

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 638 370**

51 Int. Cl.:

A61K 31/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.11.2010 PCT/EP2010/067975**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.05.2011 WO11061340**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.11.2010 E 10784754 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.06.2017 EP 2503997**

54 Título: **Inhibidores del complejo PP1/GADD34 para el tratamiento de una afección que requiera una actividad inmunosupresora**

30 Prioridad:

23.11.2009 EP 09306124

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

20.10.2017

73 Titular/es:

**INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (33.3%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE (33.3%) y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (33.3%)**

72 Inventor/es:

PIERRE, PHILIPPE

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 638 370 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inhibidores del complejo PP1/GADD34 para el tratamiento de una afección que requiera una actividad inmunosupresora

Campo de la invención:

- 5 La presente invención se refiere a un inhibidor de la actividad o de la formación del complejo PP1/GADD34 para uso en el tratamiento de una afección inflamatoria.

Antecedentes de la invención:

Las células dendríticas (DC) son reguladores de la respuesta inmunitaria cuyas actividades de procesamiento de antígenos son controladas en respuesta a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Las DC son más eficaces en la iniciación de las respuestas específicas de antígenos, induciendo la diferenciación de los linfocitos T vírgenes. Tras estimulación por receptores de reconocimiento de patrones, las DC comienzan un proceso de maduración caracterizado por cambios funcionales, tales como producción de citoquinas (por ejemplo, IL-12) o sobrerregulación de la presentación de antígenos [Mellman, I. et al., 2001]. El RNA bicatenario (ds-RNA) presente como genoma viral o en células infectadas viralmente es reconocido por el receptor tipo Toll 3 (TLR3), que es expresado por varios tipos de células especializadas incluyendo las DC [Alexopoulou, L., et al. 2001]. Por estimulación con poli I:C, un imitador del dsRNA, TLR3, desencadena una cascada de señalización compleja que conduce a la producción de interferones (IFN) de tipo I [Alexopoulou, L. et al., 2001 and Kawai, T. et al., 2006]. Además del TLR3 unido a membranas, otro receptor de dsRNA intracelular, el gen 5 asociado a la diferenciación de melanoma (MDA5) por RNA helicasa induce la producción de IFN de tipo I en respuesta a poli I:C por medio de una cascada de señalización diferente que también conduce a la translocación nuclear de los factores reguladores de interferón, IRF-3 e IRF-7 [Kawai, T. et al., 2006 and Gitlin, L. et al., 2006]. Una vez unidos a su receptor sobre la superficie celular, los interferones de tipo I activan tirosina-quinasa de Janus/transductor de señal y la vía del activador, que induce la expresión de un amplio espectro de genes celulares. Entre éstos, está la proteína quinasa R (PKR) dependiente de RNA bicatenario, una pieza clave de la acción antiviral mediada por interferón, que está implicada en la diferenciación celular y la apoptosis [Donze, O. et al., 2004 and Scheuner, D. et al., 2006].

La PKR también es activada por el dsRNA en el citosol y desencadena la fosforilación del factor 2-alfa eucariota de iniciación de la traducción (eIF2- α) en la serina 51 [Proud, C. G., 1995 and Williams, B.R., 1999] que conduce a la interrupción de la síntesis de proteínas y a la inhibición de la replicación viral. Además de la detección de dsRNA, diferentes señales de estrés desencadenan la fosforilación de eIF2- α , atenuando así la traducción del mRNA y activando los programas de expresión génica conocidos globalmente como la respuesta integrada al estrés (ISR) [Harding, H. P. et al., 2003]. Hasta la fecha, se han identificado cuatro quinasas que median en la ISR: PKR, PERK (quinasa del retículo endoplasmático (ER) similar a la proteína quinasa de RNA (PKR)) [Harding, H.P., et al., 2000], GCN2 (quinasa 2 de control general no desrepresora) [Zhang, P. et al. 2002 and Berlanga, J. J. et al. 2006] y HRI (inhibidor regulado por hemina) [Chen, J. J. et al., 1995 and Lu, L., et al., 2001]. La fosforilación de eIF2- α mediada por estrés del ER es realizada por la PERK, que es activada por un exceso de proteínas desplegadas que se acumulan en el lumen del ER [Harding, H.P., et al., 2000]. La PERK activada fosforila el eIF2- α , atenuando la síntesis de proteínas y desencadenando la traducción de moléculas específicas, tales como el factor de transcripción activador ATF4, que es necesario para montar parte de una ISR particular, conocida como la respuesta a proteínas desplegadas (UPR) [Ron, D. & Walter, P., 2007 and Todd, D.J., et al., 2008 and Zhang, K. & Kaufman, R.J. et al., 2008].

Curiosamente, la detección de dsRNA por TLR3, MDA5 y PKR es probable que ocurra simultáneamente en células como las DC, dando como resultado por tanto potencialmente episodios de señalización en conflicto y efectos biológicos opuestos (por ejemplo, activación celular frente a la detención de la traducción y/o anergia).

Los inventores demuestran en la presente invención que la detección de poli I:C por las DC o fibroblastos activa el circuito de control con retroalimentación negativa de la UPR e induce la desfosforilación del eIF2- α a través de la fosfatasa 1 (PP1) y la expresión de su cofactor inducible, la proteína 34 inducible por daño al DNA y por detección del crecimiento (GADD34/MyD116) [Connor, J.H., et al., 2001]. Como consecuencia, la detención de la traducción, normalmente mediada por medio de la fosforilación del eIF2- α en respuesta a la detección de dsRNA citosólico, la privación de taspigargina o triptófano, es evitada en las DC activadas. Este fenómeno permite que las DC realicen su función inmunitaria, en condiciones bajo las cuales la detención de la traducción perjudicaría normalmente su actividad. Este punto es ilustrado por la demostración de que la ausencia de inhibición de la traducción inducida por estrés en las DC activadas es esencial para producir cantidades normales de interferón- β y para prevenir la escisión de la caspasa-3 y la apoptosis y porque las DC inactivadas para el gen GADD34 son incapaces de producir citoquinas.

55 Como es sabido, las DC desempeñan un papel importante en afecciones inflamatorias como las enfermedades autoinmunitarias liberando citoquinas inflamatorias como interferón- β o IL-12. Por tanto, la inhibición de GADD34 podría permitir el control de la respuesta inmunitaria hiperactiva en afecciones patógenas como las enfermedades autoinmunitarias o el rechazo de injertos bloqueando la liberación de citoquinas inflamatorias por las DC u otras

células.

Hasta el momento, muy pocos tratamientos están disponibles para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias o el rechazo de injertos que tengan un índice de seguridad aceptable.

5 Por tanto, existe una necesidad permanente en la técnica de nuevas moléculas para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias o para el rechazo de injertos.

Sumario de la invención:

10 La invención se basa en el descubrimiento de que GADD34 representa una diana nueva y prometedora que controla la inflamación bloqueando la liberación de citoquinas inflamatorias y otros mediadores moleculares segregados que conducen a afecciones patógenas, tales como enfermedades autoinmunitarias o enfermedades infecciosas y no infecciosas que conducen a hipercitoquinemia incluyendo la enfermedad de injerto contra hospedante (GVHD), síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS), sepsis, gripe aviar, viruela y síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS). Los inhibidores de GADD34 ya se conocen para el tratamiento de cáncer, como carcinoma o sarcoma (véase por ejemplo el documento WO 2008028965).

15 Por tanto, la invención se refiere a un inhibidor de la actividad o de la formación del complejo PP1/GADD34 para uso en el tratamiento de una afección inflamatoria.

Descripción detallada de la invención:

Definiciones:

20 Como se usa en la presente memoria, el término "células dendríticas (DC)" denota células inmunitarias que forman parte del sistema inmunitario de los mamíferos. Su función principal es procesar el material antigénico y presentarlo en la superficie a otras células del sistema inmunitario, actuando así como células presentadoras de antígenos.

25 Como se usa en la presente memoria, el término "enfermedades autoinmunitarias" denota una respuesta inmunitaria hiperactiva del cuerpo frente a sustancias y tejidos presentes normalmente en el cuerpo. En otras palabras, el cuerpo ataca realmente sus propias células. Esto puede estar restringido a ciertos órganos (por ejemplo, en la tiroiditis) o implicar un tejido particular en diferentes lugares (por ejemplo, la enfermedad de Goodpasture que puede afectar a la membrana basal tanto en el pulmón como en el riñón). El tratamiento de enfermedades autoinmunitarias es típicamente con medicación inmunosupresora que disminuye la respuesta inmunitaria.

30 Como se usa en la presente memoria, el término "poli I:C" (ácido poliinosínico:policitidílico o sal sódica del ácido poliinosínico-policitidílico) denota un inmunoestimulante. Se utiliza para simular infecciones virales. Se sabe que el poli I:C interacciona con el receptor tipo Toll (TLR) 3, que se expresa en los compartimentos intracelulares de los linfocitos B y las células dendríticas. El poli I:C es estructuralmente similar al RNA bicatenario, que está presente en algunos virus y es un estimulante "natural" de TLR3. Por tanto, el poli I:C puede ser considerado un análogo sintético del RNA bicatenario y es una herramienta común para la investigación científica sobre el sistema inmunitario.

35 Como se usa en la presente memoria, el término "GADD34" para la "proteína 34 inducible por daño al DNA" o MyD116 denota una proteína que interacciona con el inhibidor de proteína 1 (I-1) que se asocia con el extremo C del I-1 humano. La GADD34, cuya expresión en células de mamífero se eleva por la detención del crecimiento, daño al DNA, y otras formas de estrés celular, tiene una homología estructural con una región del factor de neurovirulencia del herpesvirus simple (HSV-1) ICP-345, mostrado anteriormente unido a PP1. Una secuencia ilustrativa para el gen GADD34 humano (PPP1R15A) está depositada en la base de datos NCBI con el número de acceso NW_927240.1 y mRNA U83981.1.

40 Como se usa en la presente memoria, el término "un inhibidor de la formación del complejo PP1/GADD34" denota un inhibidor capaz de competir en el intervalo μM con GADD34 para formar un complejo con PP1 y por tanto hacer que dicho complejo sea no funcional o bloquear la expresión de GADD34 o hacer que GADD34 sea estructuralmente inactiva. En otras palabras, "un inhibidor de la formación del complejo PP1/GADD34" tendrá una EC_{50} no mayor que $50 \mu\text{M}$ y preferiblemente no mayor que $25 \mu\text{M}$.

45 Como se usa en la presente memoria, el término "un inhibidor de la actividad del complejo PP1/GADD34" denota un inhibidor en el intervalo μM que es responsable de la no expresión de dicho complejo en la célula y/o de la no inducción de una reacción del sistema inmunitario o de una reacción disminuida del sistema inmunitario en comparación con su reacción en ausencia de dicho inhibidor. En otras palabras, "un inhibidor de la actividad del complejo PP1/GADD34" tendrá una EC_{50} no mayor que $50 \mu\text{M}$ y preferiblemente no mayor que $25 \mu\text{M}$.

50 Como se usa en la presente memoria, el término "inhibidor selectivo" denota un compuesto que solo inhibe la actividad o expresión de GADD34, sin afectar la actividad del activador no inducible de PP1, CreP, o la actividad de PP1 fuera del complejo de GADD34.

Como se usa en la presente memoria, el término "proteína fosfatasa 1 (PP1)" denota una proteína eucariota principal serina/treonina-fosfatasa que regula una enorme variedad de funciones celulares a través de la interacción de su

subunidad catalítica (PP1c) con más de cincuenta diferentes subunidades reguladoras establecidas o supuestas.

Como se usa en la presente memoria, el término "injerto" se refiere a una célula, tejido, órgano o cualquier otra retículo biológico compatible para trasplante.

- 5 Como se usa en la presente memoria, el término "rechazo de injerto" denota el rechazo agudo o crónico de células, tejidos o aloinjertos o xenoinjertos de órganos sólidos de por ejemplo islotes pancreáticos, células madre, médula ósea, piel, músculo, tejido córneo, tejido neuronal, corazón, pulmón, corazón-pulmón combinados, riñón, hígado, intestino, páncreas, tráquea o esófago o enfermedades de injerto contra hospedante.

Como se usa en la presente memoria, el término "alogénico" denota un injerto procedente de un animal diferente de la misma especie.

- 10 Como se usa en la presente memoria, el término "xenogénico" denota un injerto procedente de un animal de una especie diferente.

Como se usa en la presente memoria, el término "trasplante" denota un retículo biocompatible o un tejido, órgano o célula donantes, para ser trasplantados. Un ejemplo de un trasplante puede incluir, aunque sin limitación, piel, médula ósea y órganos sólidos, tales como corazón, páncreas, riñón, pulmón e hígado.

- 15 Como se usa en la presente memoria, los términos "tratar" o "tratamiento", denota invertir, aliviar, inhibir el progreso o prevenir el trastorno o afección al que se aplica dicho término, o uno o más síntomas de dicho trastorno o afección.

Inhibidores y sus usos

Un primer aspecto de la invención se refiere a un inhibidor de la actividad o de la formación del complejo PP1/GADD34 para uso en el tratamiento de una afección inflamatoria.

- 20 En una primera realización, el inhibidor de acuerdo con la invención es útil para el tratamiento de afecciones inflamatorias.

- 25 Como se usa en la presente memoria, el término "afección(es) inflamatoria(s)" denota una respuesta biológica caracterizada por componentes celulares y bioquímicos. Por ejemplo, el componente celular se caracteriza por la migración de leucocitos (hinchamiento) y el componente bioquímico se caracteriza por activación del sistema del complemento o por la producción de mediadores, quimioquinas y citoquinas.

El inhibidor puede ser útil para el tratamiento de afecciones inflamatorias incluyendo asma, miopatías, síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS), síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), enfermedades inflamatorias intestinales y sepsis.

En otra realización preferida, la afección inflamatoria es sepsis.

- 30 En otra realización preferida, el inhibidor de acuerdo con la invención es un inhibidor de la GADD34

En otra realización preferida, el inhibidor de acuerdo con la invención es un inhibidor de PP1 en complejo con GADD34.

En otra realización preferida, el inhibidor de acuerdo con la invención inhibe el dominio de interacción comprendido entre los residuos de aminoácidos 540 y 600 de la GADD34.

- 35 En una realización preferida, el inhibidor de acuerdo con la invención se selecciona entre salubrinal, tautomicina y caliculina A.

En otra realización preferida, el inhibidor de acuerdo con la invención es un péptido que consiste o comprende un fragmento de la GADD34.

- 40 En otra realización, el inhibidor de acuerdo con la invención es un inhibidor selectivo de la GADD34. Un inhibidor selectivo de acuerdo con la invención se puede encontrar en la solicitud de patente WO2008028965.

En una realización preferida, el inhibidor selectivo se selecciona de pequeños RNA inactivantes u otros compuestos capaces de bloquear la expresión de la GADD34 en el nivel de transcripción o traducción.

En una realización, el inhibidor de la invención puede ser un inhibidor de bajo peso molecular, por ejemplo una molécula orgánica pequeña (natural o no).

- 45 El término "molécula orgánica pequeña" se refiere a una molécula (natural o no) de un tamaño comparable a las moléculas orgánicas usadas generalmente en productos farmacéuticos. El término excluye macromoléculas biológicas (por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos, etc.). Las moléculas orgánicas pequeñas preferidas varían en tamaño hasta aproximadamente 5000 Da, más preferiblemente hasta 2000 Da y lo más preferiblemente hasta aproximadamente 1000 Da.

