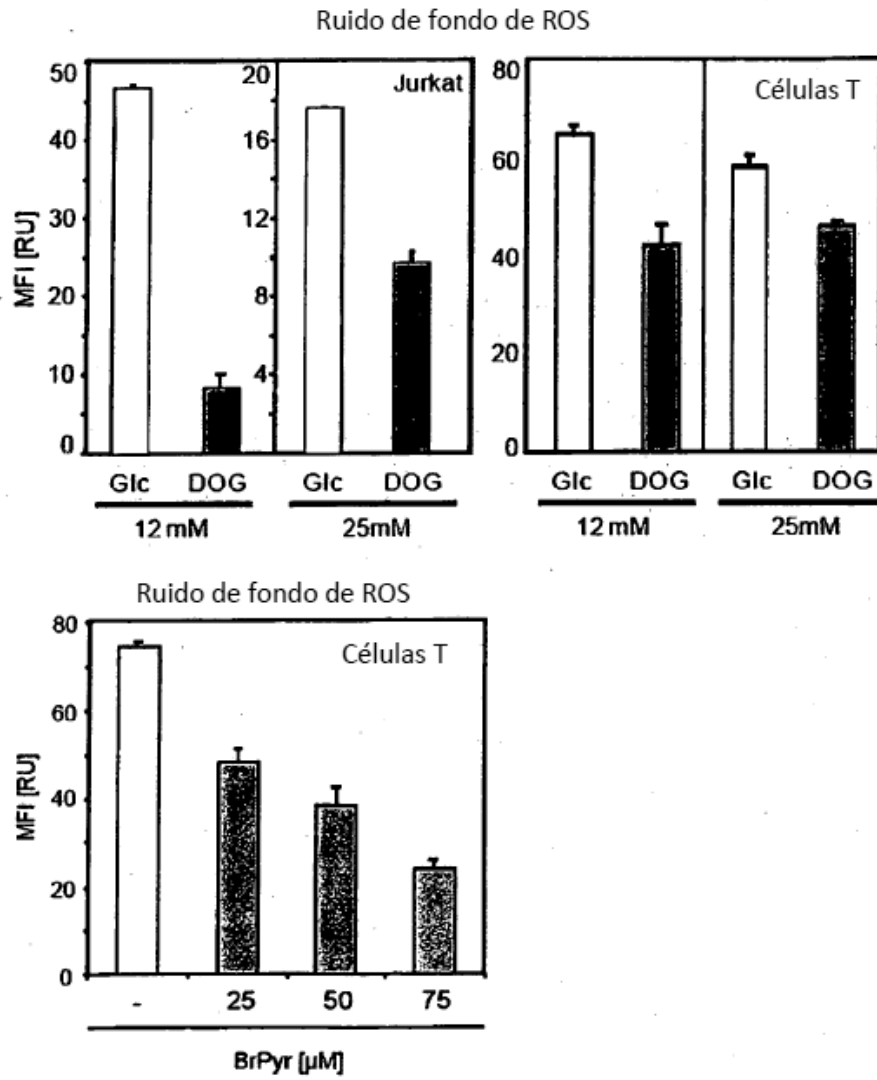
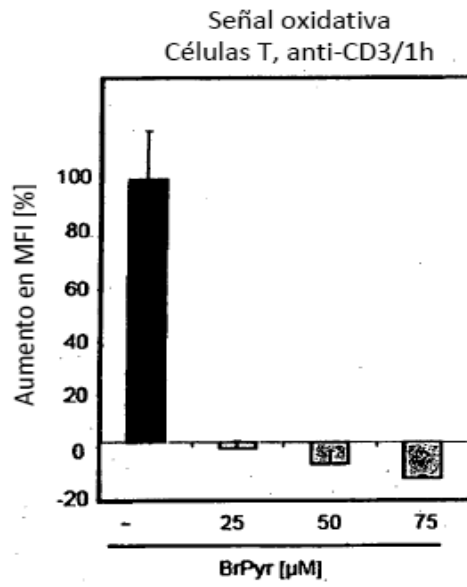


Figura 7 C-D:

