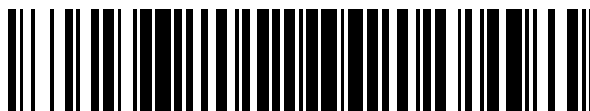


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 992**

51 Int. Cl.:

**A61P 35/00** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2007 E 11190918 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.11.2014 EP 2428252**

54 Título: **La neutralización de la actividad de CD95 bloquea la invasión de células de glioblastoma in vivo**

30 Prioridad:

**28.12.2006 US 877367 P**

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

**03.12.2014**

73 Titular/es:

**DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM  
STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS (50.0%)  
Im Neuenheimer Feld 280  
69120 Heidelberg, DE y  
UNIVERSITÄTSKLINIKUM HEIDELBERG (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MARTÍN-VILLALBA, ANA;  
KLEBER, SUSANNE;  
WIESTLER, BENEDIKT;  
KRAMMER, PETER G.;  
HEROLD-MENDE, CHRISTEL y  
SANCHO-MARTÍNEZ, IGNACIO**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 523 992 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

La neutralización de la actividad de CD95 bloquea la invasión de células de glioblastoma in vivo.

### 5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos para el tratamiento de un individuo con glioblastoma multiforme de alto grado mediante la prevención o la interrupción de la unión de CD95 a su ligando, CD95L, in vivo, a raíz de lo cual la neutralización de la actividad de CD95 reduce drásticamente la migración de las células que invaden el hemisferio contralateral.

### 10 **Antecedentes**

La invasión de tejido cerebral circundante por las células tumorales aisladas representa uno de los principales obstáculos para una terapia eficaz de glioblastoma multiforme (GBM). Los gliomas abarcan la mayoría de los tumores originados en el sistema nervioso central (SNC). En los adultos, los tumores más comunes son neoplasmas de alto grado derivados de astrocitos u oligodendrocitos. La Organización Mundial de la Salud clasifica estos tumores malignos de acuerdo con su grado de anaplasia en grado II (astrocitoma difuso), grado III (astrocitoma anaplásico) y grado IV (GBM)<sup>1</sup>.

Los gliomas representan más del 50% de todos los tumores cerebrales y son, con mucho, los tumores cerebrales primarios más comunes en los adultos. A pesar del desarrollo de nuevas tecnologías de diagnóstico, la tasa de supervivencia es extremadamente baja. Solo 3% permanecen aún con vida cinco años después del diagnóstico. El resultado clínico de los gliomas malignos depende de la invasión de células tumorales aisladas en el tejido cerebral normal. Las células en migración pueden escapar de la ablación quirúrgica del tumor y son entonces los principales objetivos de la radioterapia después de la cirugía y la quimioterapia adyuvante. Los agentes quimioterapéuticos y la irradiación actúan principalmente mediante la inducción de la apoptosis. Esta inducción de la apoptosis a menudo implica la activación del sistema receptor/ligando de muerte CD95 (Apo-1/Fas). Sin embargo, la mayoría de las células de glioma maligno son resistentes a la apoptosis inducida por CD95. En la presente los autores de la presente invención muestran que la activación de CD95 aumenta la migración/invasión en cultivos de glioma a largo plazo y primarios humanos resistentes a la apoptosis. Es decir, la activación de CD95 puede implicar el inicio de la actividad de CD95 mediante el uso de un anticuerpo agonista de CD95 o CD95L recombinante.

La tendencia de los tumores de glioma primarios a la migración durante la apoptosis aumenta con el grado de malignidad. CD95 media la migración a través de la ruta PI3K/ILK/GSK3-beta/MMP de forma independiente de caspasas. Además los autores de la presente invención trataron de averiguar las moléculas conectoras aguas abajo de CD95. Un posible candidato fue la Fosfoproteína enriquecida en Diabetes/Fosfoproteína enriquecida en astrocitos de 15 kDalton" (PED/PEA-15). Experimentos de reducción de la expresión génica excluyeron PED/PEA-15 como molécula conectora en la ruta de señalización de la migración mediada a través del Sistema CD95/CD95L. Lo más importante, la irradiación gamma también aumentó la migración de las células resistentes a la muerte inducida por CD95. La migración mediada por irradiación podría ser bloqueada por la neutralización de CD95L. Por lo tanto, la reacción de un tumor a la estimulación con CD95 debe dictar opciones de tratamiento posteriores. Véase Kleber, S., "Gamma irradiation leads to CD95 dependent invasion in apoptosis resistant glioblastoma cells," Ph. D. Thesis, Deutsches Krebsforschungszentrum, University of Heidelberg, 3 de Enero, 2006 (um:nbn:de:bsz:16-opus-59926, disponible en [www.ub.uni-heidelberg.de/archiv/5992/](http://www.ub.uni-heidelberg.de/archiv/5992/)), que se incorpora a la presente memoria como referencia en su totalidad.

Los principales tipos de gliomas son ependimomas, astrocitomas, y oligodendrogliomas, si bien existen también formas celulares mixtas de afecciones celulares de glioma, tales como los oligoastrocitomas.

Además de una caracterización celular, los gliomas también se caracterizan de acuerdo a la patología y la gravedad de la invasión celular, que se reconoce típicamente por los expertos en la técnica como un sistema de clasificación de "calificación".

El sistema de calificación más utilizado es el sistema de clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para los astrocitomas. El sistema de la OMS asigna a los astrocitomas una calificación de I a IV, siendo I el menos agresivo y siendo IV el más agresivo. Por lo tanto, el astrocitoma pilocítico es un ejemplo de un glioma de Grado I de la OMS; el astrocitoma difuso es un ejemplo de Grado II de la OMS; el astrocitoma anaplásico (maligno) es un ejemplo del Grado III de la OMS; y el glioblastoma multiforme es un ejemplo de Grado de la OMS IV. Este último es el glioma más común en los adultos y, por desgracia, tiene el peor pronóstico de los pacientes afectados.

Genéricamente, los gliomas de "bajo grado" están típicamente bien diferenciados, tienen el crecimiento más lento, son biológicamente menos agresivos, y auguran un mejor pronóstico para el paciente; mientras que los "gliomas de alto grado", son indiferenciados o anaplásicos; de crecimiento rápido y pueden invadir los tejidos adyacentes, y

conlleven a un peor pronóstico. Los gliomas de alto grado son tumores altamente vasculares y tienen una tendencia a infiltrarse en los tejidos, crear necrosis e hipoxia, y a destruir la barrera hematoencefálica, donde se encuentra el tumor.

- 5 También hay gliomas infratentoriales, que se producen principalmente en los niños y supratentoriales en el adulto. Los gliomas infratentoriales se encuentran en todas las zonas cerebrales interiores por debajo de la superficie inferior de los lóbulos temporal y occipital, extendiéndose a la médula cervical superior, e incluye el cerebelo. La región supratentorial se encuentra por encima de la tienda del cerebelo y contiene el prosencéfalo.
- 10 El grado del tumor es un importante factor pronóstico: la supervivencia media para los astrocitomas de grado III es de 3 a 4 años y para los astrocitomas de grado IV es de 10 a 12 meses. El glioma más frecuente (65%) es GBM<sup>1</sup>. La resistencia celular a múltiples estímulos pro-apoptóticos y la invasión de la migración de las células tumorales al tejido cerebral circundante normal son los principales obstáculos para un tratamiento efectivo.
- 15 El tratamiento actual de los gliomas malignos (grado III y IV) implica cirugía, seguido de irradiación y quimioterapia. Los agentes quimioterapéuticos y la irradiación actúan principalmente mediante la inducción de la apoptosis. La inducción de la apoptosis a menudo implica la activación del sistema de muerte CD95/ligando de CD95 (CD95L; Apo1L/FasL)<sup>2,3</sup>. La unión de CD95L trimerizado al receptor CD95 conduce al reclutamiento de la proteína adaptadora FADD (dominio de muerte asociado a Fas, MORT1)<sup>4</sup> y la caspasa 8 y 10 por un complejo de señalización que induce muerte (DISC)<sup>5</sup>. La FADD contiene un dominio de muerte (DD) y un dominio efector de muerte (DED). A través de su DD, FADD se une a DD de CD95<sup>6</sup>. El DED recluta la procaspasa 8 que contiene DED al DISC<sup>7</sup>. La procaspasa 8 en el DISC se activa a través de autoescisión y envía la célula a la apoptosis mediante la activación de las caspasas efectoras aguas abajo<sup>8</sup>.
- 20
- 25 El sistema CD95/CD95L es utilizado por las células de glioma maligno para aumentar su capacidad de invasión. CD95 induce la invasión celular a través de la ruta PI3K/ILK/GSK3 $\beta$  y la posterior expresión de las metaloproteinasas. El aumento de expresión de CD95L es exhibida por las células de glioma irradiadas que escapan a la ablación quirúrgica. La actividad de CD95 inducida por irradiación aumentó la migración de células de glioma. En un modelo singénico murino de GBM intracraneal, expresión CD95/CD95L fue sorprendentemente regulada al alza tras la interacción con el estroma cerebral circundante.
- 30

El grado de expresión de CD95 y CD95L se correlaciona positivamente con el grado del tumor. En la presente los autores de la presente invención muestran que la activación de CD95 causó apoptosis en tumores menos malignos (OMS I-II), mientras que los tumores de grado IV fueron resistentes a la apoptosis inducida por CD95. En estas células altamente malignas, CD95 media la migración/invasión. La unión de CD95 por el CD95L activa PI3K e ILK, lo que conduce a la inhibición de GSK3 $\beta$  y a la inducción de las metaloproteinasas. La irradiación de las células resistentes a la apoptosis aumentó la expresión de CD95 y CD95L, que a su vez aumentó la expresión de las metaloproteinasas y, posteriormente, la migración/invasión. En un modelo de ratón singénico de gliomas intracraneales, la expresión de CD95 y CD95L se reguló al alza tras la interacción con el estroma circundante. La neutralización de la actividad de CD95 redujo drásticamente el número de células que invaden el hemisferio contralateral.