En otra realización, el inhibidor de la invención puede consistir en un anticuerpo que inhibe la actividad o la formación del complejo PP1/GADD34 o un fragmento de anticuerpo que inhibe la actividad o la formación del complejo PP1/GADD34.

5 Los anticuerpos dirigidos contra el complejo PP1/GADD34 se pueden producir de acuerdo con métodos conocidos administrando el antígeno o epítipo apropiado a un animal hospedante seleccionado, por ejemplo, cerdos, vacas, caballos, conejos, cabras, ovejas y ratones, entre otros. Se pueden usar varios adyuvantes conocidos en la técnica para potenciar la producción de anticuerpos. Aunque los anticuerpos útiles en la práctica de la invención pueden ser policlonales, se prefieren los anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales contra el complejo PP1/GADD34 se pueden preparar y aislar usando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo por líneas celulares continuas en cultivo. Las técnicas para la producción y el aislamiento incluyen, aunque sin limitación, la técnica del hibridoma descrita originalmente por Kohler and Milstein (1975); la técnica del hibridoma de linfocitos B humanos (Cote et al., 1983); y la técnica EBV-hibridoma (Cole et al., 1985). Alternativamente, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 4.946.778) se pueden adaptar para producir anticuerpos monocatenarios anti-complejo PP1/GADD34. El inhibidor del complejo PP1/GADD34 útil en la práctica de la presente invención incluye también fragmentos de anticuerpos anti-complejo PP1/GADD34 que incluyen, aunque sin limitación, fragmentos F(ab')₂, que pueden ser generados por digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo intacta, y fragmentos Fab, que pueden ser generados reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. Alternativamente, se pueden construir colecciones de expresión de Fab y/o scFv para permitir la identificación rápida de fragmentos que tengan la especificidad deseada para el complejo PP1/GADD34.

Anticuerpos anti-complejo PP1/GADD34 humanizados y sus fragmentos también se pueden preparar de acuerdo con técnicas conocidas. Los "anticuerpos humanizados" son formas de anticuerpos quiméricos no humanos (por ejemplo, de roedores) que contienen una secuencia mínima procedente de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable (CDR) del receptor están sustituidos por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano, que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región de entramado (FR) de la inmunoglobulina humana están sustituidos por residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se hacen para refinar aún más el comportamiento de los anticuerpos. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno y, típicamente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todos o sustancialmente todos los FR son los de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprenderá también opcionalmente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Métodos para preparar anticuerpos humanizados han sido descritos, por ejemplo, por Winter (Patente de EE.UU. N° 5.225.539) y Boss (Celltech, Patente de EE.UU. N° 4.816.397).

Incluso en otra realización, el inhibidor del complejo PP1/GADD34 se puede seleccionar de aptámeros. Los aptámeros son una clase de moléculas que representa una alternativa a los anticuerpos en términos de reconocimiento molecular. Los aptámeros son secuencias de oligonucleótidos u oligopéptidos con la capacidad de reconocer virtualmente cualquier clase de moléculas diana con altas afinidad y especificidad. Dichos ligandos se pueden aislar por evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (SELEX) de una colección de secuencias aleatorias, como ha sido descrito por Tuerk C. and Gold L., 1990. La colección de secuencias aleatorias se puede obtener por síntesis química combinatoria de DNA. En esta colección, cada miembro es un oligómero lineal, eventualmente modificado químicamente, de una secuencia única. Las posibles modificaciones, usos y ventajas de esta clase de moléculas han sido revisados por Jayasena S.D., 1999. Los aptámeros peptídicos consisten en una región variable de anticuerpo conformacionalmente restringida mostrada por una proteína plataforma, tal como tiorredoxina A de *E. coli* que se seleccionan de colecciones combinatorias por métodos de dos híbridos (Colas et al., 1996).

50 **Composición terapéutica**

Otro objeto de la invención se refiere a una composición terapéutica que comprende un inhibidor de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8 para uso en el tratamiento de una afección inflamatoria.

Cualquier agente terapéutico de la invención se puede combinar con excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente matrices de liberación prolongada, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas.

"Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción inadecuada cuando se administran a un mamífero, especialmente a un ser humano, según sea apropiado. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a una carga, diluyente, material encapsulante o auxiliar de formulación de cualquier tipo, sólido, semisólido o líquido no tóxico.

La forma de las composiciones farmacéuticas, la vía de administración, la dosificación y el régimen dependen naturalmente de la afección que se ha de tratar, de la gravedad de la enfermedad, de la edad, peso y sexo del paciente, etc.

5 Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden formular para administración tópica, oral, intranasal, parenteral, intraocular, intravenosa, intramuscular o subcutánea y similares.

10 Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación capaz de ser inyectada. En particular pueden ser soluciones salinas estériles e isotónicas (fosfato monosódico o disódico, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares o mezclas de dichas sales), o composiciones secas, especialmente liofilizadas que por adición, dependiendo el caso, de agua esterilizada o solución salina fisiológica, permiten la constitución de soluciones inyectables.

Las dosis utilizadas para la administración se pueden adaptar en función de diversos parámetros y, en particular, en función del modo de administración utilizado, de la patología pertinente o alternativamente de la duración deseada del tratamiento.

15 Además, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, comprimidos u otros sólidos para administración oral; cápsulas de liberación prolongada; y cualquier otra forma que se pueda utilizar actualmente.

Alternativamente, los compuestos de la invención que inhiben la actividad o la formación del complejo PP1/GADD34 se pueden identificar adicionalmente por métodos de cribado como se describe a continuación.

La invención será ilustrada adicionalmente por las figuras y los ejemplos siguientes. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben ser interpretados en modo alguno como limitativos del alcance de la presente invención.

20 Figuras:

Figura 1. Los factores de transcripción ATF4 y CHOP son inducidos en las DC por estimulación con poli I:C.

a) Se midió la expresión del mRNA de ATF4 por PCR cuantitativa (qPCR) en respuesta a la estimulación con poli I:C en diferentes periodos (panel izquierdo). Se cuantificaron los niveles de la proteína ATF4 en el extracto nuclear de las DC estimuladas con poli I:C por inmunotransferencia. Los niveles de proteína aumentaron después de 8 horas de estimulación, de forma similar a las células tratadas con tunicamicina (panel derecho). Una muestra para simulación (simul.) se trató con DMSO, en el que estaba disuelta tunicamicina; se muestra la inmunotransferencia para la histona H1 como control de carga igual. b) Por qPCR se encontró que la expresión del mRNA de CHOP había aumentado 8 veces en las DC activadas con poli I:C. c) Los niveles de expresión del mRNA de la fosfatasa 1 (PP1) sólo aumentaron modestamente por poli I:C. d) La expresión del mRNA de GADD34 aumentó hasta 14 veces (panel superior). Fue necesario un tratamiento con el inhibidor de proteasoma MG132 (2 μ M, añadido 4 horas antes de la recolección) para permitir la detección de GADD34 por inmunotransferencia. La GADD34 se acumula en las células después de 8 horas de estimulación con poli I:C, en cantidades comparables a las inducidas por tunicamicina. e) Los niveles de expresión del mRNA de CReP (cofactor constitutivo de PP1) fueron inducidos muy modestamente.

Figura 2. La síntesis de proteínas y la desfosforilación de eIF2- α están estrechamente reguladas durante la maduración de las DC inducida por poli I:C.

a) Se cuantificó la síntesis de proteínas en las DC activadas con poli I:C usando un marcaje con puromicina seguido por inmunotransferencia con el mAAb anti-puromicina, 12D10. La síntesis de proteínas fue potenciada en las primeras horas de estimulación con poli I:C, seguido por una reducción después de 8 horas. Los controles son células no tratadas con puromicina (co) y células tratadas con cicloheximida (chx) 5 minutos antes de la incorporación de puromicina. Se muestra la inmunotransferencia de β -actina para un control de carga igual. b) Se realizaron inmunotransferencias para eIF2- α fosforilado (P-eIF2- α) y total en los mismos extractos de DC. También se muestra la cuantificación de los niveles de P-eIF2- α . c) Las DC se activaron con poli I:C soluble durante 24 horas y se trataron con salubrinal 75 μ M (inhibidor específico del complejo PP1/GADD34) durante las últimas 4 horas de estimulación, antes de la detección de P-eIF2- α por inmunotransferencia. d) Experimentos idénticos realizados con tautomicina, un inhibidor de PP1 diferente.

Figura 3. La PKR fosforila el eIF2- α en las DC activadas.

a) Las DC de tipo natural, (WT), y con PKR^{-/-} fueron estimuladas con poli I:C soluble durante diferentes periodos y PKR y P-eIF2- α fueron detectadas por inmunotransferencia. Los niveles de PKR aumentan considerablemente después de la maduración. Los niveles de PKR están inversamente correlacionados con la intensidad de P-eIF2- α , que se reduce gradualmente. En las DC con PKR^{-/-} no activadas los niveles de P-eIF2- α son comparables a los de las DC de tipo natural, mientras que por estimulación con poli I:C el P-eIF2- α es casi abolido. b) Se observó una disminución comparable de P-eIF2- α después de estimulación con poli I:C (sol) en las DC con PKR^{-/-} por suministro directo de poli I:C en el citosol (lip). Se realizó un control con células tratadas con arsenito de sodio (500 μ M, 30 minutos). c) La lipofección de poli I:C (lip) y poli I:C (sol) no soluble induce la fosforilación del eIF2- α dependiente de PKR en los MEF de tipo natural y en las células NIH3T3. d) Las células NIH3T3 se lipofectaron con poli I:C durante 8 horas, con la adición del inhibidor de proteasoma MG132 en las últimas 4 horas de tratamiento. A diferencia de las DC (Fig. 1d), disminuyen los niveles de GADD34. La inmunotransferencia de β -actina se muestra como un control de carga igual.

Figura 4. Las DC están protegidas de la inhibición de la traducción inducida por PKR por sensibilización con

poli I:C citosólico. a) Monitorización de la traducción en los MEF, las DC y NIH3T3 de tipo natural y con PKR^{-/-} tratados con poli I:C soluble (sol) o lipofectado (lip) durante 8 horas. La lipofección de poli I:C en los MEF (wt) y NIH3T3 induce la detención de la traducción dependiente de PKR. El poli I:C soluble no afecta a las células NIH3T3, pero inhibe la traducción en los MEF de tipo natural. Por el contrario, la detención de la traducción por tratamiento con poli I:C no se observa nunca en las DC. Se presentan controles sin puromicina (co), cicloheximida (chx) y lipofectamina sola (simulación). Se muestra una inmunotransferencia de β-actina para control de carga igual. b) Se trataron NIH3T3, MEF y DC durante 8 horas con monitorización previa con poli I:C marcado con Cy5 lipofectado por FACS. Se presenta un experimento representativo de los tres. c) La traducción se controló en las DC estimuladas con poli I:C durante 4 u 8 horas. La síntesis de proteínas se redujo considerablemente en presencia de salubrinal (añadido a las células 2 horas antes de la estimulación con poli I:C).

Figura 5. Vías de transducción de señales implicadas en la regulación de la fosforilación del eIF2-α y la transcripción de GADD34. a) Las DC de tipo natural, con TLR3^{-/-} y con MDA5^{-/-} se estimularon con poli I:C durante diferentes periodos antes de la inmunotransferencia para P-eIF2-α, eIF2-α y PKR. En todos los tipos de células, los niveles de PKR aumentaron durante la maduración de las DC, mientras que eIF2-α es desfosforilado (panel superior). Por el contrario, el tratamiento con el inhibidor de la quinasa PI3, Ly294002 (Ly), (1 hora antes de la recolección) evita eficazmente la desfosforilación del eIF2-α (panel inferior). b) No se observa ningún cambio en la desfosforilación del eIF2-α en las DC con IFN-αβ R^{-/-} estimuladas con poli I:C, mientras que en estas células se reducen drásticamente los niveles de PKR. c) Monitorización por qPCR de los niveles de mRNA de GADD34 en las DC de tipo natural y activadas con IFN-αβ R^{-/-}. Los niveles se reducen 2 a 6 veces con el IFN-αβ R^{-/-} en comparación con las células de tipo natural.

Figura 6. Las DC activadas son resistentes a la formación de gránulos de estrés y a la privación de triptófano. a) Las DC se activaron con poli I:C o LPS durante diferentes periodos y se trataron con arsenito de sodio 500 μM durante los últimos 30 minutos de cada periodo. La formación de gránulos de estrés (SG) se visualizó por microscopía confocal después de hibridación *in situ* de mRNA con oligodT y tinción con anticuerpo eIF4A. Barra, 10 μm (panel superior). Se representó el número de las DC que llevan SG en función del tiempo de maduración. Se encuentran SG en casi el 100% de las DC no activadas, una proporción que se reduce por activación. La cinética de formación de los SG corresponde al estado de la fosforilación del eIF2-α y la expresión de GADD34 inducidas por poli I:C o LPS (panel inferior). b) Se midió la intensidad de la traducción en los MEF de tipo natural y con GCN2^{-/-} cultivados en medio completo o libre de triptófano (Trp) durante 6 horas. La traducción se inhibe en respuesta al agotamiento del triptófano en los MEF de tipo natural pero no en los que tienen GCN2^{-/-} (panel superior izquierdo). A continuación las DC activadas con poli I:C durante 2 horas se someten a privación durante 6 horas (se mantuvo poli I:C durante la privación). Contrariamente a los MEF, las DC activadas expuestas al agotamiento de triptófano, no presentan ninguna inhibición de la traducción durante al menos 6 horas (panel superior derecho). Se muestran controles sin puromicina ni cicloheximida (chx). Se presentan inmunotransferencias de β-actina como control de carga igual. También se monitorizaron P-eIF2-α y eIF2-α en los MEF y las DC de tipo natural y con GCN2^{-/-}. Se observa fosforilación del eIF2-α en respuesta al agotamiento de triptófano en los MEF de tipo natural, pero no en los MEF o las DC con GCN2^{-/-} (panel inferior).

Figura 7. La desfosforilación del eIF2-α es esencial para la producción normal de IFN-β y la inhibición de caspasa-3 en las DC. a) Se cuantificó IFN-β por ELISA en las DC de médula ósea de tipo natural y con PKR^{-/-} estimuladas con poli I:C durante diferentes periodos. La producción de IFN-β en las células con PKR^{-/-} se reduce significativamente en comparación con las células de tipo natural, lo que confirma el requisito de PKR para este proceso (panel izquierdo). Se cuantificó IFN-β en las DC estimuladas con poli I:C o LPS durante 8 horas, en presencia o ausencia del inhibidor de PP1/GADD34, salubrinal (añadido 2 horas antes de la estimulación) (panel derecho). Por tratamiento con salubrinal, se reduce drásticamente la secreción de IFN-β en las DC activadas, lo que indica que el control de la fosforilación del eIF2-α durante la activación de PKR es esencial para la producción normal de IFN-β. b) La escisión de caspasa-3 se reveló por inmunotransferencia en las DC estimuladas con poli I:C o LPS durante 8 horas, en presencia o ausencia de salubrinal (añadido 2 horas antes de la estimulación). El tratamiento con salubrinal solo induce un aumento masivo en los niveles totales de caspasa-3 (visualizada como una banda a 35 kDa) y su forma activa escindida (17 kDa). Los tratamientos con poli I:C o LPS disminuyen la expresión de caspasa-3 y la escisión inducida por salubrinal solo, probablemente debido a la inducción de GADD34 en las DC activadas. Se muestra la inmunotransferencia de β-actina como un control de carga igual.