C



D

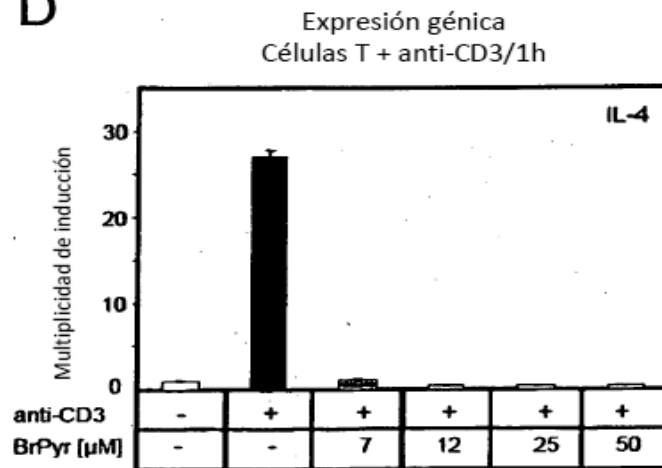


Figura 8A:
A

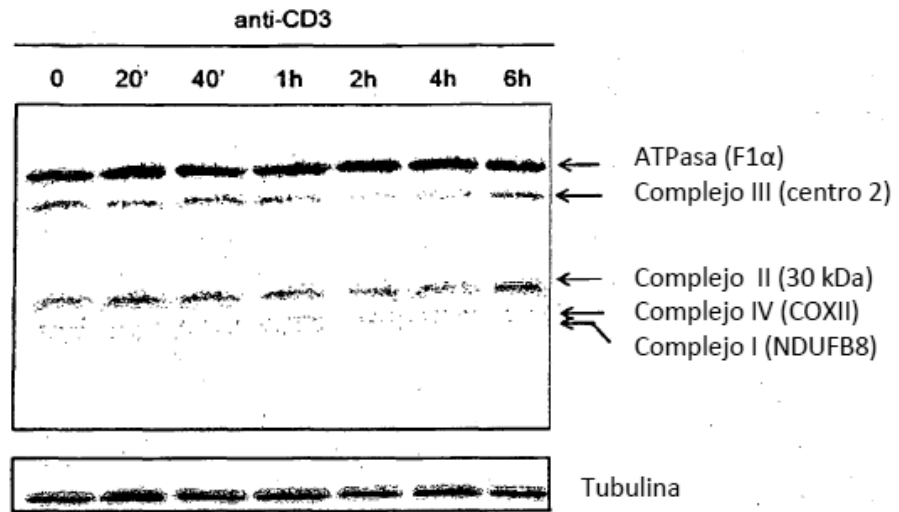


Figura 8B:

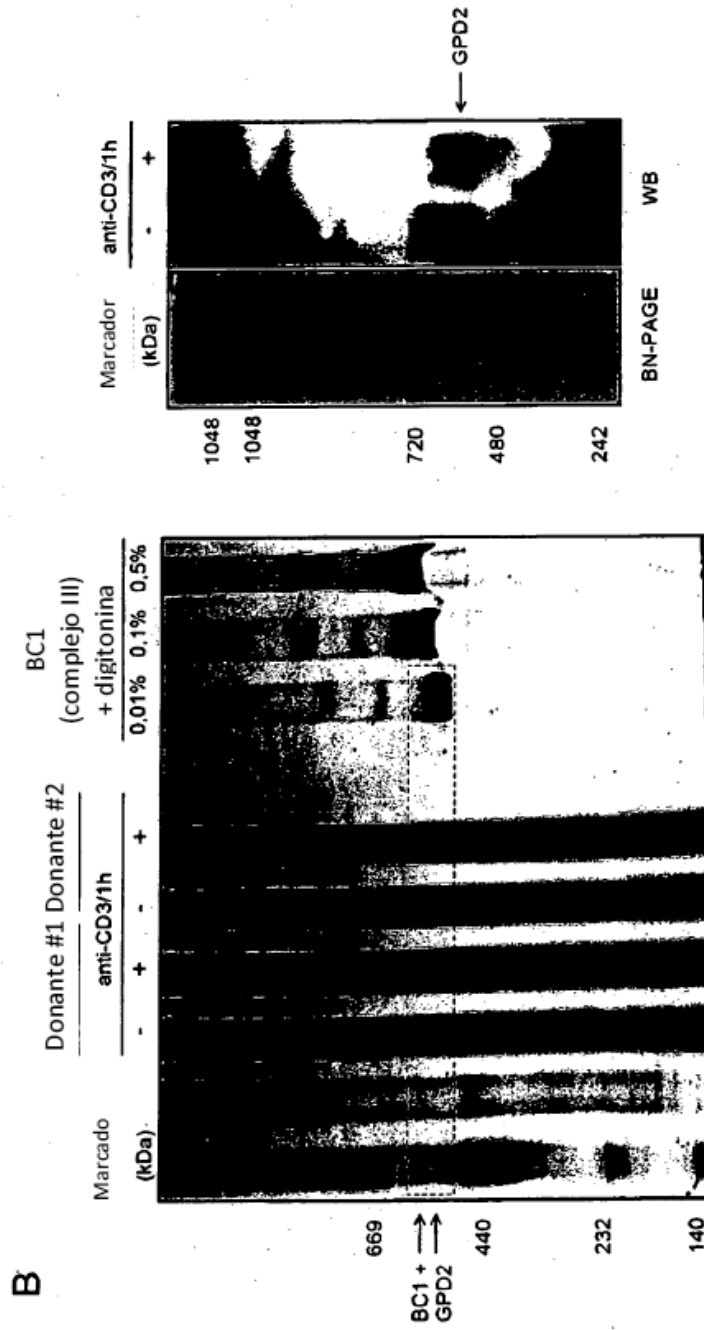


Figura 9A:

A

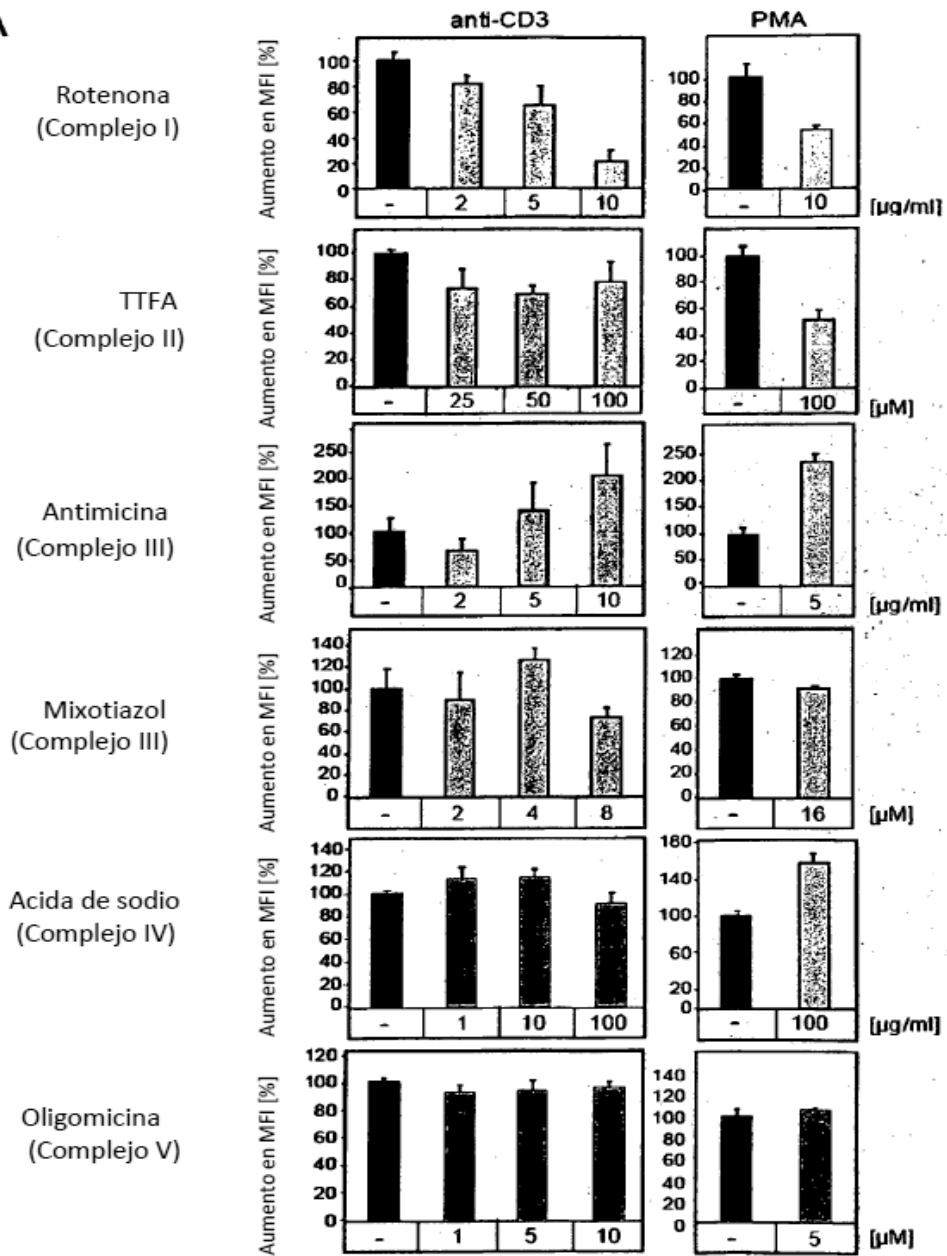


Figura 9B:

B

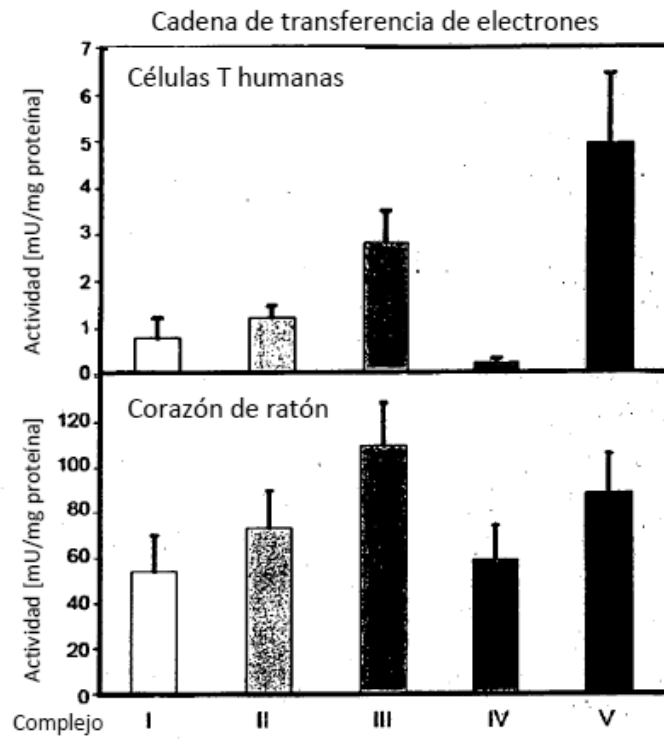
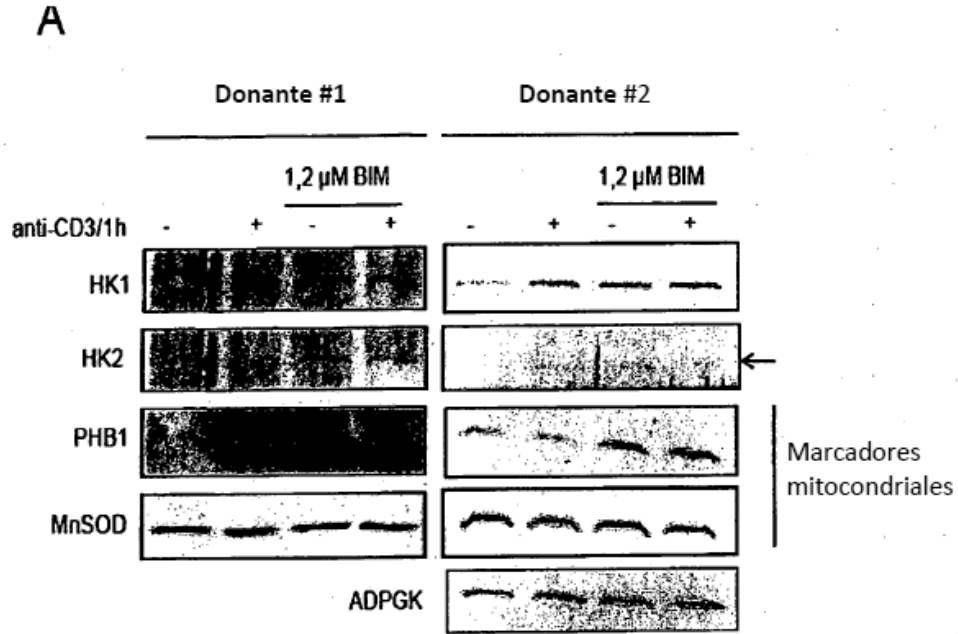