35

40

Kleber, S. "Gamma-Bestrahlung führt zur CD95-abhängiger Invasivität in apoptoseresistenten Glioblastomzellen.", 2006, Dissertation (Heidelberg) ilustra que un anticuerpo anti-CD95L inhibe la migración in vitro de células de glioblastoma inducida por una proteína de fusión con cremallera de leucina - CD95L y resume las terapias actuales de los gliomas.

45

### Compendio

50 La presente invención proporciona un método para el tratamiento de un individuo con un glioma de alto grado, que comprende la administración de un agente que neutraliza la actividad de CD95 en un individuo con glioma de alto grado.

55 En una realización, el agente que neutraliza la actividad de CD95 es un compuesto que evita la unión de CD95 a CD95L o interrumpe un complejo CD95/CD95L.

En una realización el compuesto se une a CD95 o se une a CD95L o se une al complejo CD95/CD95L.

60 En otra realización, el compuesto es un anticuerpo que se une a CD95. En otra realización, el compuesto es un anticuerpo que se une a CD95L. Los anticuerpos de acuerdo con la invención pueden ser monoclonales, policlonales o quiméricos. Sin embargo, también se pueden utilizar anticuerpos de cadena sencilla o fragmentos de anticuerpos funcionales. En una realización, el anticuerpo que se une a CD95 es Nok1. De este modo, la presente invención contempla cualquier agente de neutralización o "inhibidor" de la actividad CD95 o CD95L o CD95R (el receptor CD95).

Para la producción de anticuerpos utilizados de acuerdo con la invención, diversos anfitriones incluyendo cabras, conejos, ratas, ratones, seres humanos, y otros, pueden ser inmunizados mediante inyección con la proteína o cualquier fragmento u oligopéptido de la misma que tenga propiedades inmunogénicas. Dependiendo de la especie anfitriona, se pueden utilizar diversos coadyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica. Se prefiere que los péptidos, fragmentos u oligopéptidos utilizados para inducir anticuerpos frente a la proteína tengan una secuencia de aminoácidos que consista en al menos cinco aminoácidos, y más preferiblemente al menos 10 aminoácidos. Los anticuerpos monoclonales contra las proteínas se pueden preparar usando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en cultivo. Estas incluyen, pero no se limitan a, la técnica del hibridoma, la técnica del hibridoma de células B humanas. Además, se pueden utilizar las técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos", el empalme de genes de anticuerpos de ratón a genes de anticuerpos humanos para obtener una molécula con especificidad de antígeno y actividad biológica apropiadas. Los anticuerpos se pueden usar con o sin modificación, y se pueden marcar uniéndolos, ya sea covalentemente o no covalentemente, con, por ejemplo, una molécula informadora.

Se pueden usar diversos inmunoanálisis de escrutinio para identificar anticuerpos que tienen la especificidad deseada. Numerosos protocolos para análisis de unión competitiva e inmunoradiométricos que utilizan anticuerpos policlonales o monoclonales con especificidades establecidas son bien conocidos en la técnica. Tales inmunoanálisis implican típicamente la medición de la formación de complejos entre la proteína, es decir, CD95 y su anticuerpo específico. Se prefiere un inmunoanálisis con basado en anticuerpos monoclonales, de dos sitios, que utiliza anticuerpos monoclonales reactivos con dos epítomos de proteínas que no interfieren, pero también se puede emplear un análisis de unión competitiva.

Un inhibidor puede ser un inhibidor del ligando de CD95 (ligando Fas; ligando APO1). Por ejemplo, los inhibidores del ligando de CD95 pueden ser seleccionados a partir de (a) un anticuerpo inhibidor anti-ligando de CD95 o un fragmento del mismo, (b) una molécula receptora CD95 soluble o una porción de unión al ligando de CD95 de la misma, y (c) un inhibidor del ligando Fas seleccionado entre FLINT, DcR3 o fragmentos de los mismos.

También se contemplan los anticuerpos inhibidores anti-CD95L y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos y moléculas CD95R solubles o porciones de unión a CD95L de las mismas. Los ejemplos de los anticuerpos inhibidores anti-CD95L adecuados se describen en el documento EP-A-0 842 948, el documento WO 96/29350, y el documento WO 95/13293 así como anticuerpos quiméricos o humanizados obtenidos de allí, véase por ejemplo, WO 98/10070. Más preferidas son las moléculas solubles del receptor de CD95, por ejemplo una molécula receptora de CD95 soluble sin dominio transmembrana como se describe en el documento EP-A-0 595 659 y el documento EP-A-0 965 637 o péptidos CD95R como se describe en el documento WO 99/65935.

En una realización, un inhibidor de CD95L que comprende un dominio extracelular de la molécula CD95R, tal como los aminoácidos 1 al 172 (MLG...SRS) de la secuencia madura de CD95 según la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.891.434, que puede estar fusionado a un dominio polipeptídico heterólogo, particularmente una molécula de inmunoglobulina Fc que incluye la región bisagra por ejemplo, de la molécula de IgG1 humana. Una proteína de fusión que comprende un dominio extracelular de CD95 y un dominio Fc humano se describe en el documento WO 95/27735. Por lo tanto, de acuerdo con una realización preferida, el agente que se une a CD95L es una proteína de fusión que comprende un dominio extracelular de CD95 y un dominio Fc humano. De acuerdo con una realización especialmente preferida, el agente que se une a CD95L es APG101 (CD95-FC, SEQ ID NO: 1). APG101 comprende los dominios CD95R-ECD (aminoácidos 17-172, dominio extracelular ECD) e IgG1-Fc (aminoácidos 173-400).

APG101 y SUS derivados se describen en los documentos WO95/27735 y WO2004/085478.

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

En una realización adicional de la presente invención, el inhibidor es un inhibidor de CD95R que puede ser seleccionado de (a) un anticuerpo inhibidor anti-receptor de CD95 o un fragmento del mismo, y (b) un fragmento inhibidor del ligando de CD95. Un fragmento de un anticuerpo inhibidor anti-receptor de CD95 de acuerdo con la invención presenta preferiblemente el mismo sitio de unión al epítomo que el anticuerpo correspondiente. En otra realización de la invención, un fragmento de un anticuerpo inhibidor anti-receptor de CD95 tiene sustancialmente la misma actividad inhibidora de CD95R que el anticuerpo correspondiente. Un fragmento inhibidor del ligando de CD95 presenta preferiblemente sustancialmente la misma actividad inhibidora que el fragmento inhibidor del ligando de CD95 correspondiente.

Los ejemplos de los anticuerpos inhibidores anti-CD95R y los fragmentos inhibidores de CD95L adecuados se describen en los documentos EP-A-0 842 948 y EP-A-0 862 919.