Figura 8. Las DC activadas deficientes en GADD34 son incapaces de producir IFN-β e IL-12. Las DC de tipo natural y con GADD34^{-/-} fueron estimuladas con poli I:C durante diferentes periodos antes de inmunotransferencia para P-eIF2-α, eIF2-α y PKR. En todos los tipos de células, los niveles de PKR disminuyen considerablemente durante la maduración de las DC, mientras que eIF2-α se reduce y fosforila considerablemente (panel superior). El IFN-β y la IL-12 se cuantificaron por ELISA en las DC de médula ósea de tipo natural y con GADD34^{-/-} y estimuladas con poli I:C o LPS durante un periodo diferente. La producción de IFN-β e IL-12 en GADD34^{-/-} se reduce significativamente en comparación con las células de tipo natural, confirmando así el requisito de GADD34 para este proceso y explicando la escasa expresión de PKR en estas células (PKR es inducible por IFN).

Figura 9: Se requiere GADD34 para la producción de citoquinas (IFN-β e IL-6) por los MEF estimulados con poli I:C. B) Después de 6 horas de estimulación con poli I:C, se cuantificaron por ELISA, IFN-β (panel izquierdo) e IL-6 (panel derecho) en líquidos sobrenadantes de cultivos celulares de los MEF de tipo natural y con GADD34^{ΔC/ΔC}.

Las muestras de simulación son muestras tratadas solo con lipofectamina. Los datos son el valor medio \pm SD de cinco (IFN- β) y tres (IL-6) experimentos independientes. C) Los MEF de tipo natural y con GADD34 ^{Δ C/ Δ C} se trataron con poli I:C durante los periodos indicados, se extrajo el RNA total y se realizaron PCR cuantitativas en cDNA. Se calculó el número de veces de aumento de los transcritos indicados en comparación con un valor = 1 para cada una de las muestras de simulación (tratadas sólo con lipofectamina). Los transcritos de IFN- β , IL-6 y PKR se sometieron a una sobreexpresión por estimulación con poli I:C tanto en los MEF de tipo natural como con GADD34 ^{Δ C/ Δ C} y, en los periodos finales, incluso más en los MEF con GADD34 ^{Δ C/ Δ C} que en los de tipo natural. El nivel de transcritos de cistatina C permaneció aproximadamente constante por tratamiento con poli I:C tanto en los MEF de tipo natural como con GADD34 ^{Δ C/ Δ C}. Los datos son representativos de dos experimentos independientes con resultados similares. D) Los MEF de tipo natural y con GADD34 ^{Δ C/ Δ C} se transfectaron durante una noche con un plásmido que llevaba la secuencia de GADD34 de murinos y luego se trataron con poli I:C durante 6 horas. La producción de IFN- β se cuantificó por ELISA en los líquidos sobrenadantes de cultivos celulares (panel izquierdo), mientras que la desfosforilación eficaz del eIF2- α se comprobó por inmunotransferencia (panel derecho). Se muestra uno de los tres experimentos independientes con resultados similares.

Figura 10. La infección por CHIKV y la producción de IFN- β se controlan por GADD34 en los MEF. A) Los MEF de tipo natural y con GADD34 ^{Δ C/ Δ C} fueron expuestos a 10 o 50 MOI de CHIKV durante 24 horas o 48 horas y la infección productiva se estimó por expresión de GFP. B) La producción de IFN- β por los MEF de tipo natural y con GADD34 ^{Δ C/ Δ C} expuestos a CHIKV se cuantificó por ELISA en los líquidos sobrenadantes de cultivos celulares. C) Se añadió IFN- β de murinos 3 horas antes de la infección de los MEF de tipo natural y con GADD34 ^{Δ C/ Δ C} por CHIKV (10 MOI). La infección productiva se estimó por expresión de GFP, 24 horas después de la exposición a CHIKV. Los datos representados en A, B y C son los valores medios \pm SD por triplicado. Se muestra uno de dos resultados independientes con resultados similares.

Figura 11. Infección por CHIKV en neonatos de ratón. Se inocularon por vía intradérmica a neonatos de ratón de tipo natural (FVB) y con GADD34 ^{Δ C/ Δ C} (de 12 días) 10^6 PFU de CHIKV y se observó su letalidad (n = 14 por grupo).

Ejemplo 1:

Materiales y Métodos

Ratones

Se adquirieron ratones C57BL/6 machos de 6 semanas a Charles River Laboratories. Se obtuvieron ratones TLR-3^{-/-} de L. Alexopoulou (CIML, Marsella), ratones IFN- α/β R^{-/-} de M. Dalod (CIML, Marsella), médula ósea de ratón MDA-5^{-/-} de M. Colonna (Universidad de Washington) y médula ósea de ratón PKR^{-/-} de Caetano Reis e Sousa (Cancer Research UK, Londres).

Cultivo celular

Se obtuvieron las DC procedentes de médula ósea y se cultivaron como se ha descrito previamente⁵⁰. Se cultivaron células NIH3T3 en RPMI 1640 (GIBCO) suplementado con FCS al 10% (HyClone, PERBIO), 100 unidades/mL de penicilina y 100 μ g/mL de estreptomina (GIBCO). Se cultivaron los MEF de tipo natural y con PKR^{-/-} (de Caetano Reis e Sousa) en DMEM, FCS al 10%, penicilina/estreptomina. Se cultivaron los MEF de tipo natural y con GCN2^{-/-} (de David Ron) en RPMI, FCS al 10%, penicilina/estreptomina, aminoácidos no esenciales MEM (GIBCO) y beta-mercaptoetanol 55 μ M. Para los experimentos de privación de triptófano, se cultivaron los MEF y las DC durante el tiempo indicado en medio RPMI 1640 - triptófano (21875, GIBCO). Todas las células se cultivaron a 37°C y CO₂ al 5%.

Compuestos químicos

Se trataron los MEF, NIH3T3 y las DC inmaduras durante el tiempo indicado con 10 μ g/mL de poli I:C (InvivoGen), solo o en combinación con lipofectamina 2000 (Invitrogen). Se añadieron 2 μ g/mL de tunicamicina (SIGMA) a las DC durante 2 horas; se añadió 4 horas antes de la recolección MG132 2 μ M (BIOMOL International) a las DC y a NIH3T3; 4 horas antes de la recolección se añadieron salubrinal 75 μ M (Calbiochem) o tautomicina 100 nM (Calbiochem) a las DC; se añadió arsenito de sodio 500 μ M (SIGMA) durante 30 minutos a las DC, a NIH3T3 y a los MEF; 1 hora antes de la recolección se añadió LY294002 50 μ M (Calbiochem) a las DC. Las DC inmaduras se trataron durante el tiempo indicado con 100 ng/mL de LPS (SIGMA).

Hibridación con micromatrices de Affymetrix y extracción de datos

Se extrajo el ARN total de las DC de médula ósea en diferentes periodos después de estimulación con poli I:C usando el kit RNeasy miniprep (Qiagen). Para cada condición se emplearon 100 ng de RNA total para sintetizar cDNA bicatenario usando dos reacciones sucesivas de transcripción inversa de acuerdo con los protocolos estándar de Affymetrix (GeneChip Two-Cycle Target Labeling, Affymetrix). La amplificación lineal con T7-RNA-polimerasa y el marcaje con biotina se realizaron por transcripción *in vitro* por procedimientos estándar de Affymetrix. El cRNA marcado con biotina resultante se fragmentó e hibridó al chip de micromatrices génicas de 39.000 oligonucleótidos MOE 430 2.0 del genoma de ratón de Affymetrix durante 16 horas a 45°C. Después de la hibridación, la matriz de sondas se lavó y tñó en una estación de fluidos y se exploró inmediatamente en un escáner Affymetrix GCS 3000

GeneArray. Los datos generados del escaneo se analizaron a continuación utilizando el programa informático MicroArray Suite (MAS 5.0, Affymetrix) y se normalizaron utilizando el algoritmo GC-RMA. El análisis bioinformático se realizó utilizando el programa GeneSpring GX 9.0 (Agilent).

Cuantificación de mRNA por RT-PCR en tiempo real

- 5 Se aisló el RNA total de las DC usando el kit RNeasy miniprep (Qiagen). Se sintetizó cDNA a partir de muestras de RNA usando la transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen). Se realizó una PCR cuantitativa en tiempo real en tampón completo de PCR SYBR Green (PE Biosystem) usando 200 nM de cada cebador específico. Se añadió un total de 20 μ L de mezcla de PCR a 5 μ L de molde de cDNA y la amplificación se rastreó por incorporación de SYBR Green utilizando un sistema de detección de secuencias de Stratagene. La concentración de cDNA en cada muestra se normalizó usando HPRT. También se realizó rutinariamente un control sin molde. Se generaron los cebadores utilizados para la amplificación de genes (diseñados con el programa informático Primer3).

Medida de la intensidad de la traducción

- 15 El marcaje con puromicina para medir la intensidad de la traducción se realizó usando 10 μ g/mL de puromicina (SIGMA, min 98% por TLC, cultivo celular analizado, P8833, diluida en PBS) en el medio de cultivo y las células se incubaron durante 10 minutos a 37°C y CO₂ al 5%. Cuando se indica, se añadió cicloheximida 25 μ M (SIGMA) 5 minutos antes de la puromicina. Las células se recogieron entonces, se centrifugaron a 4°C y se lavaron con PBS frío antes de la lisis celular y de inmunotransferencia con el anticuerpo 12D10.

Inmunotransferencia

- 20 Las células se lisaron en Triton X-100 al 1%, Hepes 50 mM, NaCl 10 mM, MgCl₂ 2,5 mM, EDTA 2 mM, glicerol al 10%, PMSF 1 mM, suplementado con comprimidos de un cóctel completo de inhibidores de miniproteasa (Roche). La cuantificación de proteínas se realizó utilizando el ensayo de proteínas BCA (Pierce). Se cargaron 25-50 μ g de material soluble en Triton X-100 en SDS-PAGE con gradiente de 2% -12% antes de la detección por inmunotransferencia y quimioluminiscencia (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce). La extracción nuclear se realizó utilizando el kit Nuclear Complex Co-IP (Active Motif). Los anticuerpos policlonales de conejo contra ATF4 (CREB-2, C-20) y eIF2- α (FL-315) procedían de Santa Cruz Biotechnology, así como los anticuerpos monoclonales de ratón contra GADD34 (C-19) y PKR (B-10). Los anticuerpos policlonales de conejo contra P-eIF2- α (Ser 51) y caspasa-3 procedían de BioSource y Cell Signalling Technology, respectivamente. Los anticuerpos monoclonales de ratón contra β -actina e histona H1 procedían de SIGMA y Upstate, respectivamente. Los anticuerpos secundarios procedían de Jackson ImmunoResearch Laboratories. La cuantificación de la fosforilación del eIF2- α se realizó utilizando el programa informático Multi Gauge (Fujifilm).

Inmunocitoquímica

- 35 Las DC se recolectaron y dejaron que se adhirieran a portaobjetos tratados con Alcian Blue al 1% durante 10 minutos a 37°C, se fijaron con paraformaldehído al 3% en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente, se permeabilizaron con saponina al 0,5% en PBS/FCS al 5%/glicina 100 mM durante 15 minutos a temperatura ambiente y se tiñeron 1 hora con el anticuerpo primario indicado. El anticuerpo policlonal de cabra contra eIF4A (N-19) procedía de Santa Cruz; el anticuerpo monoclonal de rata contra Lamp2 procedía de I. Mellman's lab. Todos los anticuerpos secundarios de Alexa (tinción de 30 minutos) procedían de Molecular Probes (Invitrogen). Se acopló poli I:C con Cy5 utilizando el kit de marcaje LabelT Cy5 (Mirus). La inmunofluorescencia y la microscopía confocal (utilizando el modelo de microscopio LSM 510; Carl Zeiss MicroImaging) se realizaron utilizando un objetivo de 63 aumentos y acompañadas de un programa informático de formación de imágenes.

Hibridación *in situ* de mRNA

La formación de gránulos de estrés se detectó por hibridación *in situ* con oligo-dT (Alexa Fluor 555 dT18, Invitrogen). Las células se fijaron con PFA, se permeabilizaron con metanol 10 minutos a 20°C y se incubaron con oligo-dT durante 4 horas a 43°C. A continuación, se realizó una tinción con los anticuerpos primarios y secundarios.

45 ELISA de IFN- β

La cuantificación de IFN- β en el líquido sobrenadante de cultivo de las DC (diluido 5 veces) se realizó usando el kit de ELISA del interferón beta de ratón (PBL InterferonSource) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Análisis por citometría de flujo

- 50 Las células se tiñeron con anticuerpos específicos para marcadores de superficies celulares: CD86-biotina, IA/IE-PE y CD11c-APC (BD Pharmingen) (30 minutos a 4°C, en PBS/FCS al 1%). Después del lavado, las células se tiñeron con estreptavidina PerCP-Cy5.5 (BD Pharmingen) (20 minutos a 4°C, en PBS/FCS al 1%), después se lavaron y se fijaron en paraformaldehído al 2% en PBS. Se recogieron los episodios en un FACScalibur (Becton Dickinson) y los datos se adquirieron utilizando el programa informático CellQuest (BD Biosciences) y se analizaron utilizando el programa informático FlowJo.

Resultados

La estimulación de las DC por poli I:C induce parte de los genes de la ISR

La síntesis de proteínas está estrechamente regulada en las DC activadas procedentes de médula ósea de ratón [Lelouard, H. et al., 2007]. Para identificar las moléculas potenciales implicadas en este control, se realizó un análisis de la expresión de todo el genoma de las DC estimuladas con poli I:C utilizando matrices Affymetrix Mouse Genoma 430 2.0. Se encontró que fueron fuertemente inducidos al menos nueve transcritos, expresados típicamente durante la respuesta a proteínas desplegadas (UPR) inducida por tunicamicina [Harding, H. P. et al., 2003; Okada, T., et al., 2002; Marciniak, S. J. et al., 2004]. En particular, los transcritos que codifican los factores de transcripción ATF4, ATF3 y CHOP (Ddit3/GADD153) así como MyD116 (GADD34), triptofanil-tRNA-sintetasa (Wars), el componente de COP2, Sec23b y la isomerasa Eroll unida por disulfuros y todos fueron sobreexpresados. La sobreexpresión de estos transcritos se confirmó por RT-PCR cuantitativa (qPCR), lo que demuestra la existencia de una firma de la expresión génica relacionada con UPR en las DC estimuladas con poli I:C.

La inducción de ATF4 y CHOP (Ddit3/GADD153) es una de las características de la UPR [Harding, H.P. et al., 2000]. Por PCR cuantitativa (qPCR) se encontró que la expresión del mRNA de ATF4 y CHOP aumentaba respectivamente 2 y 8 veces (Fig. 1a y 1b) en respuesta a poli I:C. El mRNA de ATF4 se expresa normalmente en células no estresadas pero se traduce mal. Sin embargo, por fosforilación del eIF2- α mediada por estrés, se puede observar una rápida síntesis de la proteína ATF4 [Harding, H.P. et al., 2000; Scheuner, D. et al., 2001; Lu, P.D., et al., 2004]. La síntesis de ATF4 induce la expresión de CHOP/GADD153, que a su vez provoca la transcripción de muchos genes diana aguas abajo importantes para la respuesta a una variedad de estrés que da como resultado la detención del crecimiento o el daño al DNA (GADD) [Marciniak, S. J. et al. 2004]. Por tanto, los inventores han monitorizado los niveles de ATF4 por inmunotransferencia durante la activación de las DC. La traducción de ATF4 fue sobreexpresada considerablemente por estimulación con poli I:C y la proteína se detectó mayormente en el núcleo después de 8 horas de estimulación. Curiosamente, los niveles de inducción fueron similares a los inducidos por la tunicamicina (Fig. 1a). De este modo, la expresión de ATF4 es inducida por detección de poli I:C y conduce a la transcripción de CHOP y sus efectores aguas abajo.