Figura 10A-B:



B

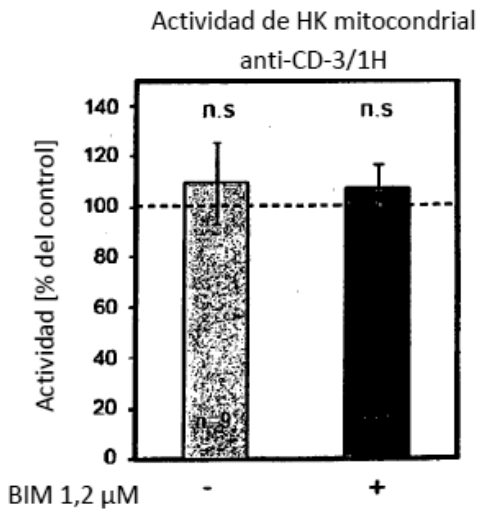
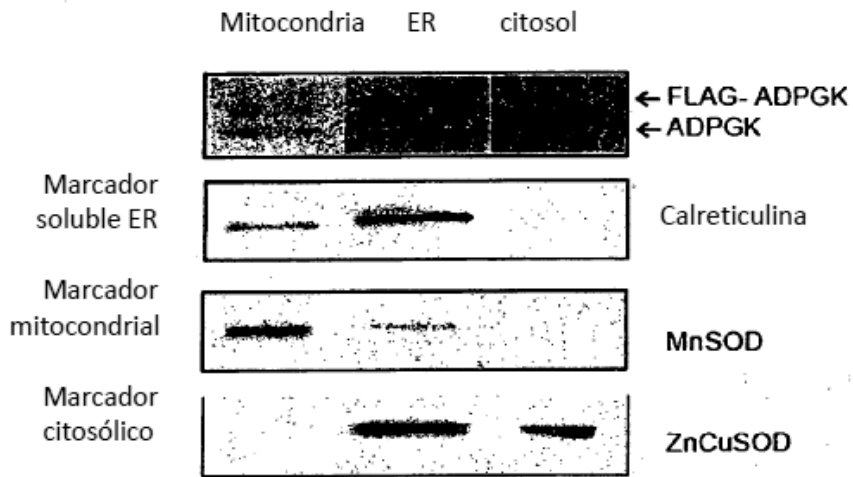


Figura 11A-B:

A



B

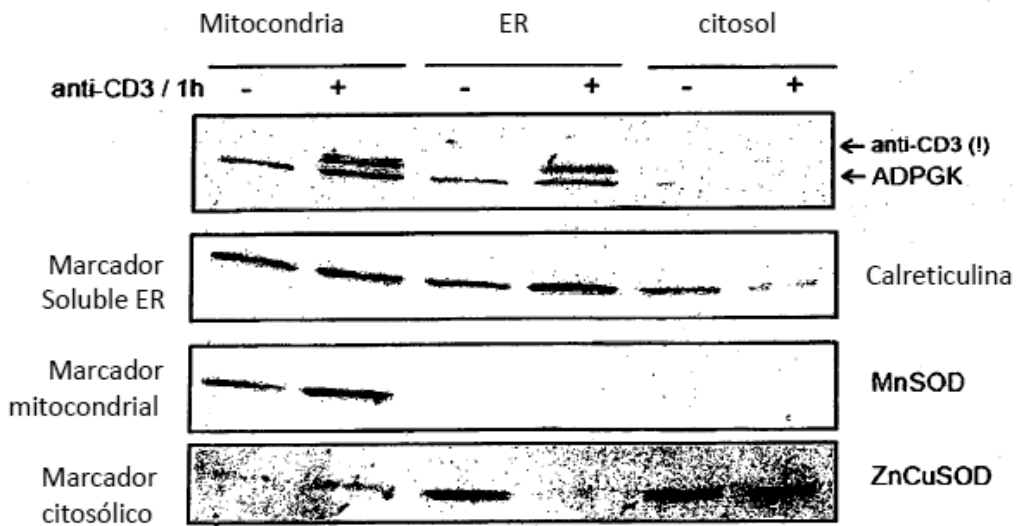


Figura 12:

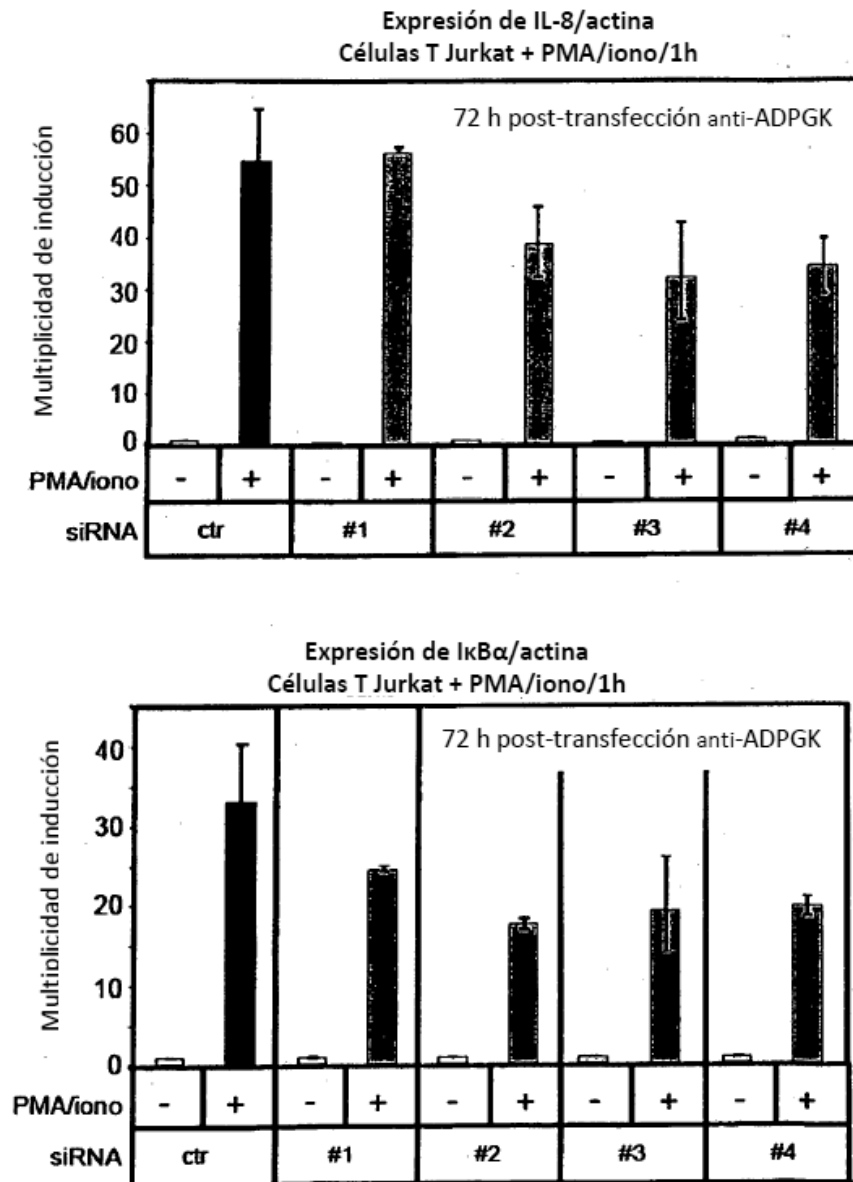


Figura 13:

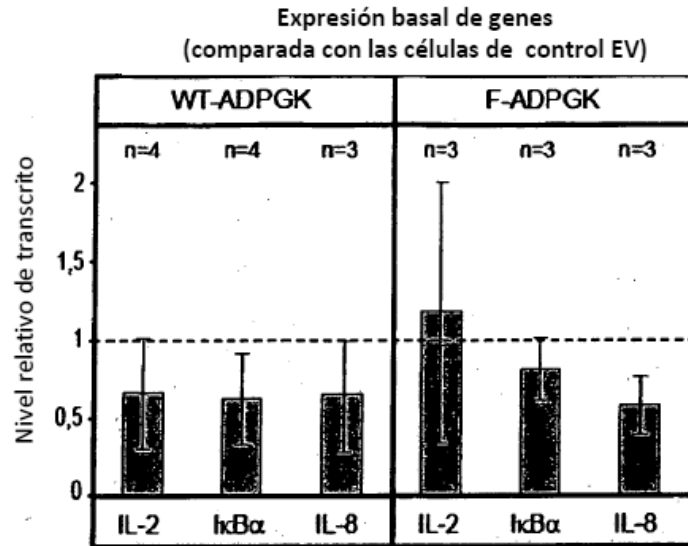
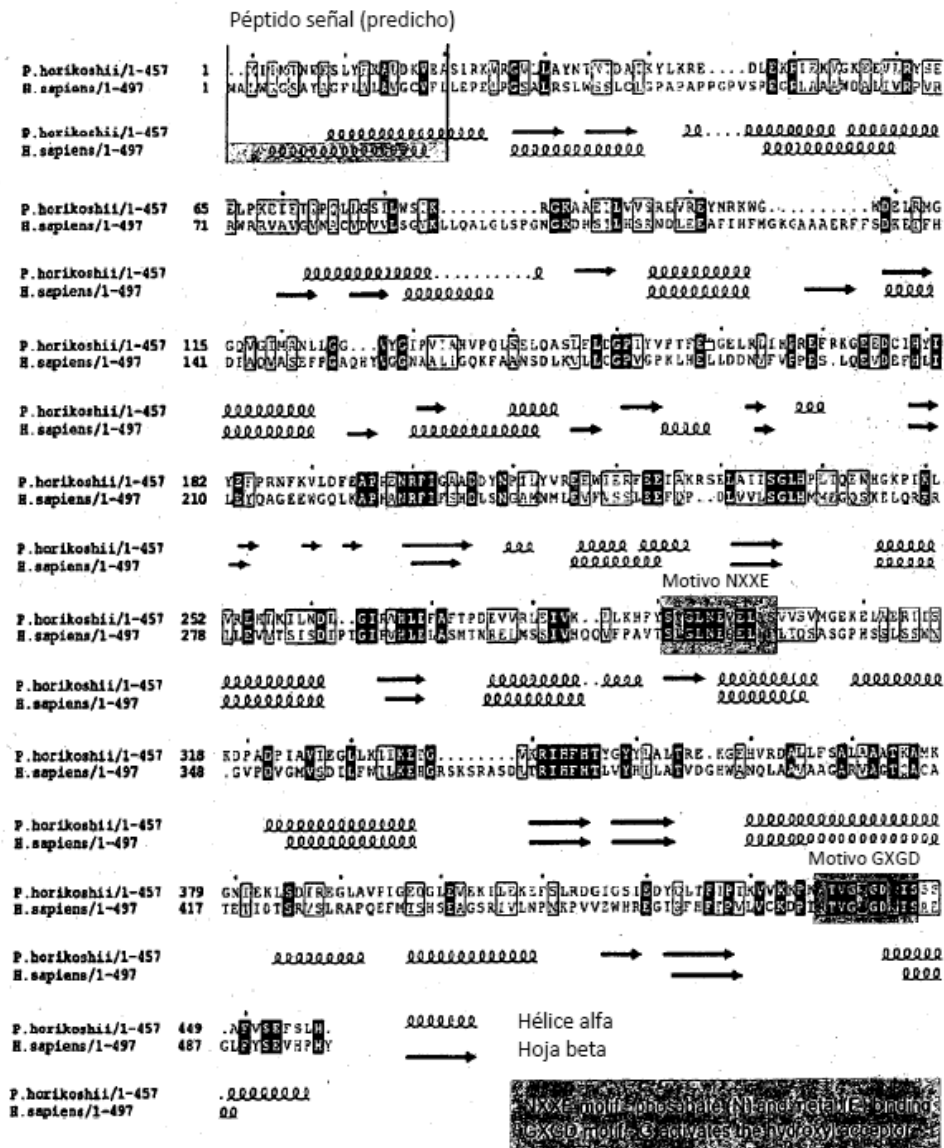


Figura 14:



(Ilegible)