- También se describe un inhibidor que es una molécula efectora de ácido nucleico. La molécula efectora de ácido nucleico puede ser ADN, ARN, APN o un híbrido de ADN-ARN. Puede ser monocatenario o bicatenario. Los vectores de expresión derivados de retrovirus, adenovirus, virus herpes o vaccinia o de diversos plásmidos bacterianos pueden ser utilizados para la entrega de secuencias de nucleótidos al órgano, tejido o población celular dianas. Tales constructos se pueden utilizar para introducir secuencias efectoras o antisentido no traducibles en una célula. Incluso en ausencia de integración en el ADN, tales vectores pueden continuar transcribiendo moléculas de ARN hasta que son desactivadas por nucleasas endógenas. La expresión transitoria puede durar un mes o más con un vector no replicante y aún más si los elementos de replicación apropiados son parte del sistema de vectores.
- La molécula efectora de ácido nucleico se puede seleccionar en particular a partir de moléculas antisentido, moléculas de ARNi y ribozimas que son capaces de inhibir la expresión del gen de CD95R y/o CD95L. Vease, por ejemplo, el documento U.S. 20060234968. En otra realización, el glioma de alto grado es un Grado III o IV de la OMS. En una realización preferida, el glioma de alto grado es un glioma Grado IV de la OMS.
- También se describe un agente neutralizador de la actividad de CD95 que evita una interacción entre CD95 y la proteína p85 de PI3K.
- De acuerdo con la presente invención la actividad de CD95 puede ser determinada por la persona experta en la técnica mediante cualquier tipo de análisis adecuado, tal como se describe en el Ejemplo 25 o el Ejemplo 26.
- La presente descripción también se refiere a una composición farmacéutica, que comprende al menos un agente que neutraliza la actividad de CD95 en un individuo con glioma de alto grado. En una realización el agente es Nok1 o CD95-FC (APG101). CD95-FC se une a CD95L y de ese modo evita su unión a CD95.
- En otra realización de la descripción la composición farmacéutica comprende al menos un agente que se une a CD95 y al menos otro agente que se une a CD95L. La presente invención también proporciona un medicamento para tratar a un paciente con glioma mediante la administración de una de las composiciones farmacéuticas contempladas en la presente memoria. En una realización, el glioma es un glioma clasificado de Grado III o Grado IV por la OMS, o un glioma de "alto grado".
- En otra realización preferida de la descripción la composición farmacéutica puede comprender adicionalmente agentes activos para el tratamiento de cáncer y en particular para el tratamiento de glioma de alto grado.
- Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar solas o combinadas con al menos otro agente, tal como un compuesto estabilizador, que puede administrarse en cualquier vehículo farmacéutico biocompatible estéril, incluyendo, pero no limitado a, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, y agua. Las composiciones se pueden administrar a un paciente solas o combinadas con otros agentes, fármacos u hormonas. Las composiciones farmacéuticas utilizadas en esta invención pueden administrarse mediante cualquier número de rutas, incluyendo, pero no limitados a, medios orales, intravenosos, intramusculares, intraarteriales, intramedulares, intratecales, intraventriculares, transdérmicos, subcutáneos, intraperitoneales, intranasales, enterales, tópicos, sublinguales o rectales.
- Además de los ingredientes activos, estas composiciones farmacéuticas pueden contener vehículos adecuados farmacéuticamente aceptables que comprenden excipientes y agentes auxiliares, que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones, que pueden usarse farmacéuticamente. Los detalles adicionales sobre las técnicas para la formulación y administración pueden encontrarse en la última edición de Remington Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing Co., Easton, Pa.).
- Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en la invención incluyen composiciones en las que los ingredientes activos están contenidos en una cantidad eficaz para conseguir el efecto deseado. La determinación de una dosis eficaz está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica. Para cualquier compuesto, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente en análisis de cultivo celulares, por ejemplo, de líneas celulares preadipocíticas o en modelos animales, normalmente ratones, conejos, perros o cerdos. El modelo animal también se puede usar para determinar el intervalo de concentración y la ruta de administración apropiados. Tal información puede usarse a continuación para determinar las dosis y las rutas para la administración útiles en seres humanos. Una dosis terapéuticamente eficaz hace referencia a la cantidad de ingrediente activo, por ejemplo un ácido nucleico o una proteína como se describe en la presente memoria o un anticuerpo, que es suficiente para el tratamiento de una afección específica. La eficacia terapéutica y la toxicidad pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, p. ej., la DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población) y la DL50 (la dosis letal para el 50% de la población). La razón de dosis entre los efectos terapéuticos y tóxicos es el índice terapéutico, y puede expresarse como la razón DL50/DE50. Se prefieren las composiciones farmacéuticas que exhiben índices terapéuticos grandes. Los datos obtenidos a partir de los análisis de cultivos celulares y los estudios con animales se usan para formular un intervalo de dosificación para uso humano. La dosificación contenida en tales composiciones está preferiblemente dentro de

un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación varía dentro de este intervalo dependiendo de la dosis empleada, la sensibilidad del paciente, y la ruta de administración. La dosis exacta será determinada por el médico, a la luz de los factores relacionados con el sujeto que requiere tratamiento. La dosificación y la administración se ajustan para proporcionar niveles suficientes del radical activo o para mantener el efecto deseado. Los factores, que se pueden tener en cuenta, incluyen la gravedad del estado de enfermedad, la salud general del sujeto, la edad, el peso, y el género del sujeto, la dieta, el tiempo y la frecuencia de administración, la combinación o combinaciones de fármacos, las sensibilidades de reacción, y la tolerancia/respuesta a la terapia. Las composiciones farmacéuticas de acción prolongada se pueden administrar cada 3 a 4 días, cada semana o una vez cada dos semanas dependiendo de la vida media y la tasa de aclaramiento de la formulación particular. Las cantidades de dosificación normales pueden variar de 0,1 a 100.000 microgramos, hasta una dosis total de aproximadamente 1 g, dependiendo de la ruta de administración. La guía para las dosificaciones y métodos de administración particulares se proporciona en la bibliografía y se encuentra disponibles generalmente para los profesionales en la técnica. Los expertos en la técnica emplean diferentes formulaciones para los nucleótidos que para las proteínas o sus inhibidores. Del mismo modo, la administración de polinucleótidos o polipéptidos será específica para células, condiciones, localizaciones, etc., concretas.

Otra discusión del aspecto se refiere a un método de escrutinio para un agente, que modula/afecta, preferiblemente neutraliza la actividad de CD95, que comprende las etapas de

(a) incubar una mezcla que comprende

1. (i) CD95 o un fragmento funcional de la misma
2. (ii) un agente candidato en condiciones en las que CD95 o un fragmento funcional de la misma tiene una actividad de referencia;

(b) detectar la actividad de CD95 o un fragmento funcional de la misma para determinar una actividad en presencia del agente;

(c) determinar una diferencia entre la actividad en presencia del agente y la actividad de referencia.

De acuerdo a una realización preferida de tal análisis, el agente que se va a escrutar altera la interacción entre CD95 y PI3K, preferiblemente entre CD95 y la subunidad p85 de PI3K.

### Breve descripción de los dibujos

#### Figura 1: Sensibilidad a la muerte inducida por CD95 y expresión de CD95.

(a) Las líneas celulares de glioblastoma A172, T98G y LN18 se incubaron con las dosis indicadas de LZ-CD95L (ng/ml), estaurosporina (1  $\mu$ M), o se dejaron sin tratar (Co). Al cabo de 24 h y 48 h la fragmentación del ADN se analizó mediante FACS. (b) Análisis FACS de la expresión de CD95 en superficie en A172, T98G y LN18. (c) Los cultivos de esferoides fueron embebidos en una matriz de colágeno y se trataron con LZ-CD95L (5 ng/ml). La invasión de las células individuales en la matriz se observó con un microscopio de lapso de tiempo a lo largo de 24 h. La distancia de las células invasoras (n = 10 por esferoide; 3 esferoides por tratamiento) hasta la frontera del esferoide se representa en el gráfico de media  $\pm$  ET, \* P < 0,05. (D) Ilustraciones de contraste de fase representativas de esferoides T98G y LN 18 a 0 h y 24 h después del tratamiento. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

#### Figura 2: Las células resistentes a la muerte inducida por CD95 regulan al alza MMP-2 y MMP-9.

(a) Las células T98G y LN18 se trataron con  $\alpha$ -Apo-1 (1  $\mu$ g/ml) durante los tiempos indicados. La expresión de MMP-2 y MMP9 se midió mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Los datos son los resultados de cinco experimentos independientes como media  $\pm$  ET, \* P < 0,05, \*\* P < 0,01.

#### Figura 3: La migración inducida por CD95 está mediada por la activación de ILK/AKT y la inhibición de GSK3 $\beta$

(a) La GSK3 $\beta$  se fosforiló y de ese modo se inhibió en células T98G y LN18 tras el tratamiento con  $\alpha$ -Apo-1 (1  $\mu$ g/ml). (b) Las células T98G se infectaron con un vector lentiviral vacío (Co) o un mutante constitutivamente activo de GSK3 $\beta$  (GSK S9A). Las células T98G infectadas con GSK S9A migraron significativamente menos que sus contrapartes con el vector vacío tras el tratamiento con  $\alpha$ -Apo-1 (2  $\mu$ g/ml) o LZ-CD95L (CD95L, 5 ng/ml) a las 36 h. Un anticuerpo neutralizador para CD95L (Nok1 10  $\mu$ g) bloqueó la migración inducida por CD95L de células infectadas con el vector y con GSK S9A. (c) Las células T98G infectadas con GSK S9A y los respectivos controles fueron estimulados con las dosis indicadas de LZ-CD95L (ng/ml) durante 48 h y la fragmentación del ADN se analizó mediante FACS. (d) Se muestran las curvas de crecimiento de T98G Co y GSK S9A. (e) El inhibidor de ILK (KP-SD1, 10  $\mu$ M) bloqueó la migración inducida por  $\alpha$ -Apo-1 (2  $\mu$ g/ml) y LZ-CD95L (5 ng/ml) de las células T98G. (f) El inhibidor de PI3K (LY 290059, 25  $\mu$ M) bloqueó la activación de AKT y la inhibición de GSK3 $\beta$  inducida por  $\alpha$ -Apo-1 en las células T98G. (g) La  $\beta$ -catenina activa (verde) se

translocó al núcleo después de la estimulación con  $\alpha$ -Apo-1 (1  $\mu$ g/ml), la fosfo-GSK3 $\beta$  (rojo) no cambió después de la estimulación con CD95. Se utilizó DAPI (azul) para visualizar los núcleos de las células T98G. (h) La escisión de la caspasa 8 en T98G, LN18 y Jurkat 16 (J16) se detectó después de la estimulación con CD95 mediante Transferencia Western. (i) El inhibidor de ERK (PD 98059, 25  $\mu$ M) no interfirió en la migración inducida por CD95. Los resultados se expresan como media  $\pm$  ET, \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , y son representativos de dos experimentos independientes. P: fosforilación, T: total.

#### Figura 4: Expresión del sistema CD95/CD95L en glioblastomas primarios

Análisis FACS de la expresión de CD95 en superficie en líneas celulares de astrocitoma, oligodendroglioma y glioblastoma primarios con pocos pases ( $\leq 4$ ). Para la fragmentación de ADN las células se trataron con las dosis indicadas de LZ-CD95L (CD95L) durante 24 h y 48 h y se analizaron mediante FACS.