Sobreexpresión de GADD34 en las DC activadas

Una de las dianas principales aguas abajo de CHOP es GADD34 (MyD116), que sirve para aliviar la represión de la traducción durante el estrés en ER [Marciniak, S. J. et al., 2004; Novoa, I., et al., 2001; Novoa, I. et al., 2003]. La GADD34 inhibe la subunidad catalítica de la proteína fosfatasa 1 (PP1) que desfosforila el eIF2- α . La expresión de PP1 y GADD34 en las DC activadas fue monitorizada por qPCR (Fig. 1c y 1d). La expresión del mRNA de PP1 se aumentó moderadamente por exposición a poli I:C. Por el contrario, la transcripción del mRNA de GADD34 se potenció al menos 14 veces durante la maduración. La GADD34 contiene dos secuencias PEST que promueven la degradación rápida mediada por proteasoma. Por tanto, era necesaria la inhibición del proteasoma por MG132 para permitir la detección de GADD34 en extractos celulares (Fig. 1d). Como era de esperar del análisis transcripcional, se encontró que la proteína se acumulaba progresivamente durante la activación de las DC, alcanzando un máximo después de 8 horas de estimulación y en cantidades comparables a los niveles inducidos por tunicamicina (Fig. 1d). Por tanto, la estimulación con poli I:C induce en las DC la transcripción y la síntesis de varios componentes importantes de la UPR incluyendo ATF4, CHOP y GADD34. Es importante destacar que GADD34, que es un potente cofactor de PP1, se considera parte del bucle de retroalimentación negativa que reduce el estrés traducional durante la UPR [Novoa, I., et al., 2001; Novoa, I. et al., 2003]. Por el contrario, el cofactor constitutivo de PP1, CReP (represor constitutivo de la fosforilación del eIF2- α [Jousse, C. et al., 2003]) fue inducido sólo muy modestamente por la maduración de las DC (Fig. 1e), lo que sugiere que esta molécula no tiene un papel importante durante la detección de poli I:C.

El eIF2- α es desfosforilado durante la activación de las DC

La síntesis de proteínas en las DC se cuantificó usando marcaje con puromicina seguido por inmunotransferencia con el mAb anti-puromicina 12D10 (Fig. 2a). Como se demostró anteriormente para las DC activadas con LPS, la síntesis de proteínas se potencia en las primeras horas de estimulación con poli I:C seguida por una reducción después de 12-16 horas de activación [Lelouard, H. et al., 2007]. La inmunotransferencia y la cuantificación del eIF2- α fosforilado (P-eIF2- α) y el total también se realizaron en los mismos extractos de las DC (Fig. 2b). Curiosamente se encontraron que los niveles de P-eIF2- α se habían reducido gradualmente durante la estimulación con poli I:C.

La pérdida de P-eIF2- α en células tratadas con poli I:C, que en este último periodo de maduración muestran una tasa de síntesis de proteína reducida, indica que la fosforilación del eIF2- α probablemente no está implicada en la inhibición de la traducción. Sin embargo, puesto que la intensidad de fosforilación del eIF2- α estaba inversamente correlacionada con los niveles de expresión de GADD34, los inventores analizaron de que forma la inhibición dirigida de la actividad del complejo PP1/GADD34 con el inhibidor específico salubrinal [Boyce, M. et al., 2005] podría afectar al eIF2- α en las DC. El salubrinal solo inducía la fosforilación del eIF2- α (Fig. 2c), que se potenciaba considerablemente en presencia de poli I:C soluble. Estos resultados se confirmaron usando tautomycin, otro inhibidor de PP1. Por tanto, las eIF2- α -quinasas son funcionales en las DC y la actividad de PP1 es responsable de la desfosforilación del eIF2- α a través de la expresión de GADD34 potenciada desencadenada por la detección de

poli I:C

La PKR es funcional y fosforila el eIF2- α en las DC activadas

La PKR actúa como un transductor de señal en la respuesta proinflamatoria a diferentes productos microbianos, incluyendo LPS y dsRNA. Alternativamente, la activación de la PKR durante la infección por dsRNA viral da como resultado la fosforilación del eIF2- α y la inhibición de la síntesis de proteínas. Para obtener más información sobre el papel de la PKR durante la activación de las DC, las células de tipo natural y con PKR^{-/-} fueron monitorizadas para la fosforilación del eIF2- α por estimulación con poli I:C (Fig. 3a). Las DC inmaduras mostraron niveles relativamente bajos de PKR, que fueron fuertemente sobreexpresadas por maduración. Curiosamente, los niveles de PKR estaban inversamente correlacionados con la intensidad de fosforilación del eIF2- α , que se redujo gradualmente durante la maduración. En las DC con PKR^{-/-} no activadas, los niveles de P-eIF2- α eran próximos a los valores normales, lo que confirma que otras quinasas distintas de la PKR fosforilan el eIF2- α en las DC inmaduras (Fig. 3a). Sin embargo, por exposición a poli I:C, la fosforilación del eIF2- α fue casi abolida en estas células, confirmando que la PKR media normalmente en la fosforilación del eIF2- α por detección de poli I:C, pero su actividad es contrarrestada por la activación de PP1. Este mecanismo también era capaz de limitar la fosforilación del eIF2- α por suministro directo de poli I:C en el citosol de las DC (Fig. 3b), un modo de direccionamiento que induce la fosforilación del eIF2- α dependiente de PKR en los MEF de tipo natural y en las células NIH3T3 (Fig. 3c). Aunque la delección de PKR afectó a los niveles totales de P-eIF2- α en los MEF, la estimulación con poli I:C no influyó en su fosforilación en comparación con las células de control, lo que indica que la desfosforilación inducida por la detección de dsRNA en las DC no se produce en los fibroblastos. De acuerdo con esta observación, se encontró que los niveles de GADD34 en células NIH3T3 no cambiaban si no disminuía la respuesta a la lipofección con poli I:C (Fig. 3d).

La síntesis de proteínas no se inhibe en las DC expuestas a poli I:C citosólico

Se monitorizó la traducción en las DC y los fibroblastos expuestos a poli I:C soluble o lipofectado durante varias horas. La lipofección de poli I:C en los MEF (de tipo natural y con PKR^{-/-}) y en NIH3T3 indujo eficazmente la detención de la traducción dependiente de PKR en 4 a 8 horas (Fig. 4a). Curiosamente, aunque poli I:C soluble no afectaba a las células NIH3T3, la traducción fue inhibida en los MEF de tipo natural, lo que sugiere que dsRNA soluble puede acceder eficazmente al citosol de estas células e interactuar con PKR. En el caso de las DC, y como fue anticipado por los bajos niveles de fosforilación del eIF2- α inducidos por lipofección con poli I:C, la traducción no fue inhibida incluso después de 8 horas de exposición (Fig. 4a). Curiosamente, mientras se verificó por FACS qué cantidades equivalentes de poli I:C eran suministradas en las células por lipofección (Fig. 4b), los inventores visualizaron la entrada de poli I:C. Además de detectar la acumulación de poli I:C lipofectado en grandes agregados citosólicos, los inventores también pudieron mostrar que el poli I:C soluble penetra en el citoplasma de las DC y aparece como motitas situadas lejos de los endo/lisosomas positivos a LAMP2, un fenómeno nunca observado en las células NIH3T3.

Este acceso relativamente eficaz de poli I:C soluble al citosol de las DC sugiere que la PKR podría ser activada simultáneamente con TLR3 y MDA5. Esta hipótesis se apoya en la observación de que el poli I:C soluble acentúa fuertemente la fosforilación del eIF2- α en presencia de salubrinal, lo que inhibe específicamente la actividad de PP1/GADD34 (Fig. 2c). Por otra parte, la síntesis de proteínas en las DC estimuladas con poli I:C se redujo fuertemente en presencia de salubrinal (Fig. 4c), lo que sugiere que las DC activadas dependen de la inducción de la actividad de PP1/GADD34 para resistir la detención de la traducción dependiente de PKR desplazando el equilibrio bioquímico hacia la desfosforilación del eIF2- α .

Vías de transducción de las señales implicadas en la sobreexpresión de la transcripción de GADD34

Los inventores utilizaron las DC generadas por ratones que carecían de los sensores de dsRNA, TLR3 y MDA5, para determinar la cascada de señalización responsable del desencadenamiento de la desfosforilación del eIF2- α (Fig. 5). Las DC fueron estimuladas con poli I:C como se ha indicado antes de la inmunotransferencia para P-eIF2- α (Fig. 5a). La inactivación solo de TLR3 o MDA5 no afectó la fosforilación del eIF2- α en comparación con las células de control. Por tanto, la cascada que induce la expresión de GADD34 puede ser desencadenada probablemente por la estimulación de cualquiera de estos receptores, lo que es probable que ocurra en los endosomas o por medio del pase de poli I:C en el citosol. Recientemente, los inventores han mostrado que es necesaria la activación de la quinasa PI3 para lograr la maduración total de las DC en respuesta al ligamiento del TLR y que está implicada en el control de la sobreexpresión de la traducción [Lelouard, H. et al., 2007]. Por tanto, los inventores monitorizaron la fosforilación del eIF2- α en presencia del inhibidor de PI3K, LY294002 (LY) (Fig. 5a). El tratamiento con LY evitó eficazmente la desfosforilación del eIF2- α , lo que indica que la señalización de PI3K y la inducción de la vía de respuesta al estrés en las DC activadas están estrechamente unidas. La fase relativamente tardía de maduración en la que eIF2- α es desfosforilado llevó a los inventores a investigar si la actividad autocrina de IFN- β podría estar implicada en este proceso. Aunque se requiere la señalización del receptor de IFN para conseguir la maduración normal de las DC y la abundante producción de IFN- β (Fig. S3), no se observó ningún cambio en la fosforilación del eIF2- α en las DC con receptor^{-/-} de IFN- $\alpha\beta$ activado con poli I:C (IFN- $\alpha\beta$ R^{-/-}) (Fig. 5b). Por el contrario, la cuantificación por qPCR indicó que los niveles de mRNA de GADD34 se redujeron de dos a seis veces en comparación con las células de tipo natural (Fig. 5c). Curiosamente, también se mostró que la señalización del receptor de IFN- β era responsable de la fuerte sobreexpresión de la PKR durante la maduración de las DC (Fig.

5b). Esta falta de sobreexpresión de la PKR podría por tanto compensar la pérdida relativa de la actividad de GADD34 en las DC con IFN- $\alpha\beta$ R^{-/-} estimuladas, explicando por qué la velocidad de desfosforilación del eIF2- α permanece inalterada o incluso mayor en los periodos finales. Por tanto, el efecto autocrino de IFN- β sobre las DC contribuye significativamente a la inducción de GADD34.

5 Las DC activadas resisten el estrés que induce la inhibición de la traducción

Como se observa con poli I:C, la desfosforilación del eIF2- α es probable que aumente la resistencia de las DC a otro estrés que provoca la detención de la traducción. El tratamiento con arsenito induce la formación de gránulos de estrés (SG), que sirven como depositarios de mRNA y los factores de traducción y que requieren la fosforilación del eIF2- α para su formación [Kedersha, N. & Anderson, P., 2002; Anderson, P. & Kedersha, N., 2002; Kedersha, N. et al., 2005]. La inducción de los SG por arsenito se visualizó por la detección por microscopía confocal de mRNA de poli-A y eIF4a durante estimulación de las DC por poli I:C o LPS (Fig. 6a). Se encontraron SG en casi el 100% de las DC no activadas, una proporción que se redujo progresivamente hasta 15% después de la activación. Curiosamente, la intensidad y la cinética de la formación de los SG reflejó perfectamente el estado de fosforilación del eIF2- α y de la expresión de GADD34 inducidas por poli I:C o LPS (Fig. 6a). Sorprendentemente, las cinéticas de la desfosforilación del eIF2- α en las DC estimuladas con LPS fueron impresionantemente diferentes de las inducidas por poli I:C.

También se sabe que la privación de aminoácidos induce la fosforilación del eIF2- α . Curiosamente, el agotamiento del triptófano mediado por la enzima indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO), que se produce en las DC activadas, promueve la tolerancia periférica provocando la anergia de los linfocitos T [Mellor, A.L. & Munn, D.H., 2004; Puccetti, P., 2007]. La GCN2-quinasa en linfocitos T es parcialmente responsable de este fenómeno detectando los triptófano-tRNA desacilados y provocando la fosforilación del eIF2- α [Munn, D. H. et al., 2005]. Los inventores han analizado si la activación de las DC evitaría también la detención de la traducción por privación de triptófano. La inhibición de la traducción y la fosforilación del eIF2- α en respuesta al agotamiento de triptófano se observaron claramente en los MEF de tipo natural cultivados en medio libre de triptófano durante 6 horas pero no en los MEF con GCN2^{-/-} (Fig. 6b). En los MEF, la inhibición de la traducción ya era detectable después de 2 horas de privación y total después de 8 horas, simultáneamente con una potenciación de la fosforilación del eIF2- α . Basándose en estas observaciones, se activaron las DC durante 2 horas con poli I:C antes de la privación de triptófano (manteniendo poli I:C durante la privación). Contrariamente a los MEF, las DC activadas, sometidas a agotamiento de triptófano, no mostraron ninguna inhibición de la traducción durante 6 horas, presumiblemente debido a la inducción de GADD34 y su posterior control de la fosforilación del eIF2- α (Fig. 6b). La expresión inducible en las DC de triptofanil-tRNA-sintetasa (Wars) en esos periodos también podría favorecer la síntesis de proteínas en las condiciones de privación de triptófano y acentuar el fenotipo. Desagraciadamente, los autores de la presente invención no pudieron monitorizar la actividad de la traducción en las DC no estimuladas, ya que las condiciones experimentales de privación, usadas en la presente invención, indujeron su maduración espontánea y/o muerte celular. Por tanto, las DC activadas muestran específicamente una resistencia aguda a la mayor parte de los estrés que inducen la fosforilación del eIF2- α y la inhibición de la traducción mediada por la caperuza.

Fosforilación del eIF2- α y función de las DC

Se ha demostrado que la PKR es un importante mediador de la producción y apoptosis de citoquinas a través de la fosforilación del eIF2- α y la activación de la vía p38, especialmente por detección de LPS por macrófagos [Hsu, L.C. et al., 2004]. Por tanto, los inventores evaluaron el impacto de la fosforilación del eIF2- α sobre la expresión de IFN- β , la citoquina principal producida por las DC por estimulación con poli I:C [Diebold, S. S. et al., 2007] (Fig. 7a). Las DC con PKR^{-/-} estimuladas con poli I:C mostraron niveles extremadamente reducidos de secreción de IFN- β en comparación con las células de tipo natural, confirmando así el requisito de la activación de la PKR para este proceso [Samuel, C. E., 2001]. A continuación, los inventores analizaron el impacto de la inhibición de PP1/GADD34 sobre la secreción de IFN- β por las DC. Después de tratamiento con salubrinal, la secreción de IFN- β se redujo drásticamente en las DC tratadas con poli I:C, lo que indica que la fosforilación incontrolada del eIF2- α durante la activación de la PKR podría perjudicar la producción normal de IFN- β . Por tanto, se requiere la expresión de GADD34 para compensar la activación simultánea de la PKR y lograr la maduración funcional durante la activación de las DC.

Los inventores analizaron además si la fosforilación del eIF2- α desregulada también podría conducir a la apoptosis en las DC activadas [Scheuner, D. et al., 2006; Rintahaka, J., et al., 2008]. Las DC fueron expuestas a diversos estímulos y tratamientos farmacológicos previos a la detección de caspasa-3 por inmunotransferencia (Fig. 7b). Aunque la adición de poli I:C o LPS tuvo poco efecto, el tratamiento con salubrinal solo indujo un aumento masivo de los niveles totales de caspasa-3 y de su producto activo escindido, generalmente considerado como una etapa importante para la iniciación de la apoptosis. Así, la fosforilación del eIF2- α parece tener un efecto directo sobre la síntesis y la escisión de caspasa-3. Los tratamientos tanto con salubrinal como con poli I:C o LPS tuvieron un efecto menor que con salubrinal solo, debido probablemente a la inducción de GADD34 en las DC activadas que las hace más resistentes a la inhibición inducida por salubrinal. Estos experimentos confirman la necesidad de controlar la fosforilación del eIF2- α para evitar la inducción anormal de caspasa-3, una situación que normalmente sería evitada por la expresión de GADD34 y la desfosforilación del eIF2- α en las DC activadas.

60

La expresión de GADD34 es necesaria para producir citoquinas en fibroblastos en respuesta a dsRNA

La detección de poli I:C citosólico en fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) promueve también una detención de la traducción de mRNA dependiente de la PKR y una respuesta similar a ISR, durante la cual, ATF4 y su diana aguas abajo, el cofactor fosfatasa-1 (PP1) y la proteína 34 inducible por daño al DNA y detección del crecimiento (GADD34/MyD116/Ppp1r15a) están fuertemente sobreexpresadas. Curiosamente, aunque la mayor parte de la traducción de mRNA es fuertemente inhibida por poli I:C, en estas condiciones aumentó considerablemente la síntesis de IFN-beta (IFN- β), interleuquina-6 (IL-6) y PKR. Los inventores demostraron además que la expresión dependiente de PKR de GADD34 es absolutamente necesaria para la traducción normal de los mRNA de IFN- β e IL-6, aunque prescindible para la neo-síntesis de la PKR (Fig. 9). Los inventores recapitulaban estas observaciones utilizando el CHIKV como un modelo patológicamente relevante y mostraron que los MEF deficientes en GADD34 son extremadamente permisivos al virus debido a su incapacidad para producir interferón tipo I (Fig. 10). Los inventores mostraron además que, aunque los ratones normales de 12 días son totalmente resistentes a la infección por CHIKV, la deficiencia en GADD34 induce un 100% de mortalidad entre los neonatos de la misma edad (Fig. 11). Las observaciones de los inventores demuestran que la inducción del programa de transcripción de ATF4 es parte de la respuesta antiviral e implica la existencia de diversos grupos distintos y segregados de mRNA traducidos de forma diferente durante la fosforilación del eIF2- α inducida por dsRNA.

Conclusión

La inhibición de la traducción se produce en respuesta a muchos estreses en los que la actividad celular tiene que ser orientada o suspendida momentáneamente. Los inventores demostraron en la presente invención que las vías de defensa celular que implican las diferentes quinasas similares a PKR y la fosforilación del eIF2- α se inactivan en las DC activadas. Los inventores han mostrado que las células tratadas con poli I:C muestran una firma de la expresión genética que comparte rasgos comunes con una respuesta integrada al estrés, incluyendo inducción de CHOP y de GADD34. Curiosamente la inducción de GADD34 también fue señalada recientemente en un análisis del transcriptoma de macrófagos infectados con *Hysteria monocytogenes* [Leber, J. H. et al., 2008], lo que sugiere que su expresión está asociada a la detección de patógenos en diferentes APC. La GADD34 se asocia con la subunidad catalítica de PP1, que desfosforila el eIF2- α y contrarresta la actividad de quinasas similares a PKR.

Durante las presentes investigaciones, los inventores no pudieron identificar una única vía de señalización responsable de la inducción de GADD34. Se ha mostrado principalmente que la expresión de GADD34 actúa como un bucle de retroalimentación negativa durante las respuestas de proteínas desplegadas (UPR). También se ha informado que las DC expresan niveles inusualmente altos de XBP-1, un factor de transcripción esencial para la homeostasis del ER durante las UPR [Ron, D. & Walter, P., 2007; Yoshida, H., et al., 2001; Calton, M. et al., 2002], que es necesario para la supervivencia y función normales de las DC, incluyendo la expresión de IFN- β [Iwakoshi, N. N. et al., 2007; Smith, J. A. et al., 2008]. Por otra parte, los inventores han mostrado que la activación de las DC conduce a un aumento masivo de la traducción de proteínas, así como a la producción de numerosas citoquinas, que en su mayoría utilizan la vía de secreción mediada por el ER. Curiosamente, LPS y poli I:C inducen de manera diferente GADD34, aunque también desencadenan diferentes niveles y cinética de la producción de citoquinas. Además, la expresión de GADD34 está disminuida en las DC con IFN- $\alpha\beta$ ^{-/-} activadas, lo que produce niveles reducidos de citoquinas en respuesta a productos microbianos. Finalmente, la desfosforilación del eIF2- α es evitada por el inhibidor farmacológico de PI3K, LY294002, que tiene también un fuerte efecto inhibitorio sobre la síntesis de proteínas [Lelouard, H. et al., 2007]. Por tanto, la expresión de GADD34 está estrechamente ligada a la intensidad de la síntesis de proteínas y a la producción de citoquinas en las DC activadas. Es posible que la iniciación brusca de la síntesis de proteínas temprana durante la maduración de las DC pudiera promover una situación transitoria similar a las UPR que conduciría a la traducción de ATF4 y posterior expresión de GADD34. Curiosamente, aunque el eIF2- α está claramente fosforilado en las DC inmaduras, no se observó gran aumento en esta fosforilación durante la primera fase de activación que explicara completamente la traducción de ATF4. Por tanto, la respuesta transcripcional a la detección de poli I:C es relativamente diferente de lo que se observa normalmente durante las UPR caracterizadas previamente e implica potencialmente un nuevo mecanismo de señalización capaz de inducir la producción de ATF4.

Los inventores han mostrado que el dsRNA soluble accede rápidamente al citosol de las DC y por lo tanto tiene el potencial de interactuar tanto con MDA5 como con PKR. La PKR es rápidamente activada por ligandos de TLR que promueven la señalización por p38 y NF- κ B [Williams, B.R., 2001]. Por tanto, la activación de PKR es necesaria para conseguir la maduración funcional de las DC, sin embargo su activación también debería conducir normalmente a la inhibición de la traducción por medio de la fosforilación del eIF2- α . Por tanto, la existencia de la respuesta a ATF4/GADD34 podría adaptarse a los estímulos microbianos detectados y a los niveles de activación de PKR requeridos para conseguir la maduración funcional de las DC. El poli I:C es probablemente un ejemplo extremo, ya que puede inducir la PKR a través de la señalización de TLR y también por medio del reconocimiento directo. Este bucle de control negativo sería particularmente importante para evitar la apoptosis prematura y para asegurar una producción óptima de citoquinas.

La inducción de GADD34 también podría tener algún efecto protector adicional frente a algunos aspectos de la maduración de las DC propiamente dichas. De hecho, la indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO) y la heme-oxigenasa-1 (HO-1) son dos enzimas catabólicas producidas por tumores y las DC maduras, que conforman la respuesta

inmunitaria por el agotamiento de triptófano y porfirina respectivamente en la proximidad de las DC [Munn, D.H. et al., 2005; Uyttenhove, C. et al., 2003; Chauveau, C. et al., 2005; Munn, D. H., 2006]. Los linfocitos T vecinos expuestos a estas condiciones son anergizados o diferenciados a través de la activación de GCN2 (agotamiento de triptófano) o HRI (agotamiento de heme). Por tanto, la expresión de GADD34 podría proteger a las DC de los efectos perjudiciales de la privación de triptófano y también probablemente del agotamiento de heme desencadenado por su propia activación o la activación de las DC vecinas. Esta especificidad permite que las DC prioricen las vías de transducción de la señalización que rigen su función de inmunidad innata sobre las vías que protegen normalmente su integridad celular del estrés que, si se activan, conducirían a la detención de la traducción, apoptosis o anergia en la mayoría de los tipos de células [Freigang, S., et Al., 2005].

10 **Ejemplo 2: La GADD34 es necesaria para controlar la infección por el virus de la chikunguña y la producción de IFN *in vitro* e *in vivo*.**

Materiales y Métodos

Virus.

Se obtuvieron aislados de CHIKV de individuos durante el brote de CHIKV de 2005-06 en isla Reunión y se amplificaron en células C6/36 de mosquito como se describe en [4]. El CHIKV-21 se aisló del suero de un varón recién nacido con encefalopatía asociada a CHIKV; el CHIKV-27 se aisló del fluido cerebroespinal, CSF, de otro varón recién nacido con encefalopatía; el CHIKV-115 del suero de una mujer de 24 años con síntomas clásicos de CHIK. El CHIKV-117 se aisló en el Institut de Médecine Tropicale du Service de Santé des Armées (IMTSSA), Marsella, Francia, durante el brote de CHIKV del 2000 en la República Democrática del Congo, del suero de una persona que presentaba síntomas clásicos de CHIK. Los títulos de las existencias de virus se determinaron por ensayo estándar en placas de células Vero y se expresaron como PFU por mL.

Células.

Los fibroblastos embrionarios de ratón de control y con GADD34^{-/-} fueron infectados con CHIKV con una multiplicidad de infección (MOI) de 10 y 50.

25 Animales.

Se obtuvieron ratones FVB endogámicos de Charles River Laboratories (Francia). Los ratones fueron criados de acuerdo con las directrices del Instituto Pasteur para la cría de animales y se mantuvieron en aisladores de nivel 3. A los ratones se les inocularon por vía ID en el tórax ventral 50 µL de una suspensión viral diluida con PBS para ratones adultos y 30 µL para neonatos. Los ratones infectados simuladamente recibieron PBS solo. Los ratones fueron anestesiados con isoflurano (Forene, Abbott Laboratories Ltd, Reino Unido). Se extrajo sangre por punción cardiaca, después de lo cual a cada ratón se le perfundieron por vía intracardiaca 40 mL de PBS a 4°C antes de la extracción de los órganos. Se homogeneizaron los tejidos y los títulos de virus de cada muestra de tejido se determinaron en células Vero por dosis infecciosa citopática 50 (TCID50) y los títulos virales en tejidos y en suero se expresaron como TCID50/g o TCID50/mL, respectivamente. Durante todo el proceso experimental se siguieron los principios del buen cuidado de los animales de laboratorio. Se realizaron estudios de mortalidad en grupos de seis ratones y de los títulos virales en tejidos de cuatro ratones en cada periodo.

Histología e inmunofluorescencia.

Los órganos de ratón se congelaron rápidamente en isopentano enfriado con nitrógeno líquido para preparar criocortes o se fijaron en paraformaldehído para su incrustación en parafina. Los tejidos incrustados en parafina se trataron para tinción histológica (hematoxilina y eosina). Para la inmunofluorescencia, las criosecciones se fijaron durante 10 minutos en metanol enfriado con hielo antes de incubación durante 12 horas a 4°C con los anticuerpos primarios seguido de incubación durante 1 hora con los anticuerpos secundarios. Se contratiñeron portaobjetos con Hoechst (Vector Lab). Se usaron los siguientes anticuerpos: anti-colágeno policlonal de conejo IV (Chemicon, Temecula CA, 1:200), anti-vimentina policlonal de pollo (Abcam, Cambridge, UK, 1:200), anti-GFAP monoclonal de ratón (BD Pharmingen 1:1000 ó 1:5000 para ver solamente los limitantes gliales), antígeno monoclonal anti-macrófago de rata F4/80 (Abcam, 1:100), anti-PECAM1/CD31 policlonal de conejo (Abcam, 1:400), anti-CHIKV de suero humano que fueron obtenidos y caracterizados por el Centre National de Référence des Arbovirus como positivos para IgM e IgG anti-CHIKV. Las especificidades de los marcadores se confirmaron sistemáticamente examinando los cortes en los que el anticuerpo primario estaba reemplazado por el isotipo de control o inmunoglobulinas a la misma concentración y por inmunotinción de tejidos no infectados de la misma raza de animal. Los portaobjetos se examinaron con un microscopio Zeiss AxioPlan 2 equipado con un sistema ApoTome con el fin de obtener cortes ópticos con un grosor de 0,7 µm. Las fotos y los apilamientos Z se obtuvieron con el programa informático AxioVision 4.5. Cuando era necesario, las imágenes fueron procesadas usando el programa de formación de imágenes J (<http://rsb.info.nih.gov.gate2.inist.fr/ij/>).

55 Resultados

Los fibroblastos tanto de origen humano como de ratón constituyen una célula diana principal del CHIKV en la fase

aguda de la infección. En ratones adultos con una señalización de IFN de tipo I totalmente anulada, la enfermedad asociada al CHIKV es particularmente grave y está correlacionada con las cargas virales más altas. Es importante destacar que los ratones con una copia del gen receptor de IFN- α/β (IFNAR) desarrollan una enfermedad leve, reforzando la implicación de la señalización del IFN de tipo I en el control de la replicación del CHIKV. Por tanto el CHIKV es un patógeno particularmente relevante para confirmar las observaciones de los inventores sobre el papel de la PKR y la GADD34 en el control de la producción de IFN de tipo I en respuesta al dsRNA. Los MEF de ratón de tipo natural y con GADD34 ^{$\Delta C/\Delta C$} se expusieron a 10⁶ PFU de CHIKV (intervalo 0,1-50 de la multiplicidad de infección [MOI]) durante 24 o 48 horas. Se monitorizaron los líquidos sobrenadantes de cultivo para determinar la presencia de los IFN de tipo I, mientras se estimó la infección productiva por expresión de GFP (Fig. 10 A y B). La infección productiva por CHIKV sólo se pudo observar a MOI máxima en los MEF de tipo natural, mientras que IFN- β se detectó a MOI baja y se produjo gran cantidad en un mayor intervalo de infección. En contraste con estos resultados, se observó un nivel muy alto de replicación viral en los MEF con GADD34 ^{$\Delta C/\Delta C$} , que eran exquisitamente sensibles al CHIKV mostrando una tasa de infección del 50% en comparación con solo el 15% observado en los MEF de tipo natural después de 24 horas de infección (MOI 50). Correlacionada con esta hipersensibilidad, la producción de IFN- β no se pudo detectar durante la infección por CHIKV de los MEF con GADD34 ^{$\Delta C/\Delta C$} , lo que indica de nuevo su incapacidad para producir citoquinas en respuesta al dsRNA citosólico, lo que es probable que facilite la replicación viral en el cultivo. Esta interpretación está claramente apoyada por la anulación similar de la replicación viral en los MEF tanto de tipo natural como con GADD34 ^{$\Delta C/\Delta C$} tratados brevemente con IFN- β antes de la infección (Fig. 10C), demostrando que la inactivación de GADD34 no favorece la replicación viral en presencia de niveles suficientes de IFN.