#### Figura 5: Función del sistema CD95/CD95L en glioblastomas primarios resistentes a la apoptosis

(a) Análisis FACS de la expresión de CD95 en la superficie de líneas celulares de glioblastoma primario NCH (89, 125 y 270) con muchos pases ( $\geq 50$ ). Para la fragmentación de ADN las células se trataron con las dosis indicadas de LZ-CD95L (ng/ml) durante 24 h y 48 h y se analizaron mediante FACS. Los resultados se representan como la media  $\pm$  DT y son representativos de tres experimentos independientes. (b) Las células NCH 89, 125 y 270 mostraron una regulación al alza de los niveles de ARNm de MMP-2 y MMP9 40 h después del tratamiento con  $\alpha$ -Apo-1 (1  $\mu$ g/ml) tal como se detecta mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Los resultados se representan como la media  $\pm$  ET, \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,005$  y son representativos de tres experimentos independientes. (c) Análisis de migración para células NCH 89, 125 y 270 tratadas con  $\alpha$ -Apo-1 (0,1  $\mu$ g/ml + Proteína A). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  ET, \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  y son representativos de dos experimentos independientes.

#### Figura 6: Migración inducida por irradiación y en células T98G y de glioblastoma primario

(a + b) Las células T98G y fueron irradiadas a las dosis indicadas y los niveles de ARNm de CD95 y CD95L (a) y MMP-2 y -9 (b) se determinaron mediante PCR cuantitativa en tiempo real después de 40 h. Los resultados se representan como la media  $\pm$  ET, \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  y son representativos de tres experimentos independientes. (c + d) Inducción de la migración en células T98G (c) y NCH primarias (NCH 125, 270 y 89) (d) después de la irradiación y. Un anticuerpo neutralizador de CD95L (Nok1, 10  $\mu$ g) bloqueó la migración inducida por irradiación y. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  ET, \*  $P < 0,05$  y son representativos de dos experimentos independientes. (e) Puntuación de CD95L de 9 gliomas recurrentes diferentes después de la radioterapia. Se analizaron 3 zonas por tumor y se contaron las células positivas a CD95L y las puntuaciones se asignaron de acuerdo con el número de células positivas. Los tumores recurrentes analizados fueron NCH 907, 202, 910, 860, 655, 408, 30, 388 y 715. (f) Las tinciones se realizaron en secciones consecutivas de tejido de tumores recurrentes para CD95L, CD95 y MMP9, así como la doble tinción para GFAP (verde) y CD95L (rojo).

#### Figura 7: CD95 y CD95L son reguladas al alza en células de glioma murino *in vivo* e inducen migración

(a) Tinción inmunohistoquímica para CD95L de GBM primario. (b-c) La expresión en la superficie de CD95 y CD95L en la línea celular de glioma murino SMA-560 se determinó en condiciones de cultivo de células normales, después de la formación de esferoides o después de la implantación intracraneal. Los cambios de CD95 (b) y CD95L (c) (GeoMean de BD CeliQuest Pro) en las condiciones antes mencionadas se normalizaron a los niveles de expresión en condiciones de cultivo de células. Los resultados representan tres experimentos independientes y se expresan como la media  $\pm$  DT \*,  $P < 0,05$ . (d) Los cultivos de esferoides fueron embebidos en una matriz de colágeno y se trataron con anticuerpos para CD95 (Jo2), un anticuerpo neutralizador para CD95L (MFL3) o el anticuerpo de control de isotipo apropiado a las concentraciones indicadas. La migración de las células se verificó durante 48 h, y se representa la distancia de las células a la frontera del esferoide ( $n = 10$  células, 3 esferoides por tratamiento). (e) Marco experimental. La migración de explantes tumorales en colágeno después del tratamiento con MFL3 o el control de isotipo apropiado se representa como se describió anteriormente ( $n = 10$ , 3 esferoides por tratamiento). (f) El número de células SMA-560 en el hemisferio contralateral de los ratones VM/Dk tratados con MFL3 o con el anticuerpo de control de isotipo se contaron y se normalizaron a la superficie del tumor. Los resultados mostrados son representativos de dos experimentos independientes y se expresan como la media  $\pm$  DE, \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,001$ .

#### Figura 8: La inhibición de GSK3 $\beta$ es independiente de caspasa

(a) La GSK3 $\beta$  es fosforilada y de ese modo inhibida en células T98G y LN18 tras el tratamiento con LZ-CD95L (5 ng/ml). (b) La preincubación con el inhibidor de caspasa zVAD-FMK (40  $\mu$ M) no interfirió en la

inhibición inducida por  $\alpha$ -Apo-1 (2  $\mu$ g/ml) de GSK3 $\beta$ . (c) La reducción de la expresión génica de PED con ARNip bloqueó la activación de ERK, pero no cambió la inhibición inducida por  $\alpha$ -Apo-1 de GSK3 $\beta$ . Los resultados son representativos de dos experimentos independientes.

#### 5 **Figura 9: Expresión y función del sistema CD95/CD95L en glioblastomas primarios**

(a-b) Análisis FACS de la expresión de CD95 en superficie en líneas celulares de glioblastoma primario (NCH 82, 37, 125, 149, 89, 156, 270 y 199) con muchos pases ( $\geq 50$ ). Para la fragmentación de ADN las células se trataron con las dosis indicadas de LZ-CD95L (ng/ml) durante 24 h y 48 h y se analizaron mediante FACS. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  E.T. y son representativos de dos experimentos independientes. (c) Niveles de ARNm de CD95 y CD95L en el tejido tumoral humano, determinados mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes.

#### 15 **Figura 10: Influencia de la irradiación sobre la migración de glioblastoma primario**

Análisis FACS de la expresión de CD95 en superficie en líneas celulares de glioblastoma primario (NCH 342, 354, 357, 378, 417, 419 y 2421). Inducción de la migración en estas células NCH primarias después de la irradiación  $\gamma$ , que podría ser bloqueada por un anticuerpo neutralizador para CD95L (Nok1, 10  $\mu$ g). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  ET, \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,005$  y son representativos de dos experimentos independientes.

#### 20 **Figura 11: CD95 desencadena la invasión de células resistentes a la apoptosis a través de las MMP**

(A) Las líneas celulares de glioblastoma T98G y LN18 se incubaron con las concentraciones indicadas de CD95L-T4, Estaurosporina (St., 1 M) o se dejaron sin tratar (Co). Después de 24 h la fragmentación del ADN se analizó mediante FACS (panel superior). Análisis FACS de la expresión de CD95 en la superficie de T98G y LN18 (panel inferior). (B) Las células T98G y LN18 se trataron con CD95L-T4 o se dejaron sin tratar, para detectar la migración de una sola célula a través de una cámara de Boyden con un tamaño de poro de 8  $\mu$ m. (C) Las células T98G se trataron con CD95L-T4 durante 24 horas o se dejaron sin tratar. Después de eso, se evaluó la actividad de MMP-9 por Zimografía en Gel. (D y E) Las células T98G y LN18 se trataron con  $\alpha$ Apo-1 durante 48 horas o se dejaron sin tratar. La expresión de MMP-2 y MMP-9 se midió mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Los datos son los resultados de cinco experimentos independientes como la media  $\pm$  ET, \*  $P < 0,05$ . (F) Las células T98G fueron transfectadas con una reserva de ARNip frente a MMP-2 y MMP-9 (SHM-MP) o con Lipofectamins solo (Lipo). Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células se trataron con CD95L-T4, 48h después de eso se midió la migración en un análisis de migración bidimensional. (G) Expresión de MMP-2 y MMP-9 tal como se midió mediante RT-PCR cuantitativa. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  ET, \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,001$ ; \*\*\*  $P < 0,0001$  y son representativos de al menos dos experimentos independientes.

#### 40 **Figura 12: CD95 desencadena la invasión de células de glioma primario resistentes a la apoptosis a través de las MMP**

(A) Las líneas de células NCH89, 125 y 270 cultivadas a corto plazo se incubaron con las concentraciones indicadas de CD95L-T4, Estaurosporina (St., 1 M) o se dejaron sin tratar (Co). Después de 24 h la fragmentación del ADN se analizó mediante FACS (paneles superiores). Análisis FACS de la expresión de CD95 en la superficie de NCH89, 125 y 270 (paneles inferiores). (B) Las células NCH fueron tratadas durante 48 h con  $\alpha$ Apo-1 o se dejaron sin tratar, para detectar la migración una sola célula a través de una cámara de Boyden con un tamaño de poro de 8  $\mu$ m. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  ET, \*\* $P < 0,01$  y son representativos de tres experimentos independientes. (C y D) Las Células NCH89, 125 y 270 se trataron con  $\alpha$ -Apo-1 durante 48 h. La expresión de MMP-2 (C) y MMP-9 (D) se midió mediante PCR cuantitativa en tiempo real. (E) Las células NCH125 fueron transfectadas con una reserva ARNip frente a MMP-2 y MMP-9 (SHM-MP) o con Lipofectamina solo (Lipo). Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células se trataron con CD95L-T4, la migración se midió en un análisis de migración bidimensional 48 h más tarde. (F) Expresión de MMP-2 y MMP-9 tal como se mide mediante RT-PCR cuantitativa. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  ET, \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,001$ ; \*\*\*  $P < 0,0001$  y son representativos de al menos dos experimentos independientes.