Como en los seres humanos, la patogenicidad del CHIKV es fuertemente dependiente de la edad en los ratones, y en ratones neonatos de menos de 12 días, el CHIKV induce una enfermedad grave acompañada de una alta tasa de mortalidad [Couderc, 2008]. Se ha mostrado que varios componentes de la respuesta inmunitaria innata tienen un impacto sobre la resistencia de ratones mayores y restringen eficazmente la infección por CHIKV y sus consecuencias. Se pusieron inyecciones intradérmicas (ID) de 10⁶ PFU del CHIKV a ratones neonatos naturales (FVB) y con GADD34 ^{$\Delta C/\Delta C$} para determinar la importancia de la vía de GADD34 durante el establecimiento de la respuesta antiviral innata en los animales completos. Como se observó anteriormente para los ratones C57/BL6 [Couderc, 2008], cuando se realizó la inoculación de CHIKV en neonatos FVB de 12 días, se observó una tasa de supervivencia del 100% entre las crías (Fig. 11). En fuerte contraste con estos resultados, los neonatos con GADD34 ^{$\Delta C/\Delta C$} de 12 días murieron todos antes de las 72 horas de la infección por CHIKV (Fig. 11). Demostrando además que la expresión funcional de GADD34 es un componente clave de la vía anti-viral y que está formando con ATF4 y PKR un módulo de señalización especializado en la respuesta de IFN de tipo I a los virus específicos que incluyen el grupo alfavirus y probablemente otras diversas familias virales que son detectadas por MDA5 y PKR.

Estos resultados muestran que la inhibición de la formación del complejo PP1/GADD34 utilizando un inhibidor como se ha definido anteriormente puede ser útil para disminuir la capacidad de las células para producir citoquinas. Los inhibidores de acuerdo con la invención se pueden usar por tanto para tratar afecciones inflamatorias, tales como sepsis o afecciones inflamatorias exacerbadas causadas por una enfermedad infecciosa o viral.

Referencias:

A través de esta solicitud diversas referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece esta invención. Las descripciones de estas referencias se incorporan en la presente descripción como referencia.

Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. & Flavell, R. A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature* 413, 732-8 (2001).

Anderson, P. & Kedersha, N. Stressful initiations. *J Cell Sci* 115, 3227-34 (2002).

Berlanga, J. J. et al. Antiviral effect of the mammalian translation initiation factor 2alpha kinase GCN2 against RNA viruses. *Embo J* 25, 1730-40 (2006).

Boyce, M. et al. A selective inhibitor of eIF2alpha dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science* 307, 935-9 (2005).

Calfon, M. et al. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 415, 92-6 (2002).

Chauveau, C. et al. Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression. *Blood* 106, 1694-702 (2005).

Chen, J. J. & London, I. M. Regulation of protein synthesis by heme-regulated eIF-2 alpha kinase. *Trends Biochem Sci* 20, 105-8 (1995).

Connor, J. H., Weiser, D. C., Li, S., Hallenbeck, J. M. & Shenolikar, S. Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 assembles a novel signaling complex containing protein phosphatase 1 and inhibitor 1. *Mol Cell Biol* 21, 6841-50 (2001).

- Couderc T, Chrétien F, Schilte C, Disson O, Brigitte M, Guivel-Benhassine F, Touret Y, Barau G, Cayet N, Schuffenecker I, Desprès P, Arenzana-Seisdedos F, Michault A, Albert ML, Lecuit M. A mouse model for Chikungunya: young age and inefficient type-I interferon signaling are risk factors for severe disease. *PLoS Pathog.* 2008 Feb 8;4(2):e29.
- 5 Diebold, S. S. et al. Viral infection switches non-plasmacytoid dendritic cells into high interferon producers. *Nature* 424, 324-8 (2003).
- Donze, O. et al. The protein kinase PKR: a molecular clock that sequentially activates survival and death programs. *Embo J* 23, 564-71 (2004).
- 10 Freigang, S., Probst, H. C. & van den Broek, M. DC infection promotes antiviral CTL priming: the 'Winkelried' strategy. *Trends Immunol* 26, 13-8 (2005). Munn, D. H. Indoleamine 2,3-dioxygenase, tumor-induced tolerance and counter-regulation. *Curr Opin Immunol* 18, 220-5 (2006).
- Gitlin, L. et al. Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 8459-64 (2006).
- 15 Harding, H. P., Zhang, Y., Bertolotti, A., Zeng, H. & Ron, D. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell* 5, 897-904 (2000).
- Harding, H. P. et al. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell* 6, 1099-108 (2000).
- Harding, H. P. et al. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell* 11, 619-33 (2003).
- 20 Hsu, L. C. et al. The protein kinase PKR is required for macrophage apoptosis after activation of Toll-like receptor 4. *Nature* 428, 341-5 (2004).
- Iwakoshi, N. N., Pypaert, M. & Glimcher, L. H. The transcription factor XBP-1 is essential for the development and survival of dendritic cells. *J Exp Med* 204, 2267-75 (2007).
- 25 Jousse, C. et al. Inhibition of a constitutive translation initiation factor 2alpha phosphatase, CREP, promotes survival of stressed cells. *J Cell Biol* 163, 767-75 (2003).
- Kawai, T. & Akira, S. Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol* 7, 131-7 (2006).
- Kedersha, N. & Anderson, P. Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochem Soc Trans* 30, 963-9 (2002).
- 30 Kedersha, N. et al. Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol* 169, 871-84 (2005).
- Leber, J. H. et al. Distinct TLR- and NLR-mediated transcriptional responses to an intracellular pathogen. *PLoS Pathog* 4, e6 (2008).
- Lelouard, H. et al. Regulation of translation is required for dendritic cell function and survival during activation. *J Cell Biol* 179, 1427-39 (2007).
- 35 Lu, L., Han, A. P. & Chen, J. J. Translation initiation control by heme-regulated eukaryotic initiation factor 2alpha kinase in erythroid cells under cytoplasmic stresses. *Mol Cell Biol* 21, 7971-80 (2001).
- Lu, P. D., Harding, H. P. & Ron, D. Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *J Cell Biol* 167, 27-33 (2004).
- 40 Marciniak, S. J. et al. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev* 18, 3066-77 (2004).
- Mellman, I. & Steinman, R. M. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 106, 255-8 (2001).
- Mellor, A. L. & Munn, D. H. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol* 4, 762-74 (2004).
- 45 Munn, D. H. et al. GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunity* 22, 633-42 (2005).
- Novoa, I., Zeng, H., Harding, H. P. & Ron, D. Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha. *J Cell Biol* 153, 1011-22 (2001).

- Novoa, I. et al. Stress-induced gene expression requires programmed recovery from translational repression. *Embo J* 22, 1180-7 (2003).
- 5 Okada, T., Yoshida, H., Akazawa, R., Negishi, M. & Mori, K. Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response. *Biochem J* 366, 585-94 (2002).
- Proud, C. G. PKR: a new name and new roles. *Trends Biochem Sci* 20, 241-6 (1995).
- Puccetti, P. On watching the watchers: IDO and type I/II IFN. *Eur J Immunol* 37, 876-9 (2007).
- Rintahaka, J., Wiik, D., Kovanen, P. E., Alenius, H. & Matikainen, S. Cytosolic antiviral RNA recognition pathway activates caspases 1 and 3. *J Immunol* 180, 1749-57 (2008).
- 10 Ron, D. & Walter, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 519-29 (2007).
- Samuel, C. E. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* 14, 778-809, table of contents (2001).
- Scheuner, D. et al. Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Mol Cell* 7, 1165-76 (2001).
- 15 Scheuner, D. et al. Double-stranded RNA-dependent protein kinase phosphorylation of the alpha-subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 mediates apoptosis. *J Biol Chem* 281, 21458-68 (2006).
- Smith, J. A. et al. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response are linked to synergistic IFN-beta induction via X-box binding protein 1. *Eur J Immunol* 38, 1194-203 (2008).
- 20 Todd, D. J., Lee, A. H. & Glimcher, L. H. The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 8, 663-674 (2008).
- Uyttenhove, C. et al. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med* 9, 1269-74 (2003).
- Williams, B. R. PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene* 18, 6112-20 (1999).
- Williams, B. R. Signal integration via PKR. *Sci STKE* 2001, RE2 (2001).
- 25 Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T. & Mori, K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 107, 881-91 (2001).
- Zhang, P. et al. The GCN2 eIF2alpha kinase is required for adaptation to amino acid deprivation in mice. *Mol Cell Biol* 22, 6681-8 (2002).
- 30 Zhang, K. & Kaufman, R. J. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* 454, 455-62 (2008).

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de la actividad o de la formación del complejo PP1/GADD34 para uso en el tratamiento de una afección inflamatoria.
- 5 2. Un inhibidor para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la afección inflamatoria se selecciona entre asma, miopatías, síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS), síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), enfermedades inflamatorias intestinales y sepsis.
3. Un inhibidor para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la afección inflamatoria es sepsis.
4. Un inhibidor para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el inhibidor es un inhibidor de GADD34.
- 10 5. Un inhibidor para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el inhibidor es un inhibidor de PP1 en complejo con GADD34.
6. Un inhibidor para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el inhibidor inhibe el dominio de interacción comprendido entre los residuos de aminoácidos 540 y 600 de GADD34.
7. Un inhibidor para uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, en donde el inhibidor se selecciona entre salubrinal, tautomicina, caliculina A y un péptido que consiste o que comprende un fragmento de GADD34.
- 15 8. Un inhibidor para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el inhibidor es un inhibidor selectivo del complejo PP1/GADD34.
9. Una composición terapéutica que comprende un inhibidor de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8, para uso en el tratamiento de una afección inflamatoria.

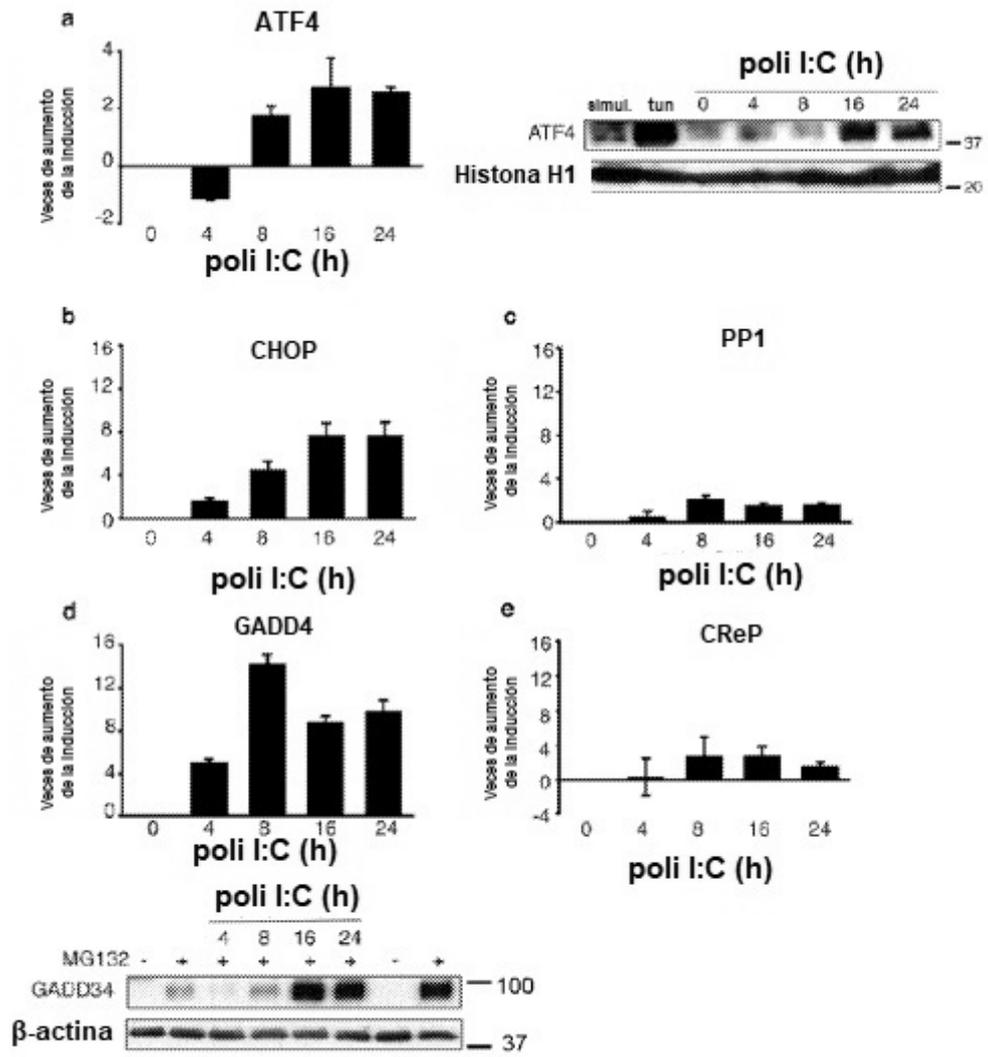


FIGURA 1

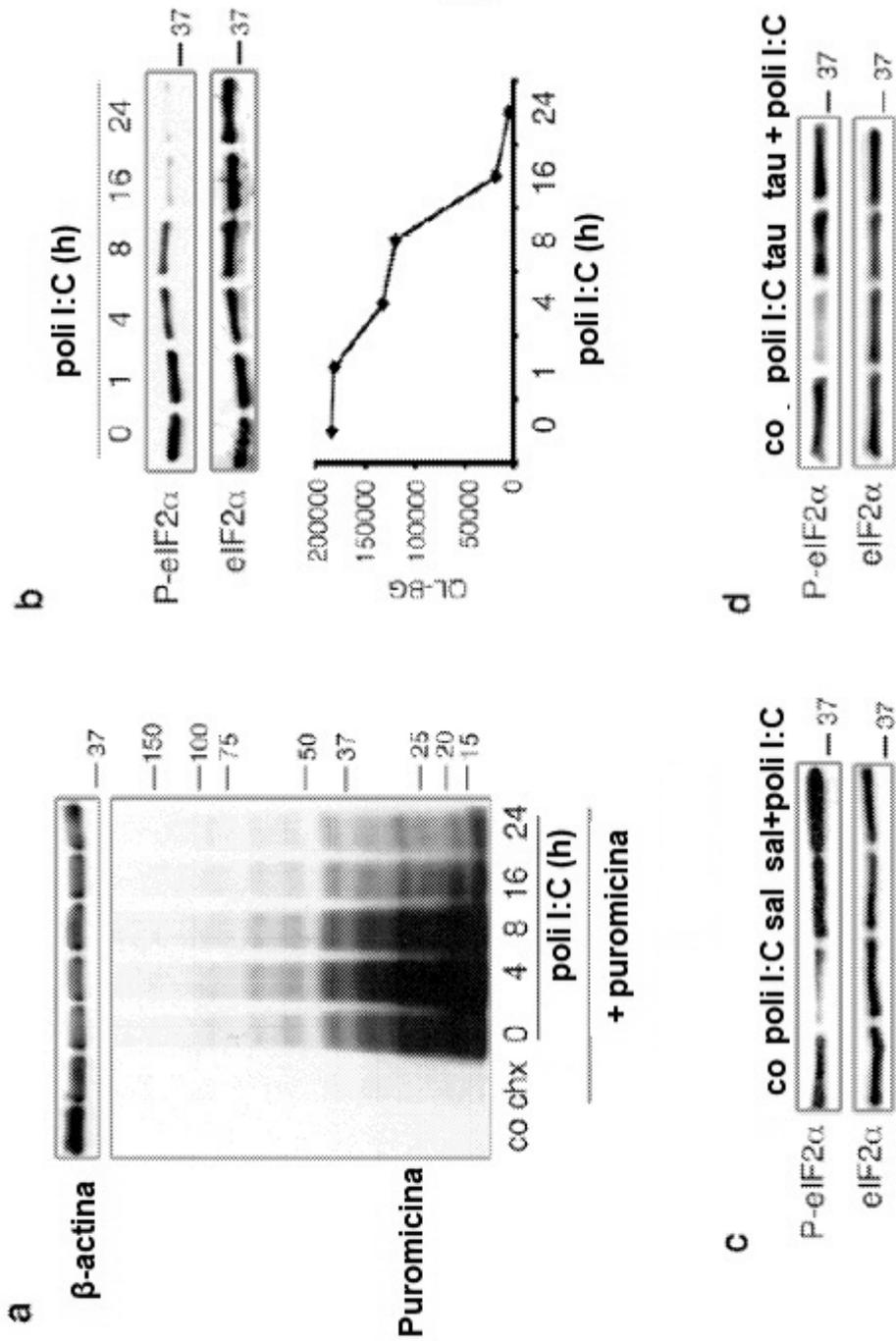


FIGURA 2

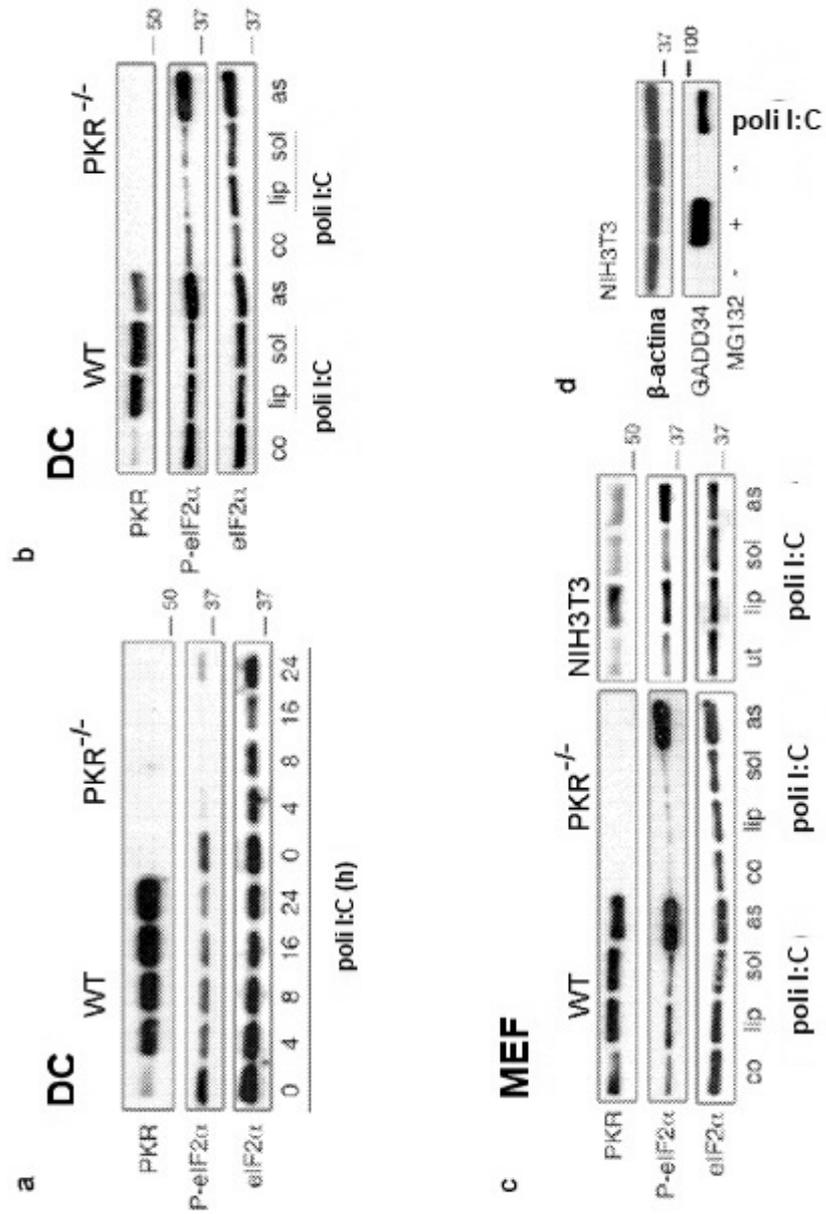


FIGURA 3

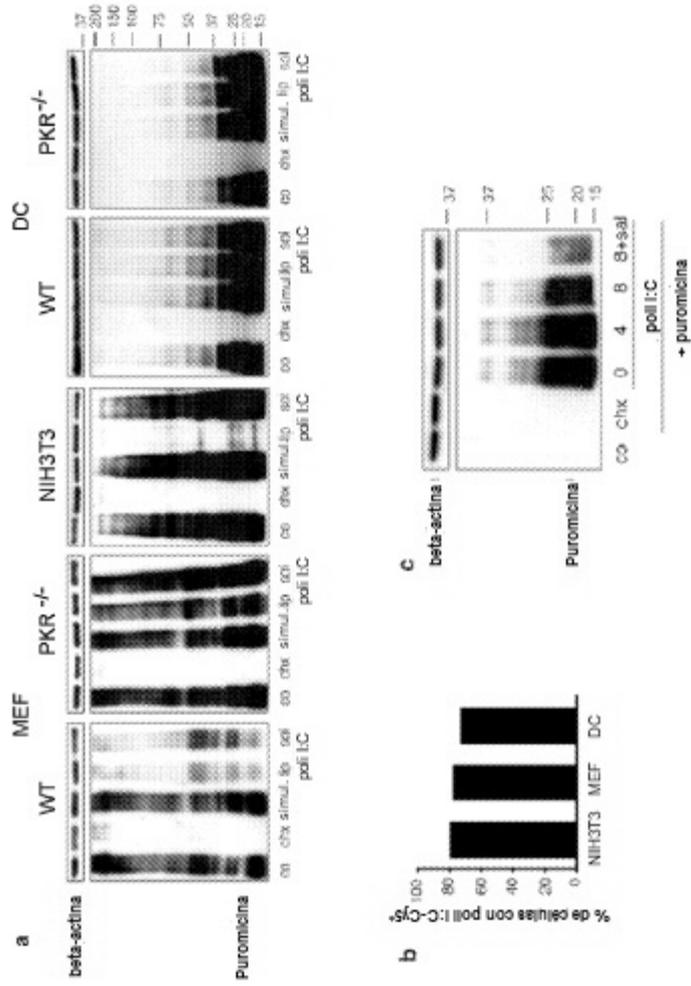


FIGURA 4

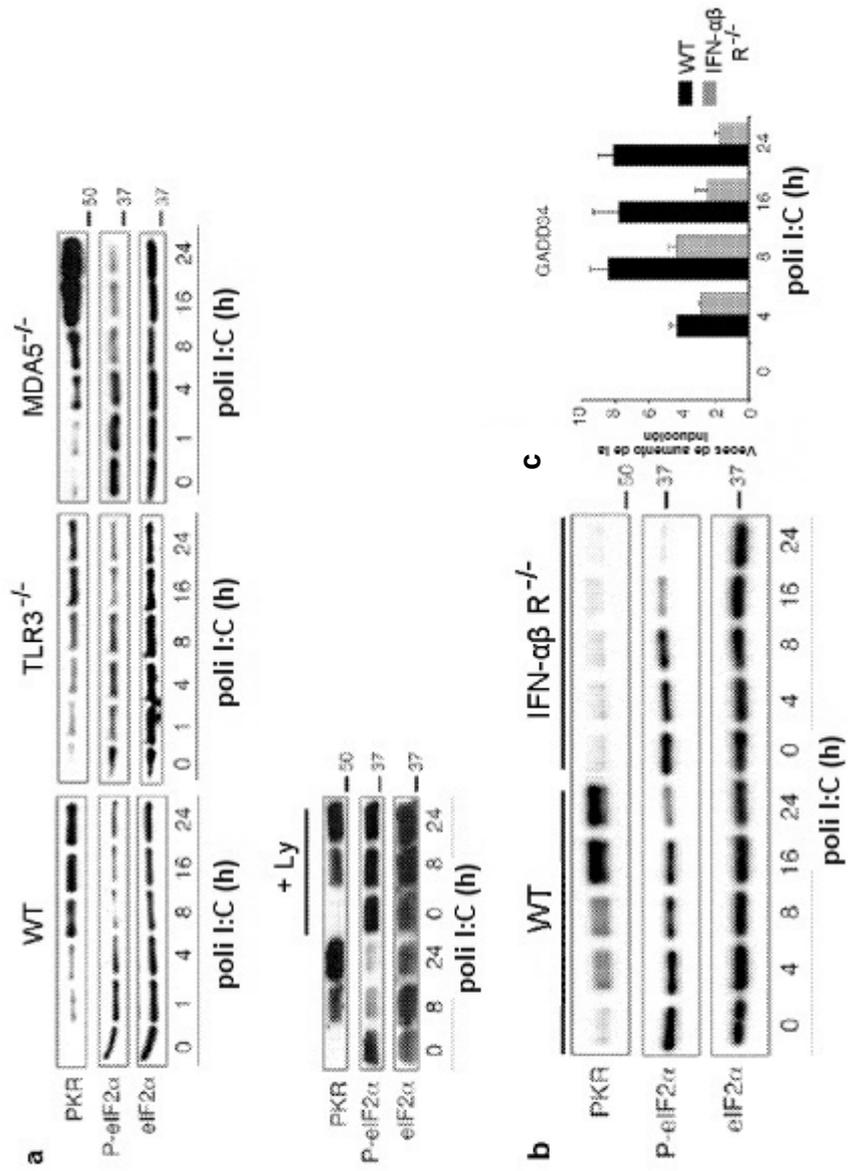


FIGURA 5

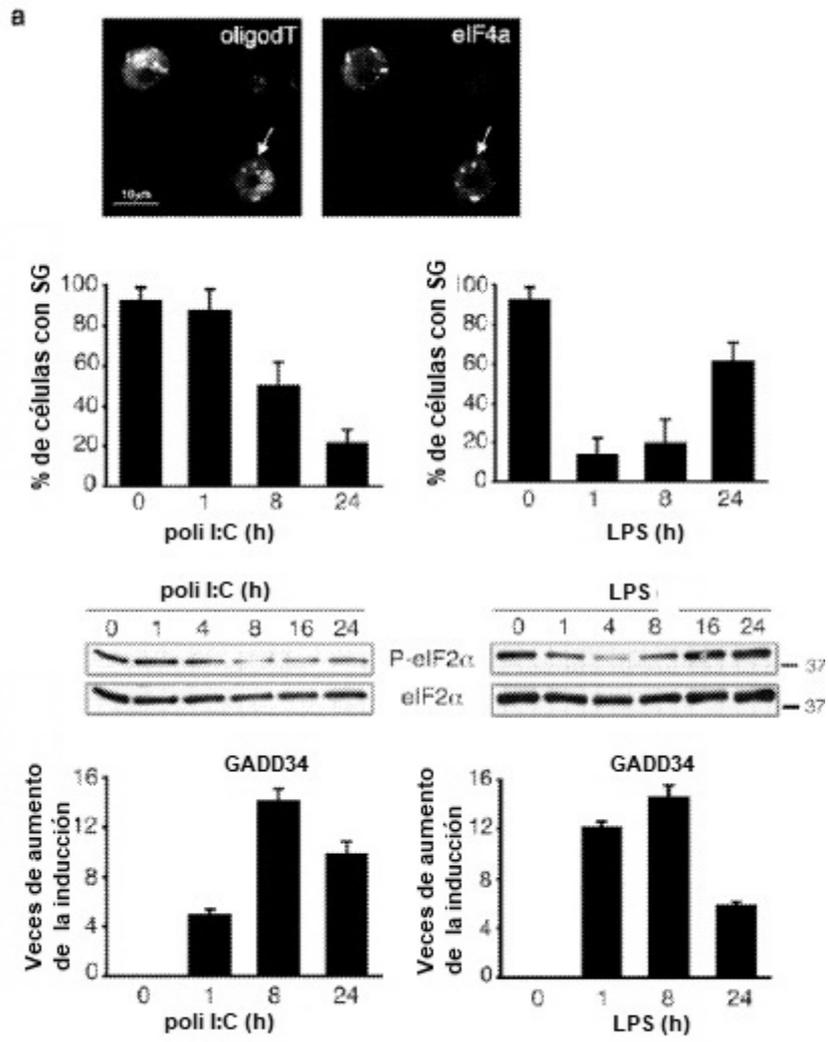


FIGURA 6A

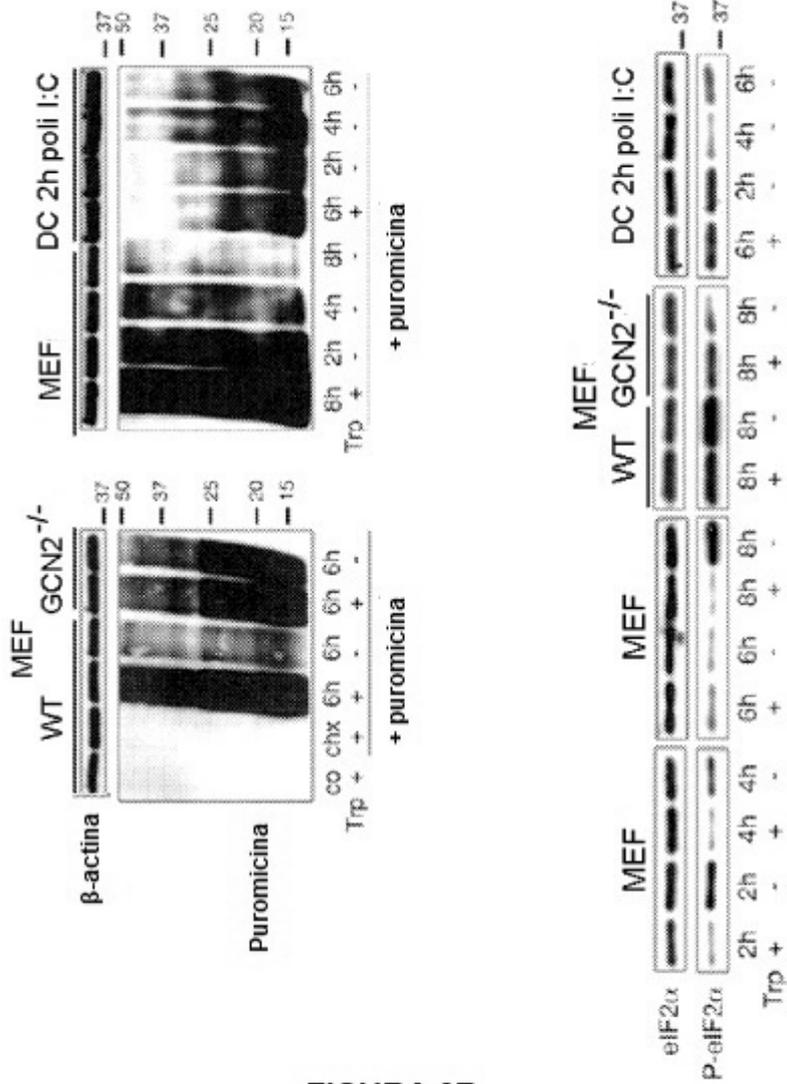


FIGURA 6B