#### 60 **Figura 13: CD95 induce la migración a través de la ruta PI3K/AKT/GSK3 $\beta$**

(A) La fosforilación de AKT y ERK se muestra en las células T98G y LN18 tras el tratamiento con CD95L-T4 en los momentos indicados. (B) En las células T98G, LN18 y NCH125 y 270, pero no en NCH89, la fosforilación de AKT exhibió una forma de campana dependiente de la concentración después de la estimulación con CD95L-T4, respectivamente. (C) En las células T98G el tratamiento con CD95L-T4 (10 ng/ml) y  $\alpha$ Apo-1 (1  $\mu$ g/ml) indujo la fosforilación de GSK3 $\beta$ . La cinética de la inhibición de GSK3 $\beta$  exhibió una



curva en forma de campana. **(D)** Las células T98G se infectaron con un vector lentiviral vacío (Co) o un mutante de GSK3b constitutivamente activo (GSK S9A). A las 36h células T98G infectadas con GSK S9A migraron significativamente menos que sus contrapartes con vector vacío tras el tratamiento con  $\alpha$ Apo-1 o CD95L. Un anticuerpo neutralizador de CD95L (Nok1) bloqueó la migración inducida por CD95L de células infectadas por vector y S9A-GSK. **(E)** b-Catenina acumulada en el citosol de las células T98G 30 min después del tratamiento con CD95L-T4 (10 ng/ml). **(F)** b-Catenina activa (verde) translocada hacia el núcleo después de la estimulación con  $\alpha$ Apo-1. Se utilizó DAPI (azul) y P-GSK3 $\beta$  (rojo) para visualizar los núcleos y el citosol, respectivamente, en las células T98G. **(G y H)** Veinticuatro horas después de la transfección transitoria de T98G con el informador transcripcional de b-Catenina/TCF (TOP-FLASH; **G**) el plásmido de control (FOP-FLASH; **G**), o el constructo informador de NFkB (NFkB-Luc; **H**) las células se trataron con CD95L-T4 (**G y H**), LiCl (**G**) o se dejaron sin tratar (**G y H**). La actividad luciferasa se analizó durante 12h (**G**) o 8 h (**H**) después de eso y se normalizó a la expresión de la luciferasa de Renilla. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  ET, \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,001$ ; \*\*\*  $P < 0,0001$  y son representativos de dos experimentos independientes. P: fosforilada, T: total.

#### Figura 14: Src y p85 se asocian a CD95 para activar AKT

**(A y B)** Las células LN18 y T98G fueron estimuladas con CD95L-T4 para los momentos y las concentraciones indicados. En los paneles de la izquierda la CD95 se inmunoprecipitó y los inmunoprecipitados se inmunotifieron con anticuerpos anti-p85, anti-CD95, y anti-Src. En los paneles intermedios, p85 se inmunoprecipitó y los productos inmunoprecipitados se sondearon con anticuerpos anti-p85 y anti-CD95. Las cuentas de Proteína A se incluyen como control negativo. Los productos lisados celulares completos (PLCC) se sondearon con anti-p85, anti-CD95 y anti-Src se muestran en los paneles de la derecha. **(C)** Las células T98G fueron tratadas durante los tiempos y las concentraciones indicados con CD95L-T4. La CD95 se inmunoprecipitó y los productos inmunoprecipitados se inmunotransfirieron con anticuerpo anti-Yes. **(D)** Las células T98G y NCH125 fueron transfectadas con ARNip contra Yes o Fyn o con Lipofectamina (Lipo) sola. Setenta y dos horas después de la transfección, las células se trataron con CD95L-T4, 24 horas después de eso, la migración se midió en un análisis de migración bidimensional. **(E)** Se muestra la expresión de ARNm de Yes medida mediante RT-PCR cuantitativa y los niveles de proteína Yes evaluados mediante análisis FACS. **(F)** Las células T98G y NCH125 fueron transfectadas con ARNip contra Yes, un plásmido de expresión en exceso de Yes (pCMV-Yes) o ambos. Setenta y dos horas después de la transfección, las células se trataron con CD95L-T4, 24 horas después de eso, la migración se midió en un análisis de migración bidimensional. **(G)** El ARNip y el inhibidor de PI3K (LY 290059) bloquearon la fosforilación de AKT inducida por CD95. P: fosforilada; T: total, \*: banda específica; ns: banda inespecífica.

#### Figura 15: Formación de DISC ineficiente en células de glioma resistentes a la apoptosis

**(A)** Cuarenta y ocho horas después de la transfección transitoria de T98G y NCH125, con HA-PTEN (PTEN) o con el vector vacío (Simulacro), las células se trataron con CD95L-T4 (500 ng/ml). Para detectar la muerte celular en células que expresan en exceso PTEN, se realizó una tinción FACS intracelular contra la etiqueta HA. Después de eso se llevó a cabo el análisis de dispersión del lado delantero en las células positivas para HA. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  ET y son representativos de dos experimentos independientes. **(B)** Las células T98G se trataron durante 1 h con  $\alpha$ Apo-1, zVAD-fmk, una combinación de zVAD-fmk y  $\alpha$ Apo-1 o se dejaron sin tratar (Co). La fosforilación de GSK3 $\beta$  se analizó mediante Transferencia Western. **(C)** La escisión de la caspasa 8 en T98G, LN18 y Jurkat 16 (J16) se detectó mediante análisis de Transferencia Western a los 5 min de la estimulación con CD95. **(D)** En células T98G y LN18 tratadas con CD95LT4 durante 5 min, se inmunoprecipitaron CD95 (paneles superiores) o caspasa 8 (paneles inferiores). Los productos inmunoprecipitados se inmunotransfirieron con anticuerpo anti-FADD y anti-CD95 (paneles superiores) y con anti-CD95 y anti-caspasa-8 (paneles inferiores). Las células Jurkat se incluyeron como control positivo. **(E)** Las células T98G fueron transfectadas con ARNhs de Yes o con un ARNhs no dirigido como control negativo. Al cabo de 72 h, las células se trataron con CD95L-T4 o se dejaron sin tratar y se llevó a cabo la inmunoprecipitación de CD95, a continuación, los productos inmunoprecipitados se inmunotransfirieron con anticuerpo anti-FADD, la cadena pesada de la IgG sirve como control de carga. A la derecha, se muestra la eficacia de la reducción de la expresión génica evaluada mediante RT-PCR cuantitativa. **(F)** La expresión cuantitativa de FADD, Yes y Fyn en células T98G y LN18 se midió mediante análisis FACS. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  DT, \*  $P < 0,05$  y son representativos de tres experimentos independientes. IMF: intensidad media de fluorescencia P: fosforilada; T: total

#### Figura 16: Modelo esquemático de señalización con CD95 de invasión en el glioblastoma

CD95L induce el reclutamiento del miembro de la familia de Src Yes y la subunidad p85 de PI3K (representada aquí por sus dos subunidades: p85 y p110) por CD95, activando de ese modo AKT. AKT activado fosforila e inactiva GSK3b, permitiendo la translocación de la b-catenina al núcleo, donde induce la transcripción de las MMP. Esta ruta de señalización podría ser bloqueada por ARNip contra Yes, o MMP-2 y -

9, el inhibidor específico de PI3K (Ly290059) o por la infección lentiviral con un mutante activo dominante de GSK3 $\beta$  (S9A).

#### Figura 17: Expresión de CD95L, Yes y Fosfo-Src en muestras clínicas de GBM

(A) Tinción inmunohistoquímica representativa de CD95L (rojo) en GBM humano primario. Obsérvese el aumento de la expresión de CD95L en la interfase tumor/anfitrión (A.b), en comparación a las zonas tumorales más sólidas (A.a\*) o parénquima cerebral (A.c). (B) Tinción inmunohistoquímica de quinasas de la familia Src fosforiladas (p-Src; B.a, c, e, f) y Yes (B.b, d, g, h). B.a-d, Visión de conjunto de la zona de infiltración tumoral, obsérvese la robusta fosforilación de Src y la expresión de Yes en la zona de interacción del tumor/anfitrión (a la izquierda) y las zonas de tumores sólidos reducidas o sin p-Src (a la derecha \*). Se encontró expresión de Yes en la interfase de tumor/anfitrión (B.b, d y g) y en las zonas de tumores sólidos dispersos (B.h). Fuerte fosforilación de Src en células tumorales en las zonas de tumores sólidos (B.f) y la zona de infiltración (B.e).

#### Figura 18: CD95 y CD95L están reguladas al alza en las células de glioma murino *in vivo* e inducen migración

(A y B) La expresión de CD95 y CD95L en la superficie en la línea celular de glioma murino SMA-560 se determinó en condiciones de cultivo celular normales, después de la formación de esferoides o después de la implantación intracraneal. Los cambios se normalizaron a los niveles de las condiciones de cultivo celular. Los resultados representan tres experimentos independientes y se expresan como la media  $\pm$  ET,  $P < 0,05$ . (C) Los cultivos de esferoides fueron embebidos en una matriz de colágeno y se trataron con anticuerpos contra CD95 (Jo2), un anticuerpo neutralizador contra CD95L (MFL3) o el anticuerpo de control de isotipo apropiado a las concentraciones indicadas. La migración de las células se verificó durante 48 h y se representa la distancia de las células a la frontera del esferoide ( $n = 10$  células, esferoides 3 por tratamiento). (D) Esquema experimental. La migración de explantes tumorales en colágeno después del tratamiento con MFL3 o el control de isotipo apropiado se representa como se describió anteriormente ( $n = 10$ , 3 esferoides por tratamiento). (E) Imágenes representativas de tumores SMA tratados con el isotipo o MFL3 inmunotefidos con GFP. Se muestran el hemisferio que porta el tumor (ipsilateral) y contralateral. Se contó el número de células SMA-560 (positivas para GFP) en el hemisferio contralateral de los ratones VM/Dk o bien tratados con MFL3 o bien con el anticuerpo control de isotipo y se normalizó al área del tumor. Los resultados mostrados son representativos de dos experimentos independientes y se expresan como la media  $\pm$  DT, \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,001$ . Barra de escala: 100  $\mu$ m

#### Figura 19: Generación de CD95L-T4

Localización de los aminoácidos N- y C-terminales dentro de TRAIL-RBD, que forman una hebra  $\beta$  antiparalela. (A) Ampliación de la estructura TRAIL-RBD (N-terminal: verde; C-terminal: rojo). (B) Posición de los extremos N y C dentro de la estructura de TRAIL-RBD. Fila superior: vista lateral del eje central de TRAIL-RBD. Fila inferior: vista superior del eje central de TRAIL-RBD. De izquierda a derecha: mono-, di- y trímero. (C) Secuencia de aminoácidos de CD95L-T4. El péptido señal está subrayado (Met1-Gly20). Se proponen los aminoácidos N-terminal (flecha verde) y C-terminal (flecha roja) de CD95L-RBD para formar una hebra  $\beta$  antiparalela. La secuencia del Foldon de T4 se imprime en azul (cursiva). (D) Modelo del complejo TRAIL-T4-DR5. Fila superior: vista lateral de TRAIL-DR5 formando co-complejo con el Foldon de T4 (azul claro) situado por encima de TRAIL-RBD (azul oscuro). Las cadenas de DR5 están coloreadas de rojo oscuro. Los aminoácidos N-terminales de TRAIL-RBD y del Foldon de T4 están coloreados de verde; los aminoácidos C-terminales están coloreados de rojo. Fila superior: vista lateral del eje central del TRAIL-RBD. Fila inferior: vista superior del eje central del TRAIL-RBD. Izquierda: modelo de cinta. Derecha: Modelo de superficie. (E) Purificación por afinidad de CD95L-T4. El sobrenadante que contenía CD95L-T4 de las células HEK293T transfectadas de manera transitoria fue purificado por afinidad usando StrepTactin Sepharose. Las proteínas eluidas específicamente mediante destiobiotina se analizaron posteriormente mediante SDS-PAGE y tinción con plata. La posición de CD95L-T4 se indica mediante una flecha. CD95L-T4 muestra un peso molecular aparente de aproximadamente 30 kDa. La diferencia frente al peso molecular teórico de 23 kDa se debe probablemente a la glicosilación. (F) Análisis de CD95L-T4 purificada mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Para la determinación del peso molecular aparente nativo se separó CD95L-T4 mediante SEC usando una columna Superdex 200. El gráfico muestra el perfil de elución (DO 280 nm) de CD95L-T4 purificado con StrepTactin. Las fracciones B3-C2 recogidas de la SEC (véase B) se analizaron mediante SDS-PAGE y tinción con plata. (G) Determinación del peso molecular aparente. Curva de calibración de la columna Superdex 200 basada en volúmenes de retención de las proteínas indicadas. El peso molecular aparente de CD95L-T4 es 90,3 kDa, lo que indica una proteína trimérica estable. AP-G101 suscita antagonismo de la actividad inductora de la apoptosis de CD95L-T4 en células Jurkat. (H) CD95L-T4 induce la apoptosis en células Jurkat en una manera dependiente de la dosis, como se muestra por un aumento de la actividad caspasa 3/7. La adición de anti-StrepMAB de 10  $\mu$ g/ml, un anticuerpos que entrecruza los trímeros

de CD95L-T4, aumenta el grado de la apoptosis. **(I)** La actividad inductora de la apoptosis de CD95L-T4 de 250 ng/ml en las células Jurkat es antagonizada por APG101 de una manera dependiente de la dosis.

#### Figura 20: Sistema CD95/CD95L y sensibilidad a la apoptosis en glioblastomas primarios

**(A y B)** Análisis FACS de la expresión en superficie de CD95 en líneas celulares de glioblastoma primario (NCH82, 37, 125, 149, 89, 156, 270 y 199) con muchos pases ( $\geq 50$ ). Para la fragmentación de ADN las células se trataron con las dosis indicadas de CD95L (ng/ml) durante 24 horas y 48 horas y se analizaron mediante FACS. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  E.T. y son representativos de dos experimentos independientes. **(C)** Niveles de ARNm de CD95 y CD95L en el tejido tumoral humano, determinados mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes.

#### Figura 21: Moduladores de la activación de PI3K mediada por CD95

**(A)** Las células LN18 se incubaron con las concentraciones indicadas de CD95L-T4 con o sin un anticuerpo neutralizador contra CD95L (Nok1),  $\alpha$ APO-1, Estaurosporina (St., 1 M), o se dejaron sin tratar (Co). Después de 24 h y 48 h se analizó la fragmentación del ADN mediante FACS **(B)** T98G y las líneas de células cultivadas a corto plazo, NCH89 y 125 se incubaron con las concentraciones indicadas de  $\alpha$ Apo-1, Estaurosporina (St., 1 M), o dejaron sin tratar (Co). Al cabo de 24 h y 48 h se analizó fragmentación del ADN mediante FACS. **(C)** Las células NCH125 y NCH270 se trataron durante 48 horas con CD95L-T4 o se dejaron sin tratar, para detectar la migración de una sola célula a través de una cámara de Boyden con un tamaño de poro de 8  $\mu$ m. **(D)** Fosforilación de GSK en células T98G medida mediante tinción FACS intracelular. **(E)** Las células T98G infectadas con GSK S9A y los respectivos controles se estimularon con las dosis indicadas de CD95L (ng/ml) durante 48 h y la fragmentación del ADN se analizó mediante FACS. Se muestran las curvas de crecimiento de T98G Co y GSK S9A. **(F)** Las células T98G y NCH125 fueron transfectadas con ARNip contra Yes o Fyn o con Lipofectamina (Lipo) sola. Se muestra la expresión de Fyn tal como se mide mediante RT-PCR cuantitativa. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  ET, \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,001$ ; \*\*\*  $P < 0,0001$ .

#### Figura 22: Tabla 1

##### Descripción detallada

En general, se aprecia que el complejo CD95/CD95L induce apoptosis<sup>18</sup>. Sin embargo, existe una creciente evidencia de que CD95 puede mediar en procesos independientes de la apoptosis tales como la proliferación, la angiogénesis, la fibrosis y la inflamación<sup>19,20</sup>. El exceso de expresión de CD95 en células de carcinoma de pulmón de Lewis dio como resultado una ventaja de supervivencia de las células tumorales *in vivo*<sup>21</sup>. En la misma línea, se ha informado de que la activación de CD95 conduce la progresión del ciclo celular en las células de glioma<sup>22</sup>. En el astrocitoma maligno, la ligación de CD95 promueve la expresión de quimioquinas proinflamatorias y la angiogénesis<sup>23-25</sup>. En la presente, los autores de la presente invención muestran que la activación de CD95 en glioblastomas inicia una cascada de eventos de señalización que en última instancia conducen a una mayor invasividad. La migración inducida por CD95 se observó por primera vez en células tubulares renales cultivadas<sup>26</sup> y se ha informado recientemente de células tumorales de ovario, mama, pulmón y riñón<sup>13</sup>. En este último estudio, se añadió un gradiente de suero al estímulo de CD95 con el fin de instigar y dirigir la migración celular<sup>13</sup>. Las células de glioblastoma, por el contrario, se caracterizan por su fenotipo propenso a la invasión y migran en ausencia de un estímulo adicional.

De este modo la presente invención se refiere a métodos para bloquear *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* el comportamiento de glioblastoma altamente invasivo mediante la mera neutralización de la actividad de CD95. También se describe cualquier método o mecanismo para neutralizar o bloquear de otra manera la actividad de CD95, por ejemplo mediante el uso de un anticuerpo que se une a la misma o mediante la regulación negativa o la inhibición de la expresión del gen CD95 o la traducción del transcrito de ARNm de CD95.

Para invadir y propagarse en el cerebro circundante normal, las células tumorales necesitan digerir los componentes de la matriz extracelular, incluyendo la fibronectina, la laminina y el colágeno de tipo IV. La familia mejor caracterizada de las enzimas que degradan EMC es la familia de las MMP. Los glioblastomas deficientes en MMP9 son menos invasivos *in vitro* e *in vivo*<sup>27</sup>. Los glioblastomas producen niveles significativamente más altos de MMP9 que los gliomas de bajo grado y el tejido normal del cerebro<sup>27</sup>. Los niveles de MMP9 aumentaron durante el crecimiento de las células de glioblastoma que se habían implantado por vía intracraneal en ratones desnudos<sup>28</sup>. Estas proteasas tienen también un papel en el establecimiento y el mantenimiento de un microambiente que facilita la supervivencia de las células del tumor. En consecuencia, las MMP regulan la angiogénesis tumoral y la inhibición de MMP9 redujo las estructuras similares a capilares en cultivos mixtos de células endoteliales y de glioma<sup>27</sup>. Las mismas características se aplican a la expresión de CD95L: (i) los niveles se correlacionan positivamente con el grado de malignidad<sup>23,29,30</sup>; (ii) los niveles aumentan después de la inoculación intracraneal; (iii) en especímenes humanos de GBM una de sus localizaciones preferentes es en los vasos del tumor.

Aquí, la presente invención demuestra que la activación de CD95 aumenta la expresión del ARNm de MMP9 y MMP2 en líneas celulares de glioblastoma y cultivos primarios establecidos y la reducción de la expresión génica de MMP2 y MMP2 bloquea la migración inducida por CD95.