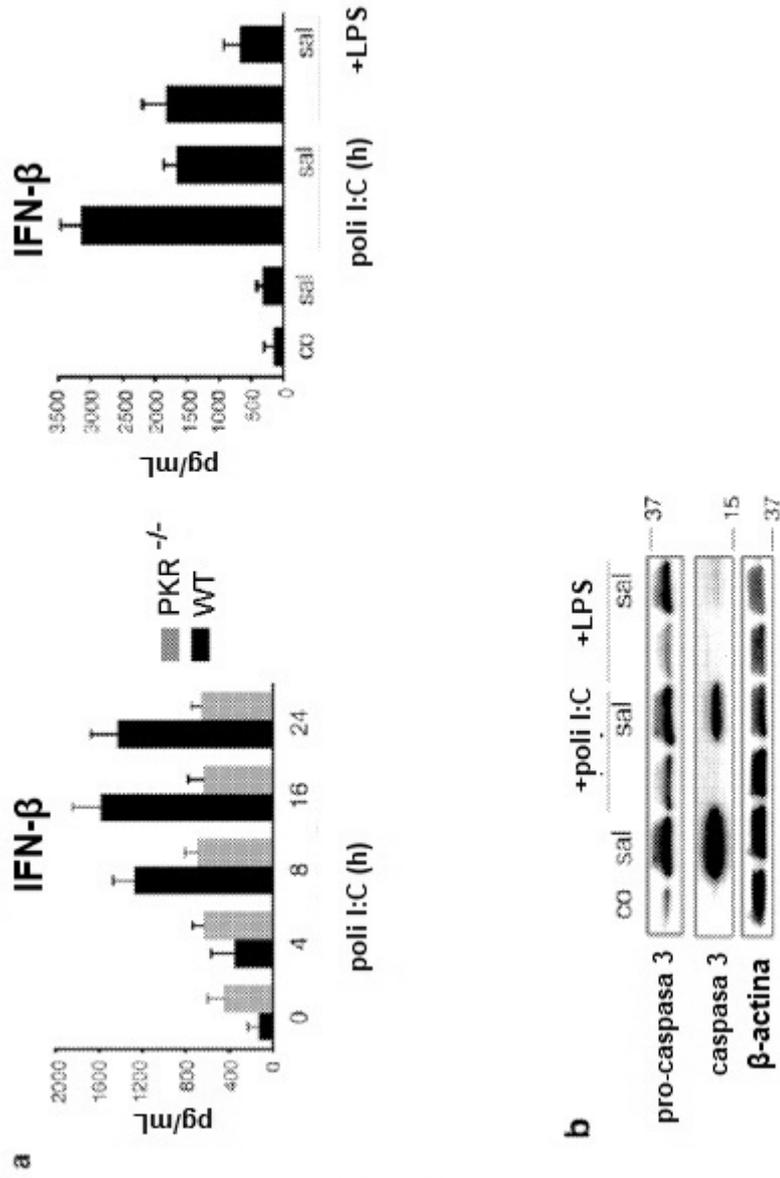


FIGURA 7

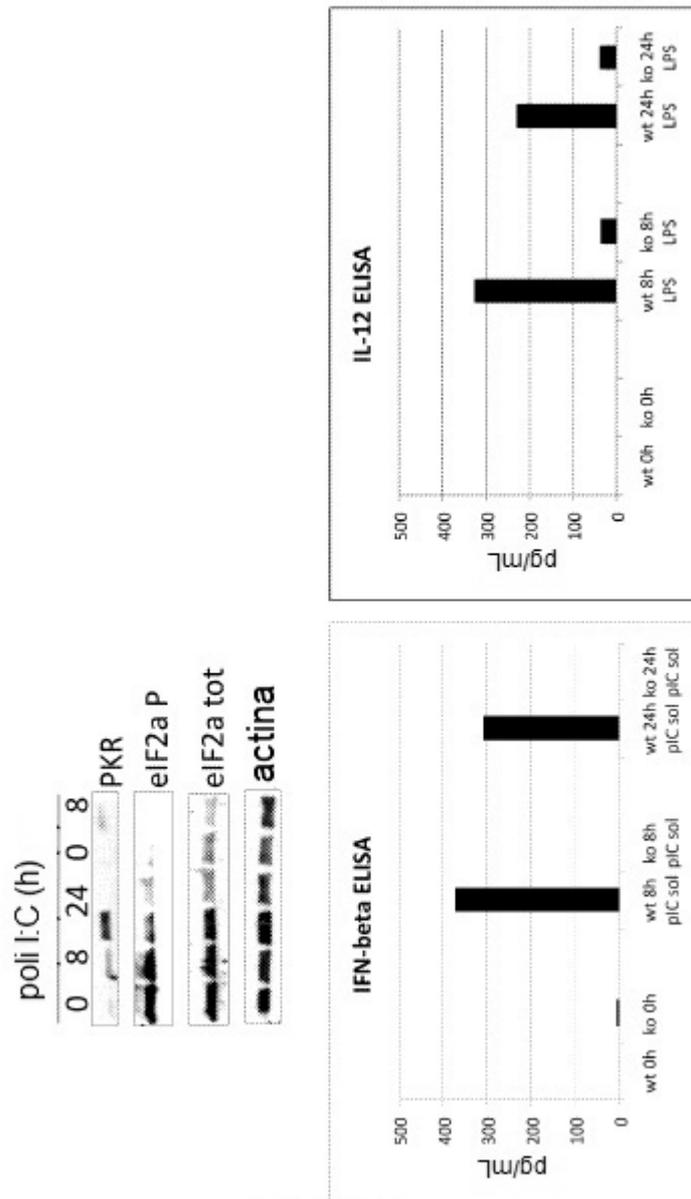


FIGURA 8

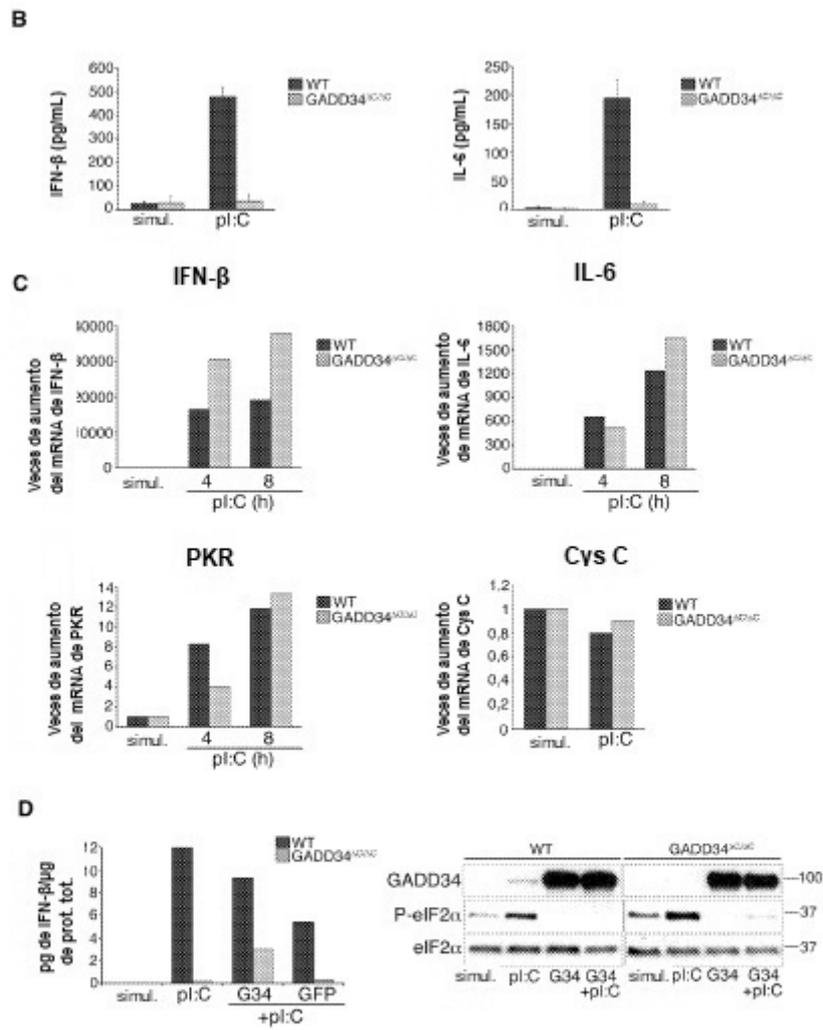
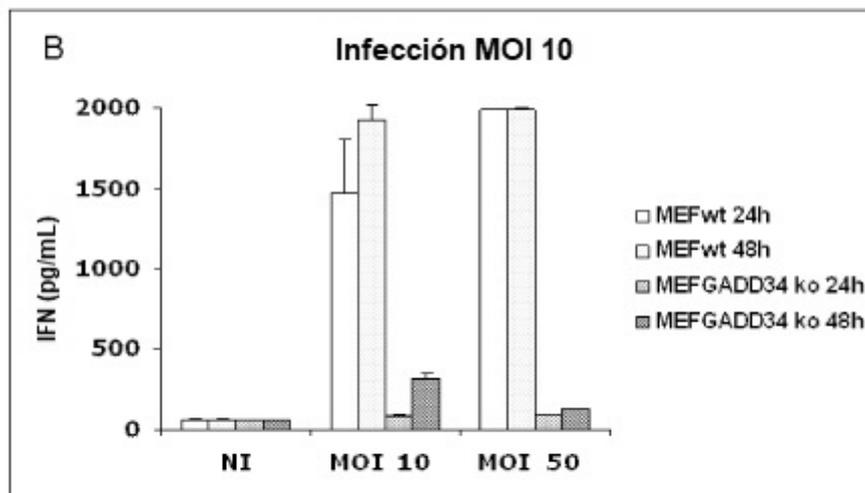
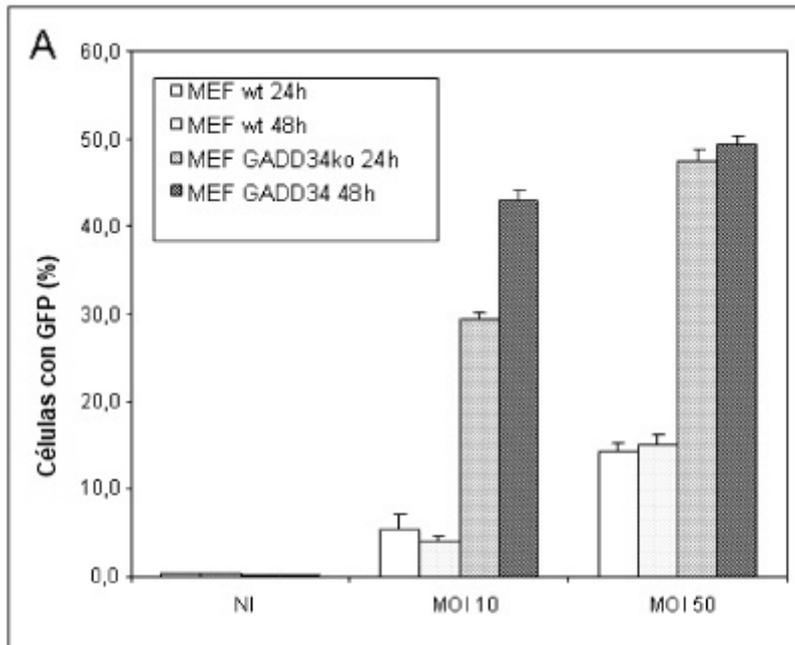


FIGURA 9



FIGURAS 10 A y B

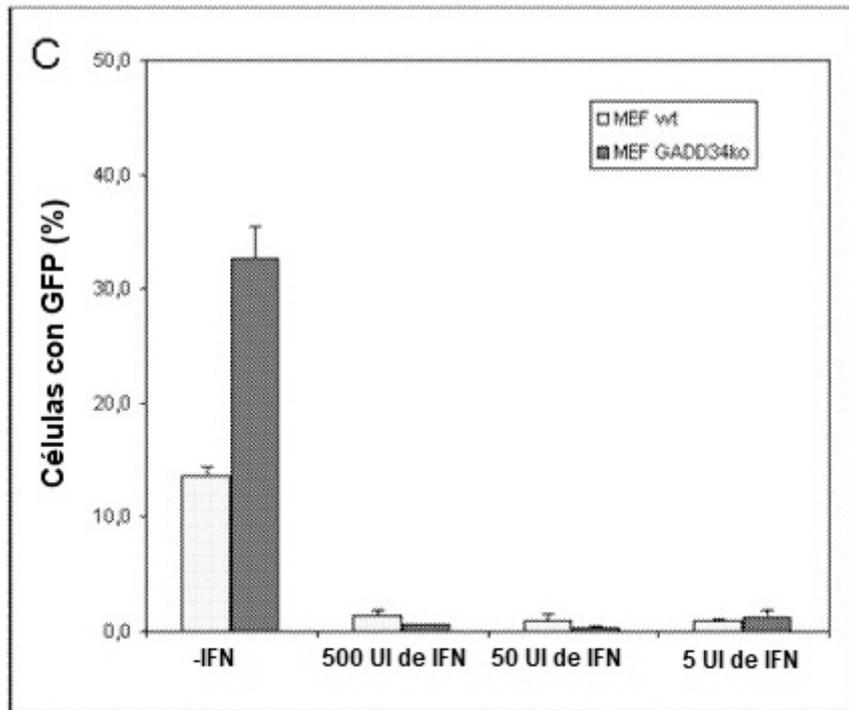


FIGURA 10 C

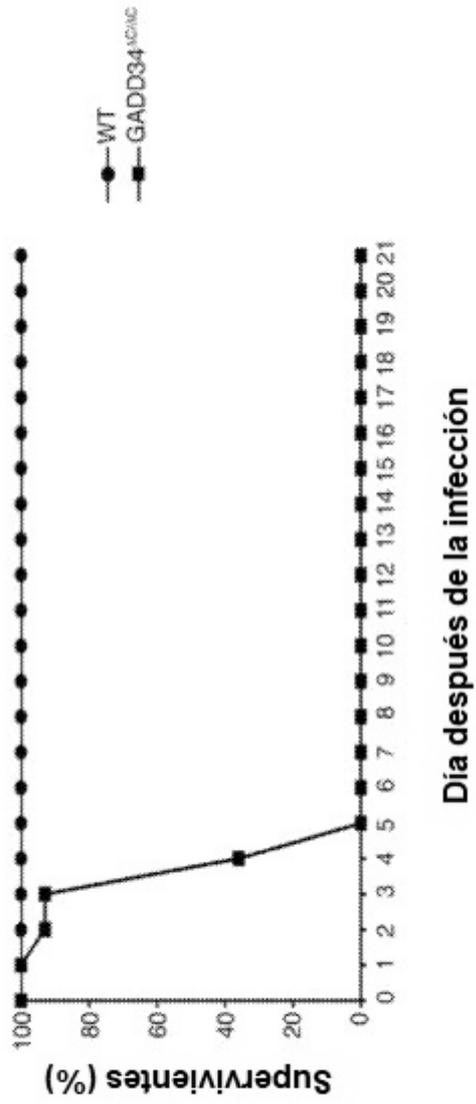


FIGURA 11