- 5 La región promotora de MMP9 contiene supuestos sitios de unión para AP-1, NFkB, Sp1 y AP-2<sup>31</sup>. El complejo de transcripción AP-1 juega un papel esencial en la estimulación de la transcripción de MMP9<sup>31,32</sup>. Se ha informado previamente de que la transcripción guiada por AP-1 de MMP9 en células de glioblastoma es aguas abajo de la ruta de PI3K/ILK/GSK<sup>9,10</sup> o en lugar de eso puede requerir la actividad de ERK y JNK<sup>33</sup>.
- 10 c-Jun, un supuesto componente del complejo de transcripción AP-1, se ha identificado como uno de los genes diana TCF/ $\beta$ -catenina más altamente inducidos<sup>36,37</sup>. La inhibición de GSK3 $\beta$ , como se informó aquí, permite que la  $\beta$ -catenina no fosforilada se acumule y trasloque al núcleo, donde funciona como un cofactor para los factores de transcripción de la familia TCF/Lef<sup>35</sup>. Además, se observó concomitantemente actividad de NFkB. Dado que CD95L-T4 disminuye la actividad de ERK, los autores de la presente invención creen que en las células T98G AKT regula la actividad de NFkB través de la fosforilación/activación de la quinasa IKK, que a su vez fosforila I $\kappa$ B y permite la liberación de NFkB activado<sup>66</sup>. Alternativamente, I $\kappa$ B puede transactivar la subunidad p65<sup>64</sup>. En contraste, la inducción de la motilidad e invasividad referida anteriormente para las líneas celulares tumorales de origen endodérmico o mesodérmico implica actividad ERK, NFkB y caspasa 8<sup>13</sup>.
- 20 Por el contrario, el tratamiento de células de glioblastoma con CD95L no desencadenó la activación de ERK ni la escisión de la caspasa 8. La invasión mediada por CD95 de células de glioblastoma no pudo ser bloqueada por un inhibidor de ERK o de caspasa general. En lugar de eso, en estas células de origen neuroectodérmico la invasividad se reguló a través de la ruta PI3K/ILK/GSK, ya que ésta podría ser bloqueada por un inhibidor de PI3K, de ILK y por una forma dominante activa de GSK $\beta$ . También se requiere la actividad de PI3K para la asociación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) que a continuación aumenta la expresión de MMP9 a través de ERK<sup>34</sup>. Por lo tanto, la actividad de PI3K mediada por CD95 facilita un aumento adicional de la actividad de MMP9 por EGFR. Por lo tanto, la activación por CD95 induce la migración/invasión a través de la ruta PI3K/AKT/GSK3 $\beta$ / $\beta$ -catenina/MMP y/o PI3K/AKT/NFkB/MMP.
- 25
- 30 GSK3 $\beta$  se encuentra en un complejo multiproteico con la proteína supresora de tumor de la poliposis adenomatosa de colon (APC), axina y  $\beta$ -catenina. En las células no estimuladas, GSK3 $\beta$  fosforila la  $\beta$ -catenina, marcándola para su ubiquitinación y posterior degradación<sup>35</sup>. La inhibición de GSK3 $\beta$  desestabiliza este complejo de degradación, lo que permite que la  $\beta$ -catenina no fosforilada se acumule y se trasloque al núcleo en el que funciona como cofactor para factores de transcripción de la familia del factor de células T/factor potenciador linfocitario (TCF/LEF)<sup>35</sup>. C-Jun, un supuesto componente del complejo de transcripción AP-1, se ha identificado como uno de los genes diana de TCF/ $\beta$ -catenina más altamente inducido<sup>36,37</sup>.
- 35

Se ha encontrado recientemente que C-Jun fosforilado interactúa con TCF4 y, de este modo, regular la tumorigénesis intestinal mediante la integración de las rutas de JNK y GSK. La hipótesis de los autores de la presente invención es que las altas actividades basales de ERK y JNK, junto con la inhibición de GSK3 $\beta$  determinan la actividad tumorigénica de CD95. A este respecto, los autores de la presente invención encontraron que los altos niveles basales de GSK3 $\beta$  fosforilada se correlacionan positivamente con la capacidad de CD95 para aumentar la migración (datos no mostrados), mientras que los niveles de expresión de CD95 de la superficie no tienen ninguna influencia. En consecuencia, los gliomas malignos presentan mayores reservas libres de  $\beta$ -catenina no fosforilada que los menos malignos (datos propios no publicados).

40

45

En el pasado, varios informes han indicado un papel importante para la fosforilación de la tirosina en la señalización inducida por CD95<sup>56,59</sup>. Estos informes preliminares, sin embargo, sugirieron que la fosforilación de la tirosina inducida por CD95 es un requisito previo para la apoptosis mediada por CD95<sup>56,60,69</sup>. En esta línea, se encontró que las fosfatasa SHP-1, SHP-2 y SHIP se asociaban con CD95 para contrarrestar las rutas iniciadas por factores de supervivencia<sup>54</sup>. Sólo recientemente, se encontró que la fosforilación de tirosina inducida por Src de caspasa 8 deteriora la apoptosis inducida por CD95<sup>53</sup>. Los autores de la presente invención describen ahora una nueva asociación del miembro de la familia Src Yes y p85 con CD95. TRANCE, otro miembro de la familia de TNF, activa PI3K a través de un complejo de señalización que implica c-Src y TRAF6<sup>71</sup>. La inhibición de Fyn, otro miembro de la familia Src, disminuyó la migración inducida por CD95 de las células de glioblastoma, aunque no significativamente. Esto puede explicarse por el hecho de que Fyn participa en la señalización mediada por EGFR en células neuronales y EGFR es un receptor muy importante para la invasión del glioma que se ha encontrado en asociación con CD95. Así, la inhibición de la señalización mediada por CD95 podría afectar a la señalización mediada por EGFR y *viceversa*. El que otra molécula adaptadora esté todavía desaparecida en el complejo de la activación de PI3K por las CD95 (PAC) sigue siendo objeto de estudios futuros. Alternativamente, Yes y p85 podrían interactuar directamente con CD95 a través del motivo que contiene fosfotirosina identificado previamente en el DD de CD95<sup>54</sup>. Por lo tanto, en las células T98G, la reducción de la expresión génica de Yes permitió el reclutamiento inducido por CD95L-T4 de FADD por CD95 lo que indica que Yes y FADD podrían competir por la unión a CD95. A lo largo de esta línea, el análisis de los niveles de expresión de Yes reveló una expresión mucho más alta en T98G que en las

50

55

60

células LN18. Lo más importante, la expresión de Yes y la fosforilación de las quinasas de la familia Src se encontró constantemente en el sitio de interacción tumor/anfitrión en muestras clínicas de GBM, lo que indica su participación en la invasión tumoral.

5 Barnhart et al. (2004)<sup>13</sup> mostraron anteriormente que CD95L exógeno induce la migración de las células tumorales de origen endodérmico *in vitro*. En estas células, CD95L induce la migración a través de la caspasa 8 y ERK <sup>13</sup>. Estos autores conjeturan que CD95L podría estar involucrado en el escape del tumor a la quimio- y la radio-terapia, ya que ambos tratamientos aumentan la expresión de CD95L. En el estudio de los autores de la presente invención estos encontraron que CD95L induce también la migración de las células de GBM. Más allá de esto, el presente estudio representa un avance conceptual significativo en el campo de la biología tumoral, ya que demuestra por primera vez que: (i) la sola interacción de las células tumorales con el parénquima circundante induce la expresión de CD95L en las células del tumor y anfitrionas; (ii) en las células de GBM CD95L señala la invasión a través de Yes/PI3K/MMP y no a través de caspasa 8/ERK como es el caso en las células tumorales de origen endodérmico, (iii) la neutralización de CD95 bloquea la actividad de la migración basal de las células GBM *in vivo* en un modelo singénico de ratón de GBM que imita la situación clínica. Además, este estudio muestra que la estequiometría molecular de los componentes de señalización de PI3K parece determinar la respuesta celular a CD95.

En resumen, los presentes datos indican que los tumores de Grado IV de la OMS son resistentes a la apoptosis inducida por CD95 pero aumentaron su capacidad de invasión tras la estimulación por CD95.

20 A pesar de la resistencia clínica conocida a la irradiación de GBM, la terapia actual para GBM abarca la cirugía seguida de irradiación y quimioterapia coadyuvante. El régimen de irradiación convencional utiliza una dosis óptima de 60 Gy por lo general dadas en fracciones diarias de 1,8 a 2 Gy durante aproximadamente 6 semanas con radioterapia concomitante focalmente dirigida. La zona diana es la zona potenciada observada típicamente en la MRI con un margen adicional de 2 a 3 cm <sup>38</sup>. Este régimen se ha desarrollado basándose en el conocimiento de que el principal fracaso del tratamiento en los gliomas malignos es la recurrencia del tumor dentro de los 2 cm del sitio del tumor original, que ocurre en aproximadamente 80% a 90% de los casos <sup>38</sup>. La radiación induce daño por interacción directa con la diana celular o indirectamente a través de la interacción con otros átomos o moléculas (p. ej., agua) dentro de la célula para producir radicales libres que afectan secundariamente estructuras críticas. Además, se ha demostrado que la irradiación aumenta la expresión de los receptores de muerte y de los ligandos de muerte, que en algunos casos destruyen la célula a través de la apoptosis <sup>3</sup>. La presente invención confirma que la irradiación de células de glioblastoma aumenta en gran medida los niveles de CD95 y CD95L. Sin embargo, las células siguen siendo resistentes al daño inducido por la radiación. En lugar de eso, los autores de la presente invención muestran que las células irradiadas presentan un potencial de migración dependiente de CD95L superior. Incluso las células que no migran cada vez más después de la única estimulación de CD95 lo hicieron después de la irradiación. Por lo tanto, un aumento adicional mediado por irradiación de los niveles de CD95 o posibles cambios en la actividad general de la quinasa podría volver las células sensibles a la migración inducida por CD95. En esta línea, la irradiación X terapéutica es el único factor ambiental inequívocamente vinculado a un mayor riesgo de tumores cerebrales, incluyendo el glioma, a menudo en el plazo de diez años después de la terapia <sup>39</sup>. Lo más importante, en contraste con los tumores originales donde CD95 y CD95L se expresan apenas dentro del tumor, en los GBM recurrentes la expresión de CD95 y CD95L aumentó espectacularmente. En línea con los datos *in vitro*, los autores de la presente invención no detectaron células apoptóticas cerca de las células positivas a CD95L, pero en lugar de eso detectaron un aumento de la expresión de MMP9.

45 Las estrategias experimentales actuales para bloquear la invasión del glioblastoma se centran en la inhibición de la actividad de MMP mediante la expresión de los inhibidores naturales TIMP2 y TIMP4 o confían en el redireccionamiento génico directo del ARNm de MMP mediante estrategias antisentido. Sin embargo, mientras que TIMP2 disminuye la angiogénesis y la invasión también protege a las células tumorales de la apoptosis <sup>40</sup>. Otras estrategias para inhibir la producción de MMP emplean el redireccionamiento de las rutas de transducción de señales que conducen a su expresión que participa de manera similar no sólo en la inducción de la invasión tumoral, sino también en algunas de las funciones neurales básicas haciendo por lo tanto estas estrategias menos atractivas para la aplicación clínica.

55 Por el contrario, si bien se requiere la actividad de CD95 para la remodelación de las neuritas durante el desarrollo embrionario del cerebro <sup>41</sup> y para el aclaramiento de las células cerebrales dañadas en el cerebro enfermo <sup>42-45</sup> no es detectable actividad de CD95 en el cerebro adulto sano. De este modo, el redireccionamiento de CD95 debe tener menos efectos secundarios que otros factores que inducen la migración que están normalmente implicados en la función normal del cerebro.

60 Por lo tanto, CD95 aparece como una diana muy potente y atractiva para el tratamiento de primera línea del glioblastoma humano.

**EJEMPLOS****Ejemplo 1 - Reactivos y procedimientos generales**

5 Se utilizaron los anticuerpos siguientes: G247-4 anti-CD95L humana (1:200), el anticuerpo neutralizador para CD95L (Nok1), el anti-CD95 murino (Jo2), el anti-CD95L murino (MFL3) y el control de isotipo apropiado, una IgG1 de hámster,  $\lambda$ 1, se adquirieron de Becton Dickinson. Los anticuerpos contra CD95 ( $\alpha$ -Apo-1) se generaron como se ha descrito anteriormente <sup>46</sup>, GSK3 $\beta$  fosforilada (P-Ser9-GSK3 $\beta$ , 1:1000), AKT fosforilada (P-Ser473-KT, 1:1000), AKT total (T-AKT, 1:1000), quinasas de la familia Src (Src, 1:1000), Src fosforilada (P-Tyr416 1:50) y  $\beta$ -catenina total (1:1000) se adquirieron de New England Biolabs. Los anticuerpos contra CD95 (CD95, 1:1000), GSK3 $\beta$  total (T-GSK3 $\beta$ , 1:1000), ERK1/2 fosforiladas (P-ERK, 1:1000), Yes total (Yes, 1:1000 y 1:200), Fyn total (1:200) y ERK total (T-ERK, 1:1000) se adquirieron de Santa Cruz. El anti-GFAP (1:200) fue adquirido de Chemicon, anti-PI3K (dominio N-SH2 de p85, 1:1000), anti-FADD (FADD, 1:1000) y la  $\beta$ -catenina activa (p-Ser37 o P-Thr41; 1:800) se adquirieron de Upstate, GE-213 anti-MMP9 (1:100) se adquirió de Oncogene, anti-GFP (1:400) se adquirió de Molecular Probes, anti-GADPH se adquirió de Abcam y el anticuerpo anti-caspasa 8 (1:10) se generó en el laboratorio de los autores de la presente invención a partir de sobrenadante de hibridoma <sup>47</sup>. El anticuerpo anti-PED (1:2000) fue proporcionado amablemente por el Dr. Herve Chneiweiss. Para la visualización de anticuerpos específicos en tinciones histológicas se utilizaron estreptavidina-Fosfatasa alcalina/Fastred ambos adquiridos de Dako. Para los estudios de inmunofluorescencia se utilizaron los anticuerpos monoclonales Alexa Fluor 488 (1:500; Molecular Probes), y anti-rodamina (Dianova 1:200).

El inhibidor de MAPK, PD98059 (25 mM), el inhibidor de PI3K Ly 290059 (25 mM) y el inhibidor de pancaspasa zVAD-FMK (40 mM) se adquirieron de Calbio-Chem. El inhibidor de ILK (20 M) fue proporcionado amablemente por S. Dedhar. Las células se incubaron previamente con inhibidores durante 30 minutos (LY 290059 y zVAD-FMK) antes del tratamiento, ya sea con CD95L-T4 o con  $\alpha$ Apo-1. La generación de cremallera de Leucina de CD95L (LZ-CD95L) se realizó como se ha descrito previamente <sup>41</sup>. Los agentes bloqueadores (zVAD-FMK, PD98059, LY 290059 y KP-SD1) se proporcionaron 30 minutos antes del tratamiento con LZ-CD95L o  $\alpha$ Apo-1. Las células se lisaron para su posterior análisis bioquímico. La extracción de proteínas y la inmunotransferencia se realizaron tal como se ha descrito previamente <sup>41</sup>.

**Ejemplo 2 - Muestras primarias**

Los especímenes de tejido de tumores NCH se obtuvieron durante la operación tras el consentimiento informado de los pacientes y la aprobación del comité de ética local. El tejido fresco se dividió en dos partes, una parte para establecer los cultivos tumor primario y la otra para la extracción de RNA. Los datos clínicos de los pacientes respectivos relativos a la clasificación del tumor, la edad en la cirugía y el sexo se resumen en la Tabla I (Fig. 22).

**Ejemplo 3 - Experimentos con animales**

40 Los experimentos con animales fueron aprobados por el comité institucional de cuidado y uso de animales del Centro Alemán de Investigación del Cáncer y el Regierungspräsidium Karlsruhe. Para las inyecciones intracraneales, se utilizaron ratones VM/Dk endogámicos de 8 - 12 semanas de edad. Se recogieron 5.000 células SMA-560 mediante tratamiento con tripsina, se resuspendieron en 1  $\mu$ l de medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM con un suplemento de suero bovino fetal al 10% (FCS), Penicilina/Estreptomina al 1% (PS) y L- glutamina al 1% 200 mM) y se cargaron en una jeringa de 10  $\mu$ l Flexifil (WPI, Berlín, Alemania). Se perforó un orificio de trepanación 2,75 mm lateral al bregma y la aguja se introdujo a una profundidad de 3 mm. Los ratones se sacrificaron 7, 14 ó 18 días después de las inyecciones.

**Ejemplo 4 - Explantes tumorales**

50 Catorce días después de la inoculación del tumor, los ratones se sacrificaron y los tumores se extrajeron. Los explantes tumorales se incubaron a continuación durante 1 hora, en cualquier medio, medio más anticuerpo control de isotipo (10  $\mu$ g/ml) o medio con MFL3 (10  $\mu$ g/ml). Después de la integración de los explantes en el colágeno, la invasión de células se registró durante 72 horas con un microscopio de lapso de tiempo (Olympus, Alemania).

**Ejemplo 5 - Células y cultivos de esferoides**

60 Las líneas celulares de glioblastoma establecidas A172, T98G y LN18 y las células de glioblastoma primario (NCH) se cultivaron en DMEM (con un suplemento de FCS al 10% y PS al 1%) en una incubadora con CO<sub>2</sub> a 36,5°C y una humedad de 90%. Las líneas celulares NCH se han establecido en el laboratorio de C. Herold-Mende como se ha descrito <sup>48</sup>. Para los análisis bioquímicos y moleculares se cultivaron en placa 1x10<sup>6</sup> células en placas de cultivo de 10 cm en medio y se incubaron como se ha descrito antes. Los esferoides se produjeron como se ha descrito previamente <sup>49</sup>. En resumen, se cultivaron en placa células T98G y LN18 (2-3 x 10<sup>4</sup>) en gotas suspendidas (20  $\mu$ l) en las tapas de placas de cultivo de 10 cm que contenían 10 ml de DMEM. Después de 48 h los agregados celulares se

cosecharon y se transfirieron a un plato de agar al 2% con la base recubierta cargado con el medio. Al cabo de 48 h adicionales los esferoides fueron incorporados en un gel de colágeno en tres dimensiones para el análisis de la invasión.

#### 5 **Ejemplo 6 - Análisis de invasión en colágeno**

Un modelo fisiológico para la investigación de la invasión es el análisis en gel de colágeno en tres dimensiones. Los esferoides se trataron 1 h antes de ser incorporados a una disolución de gel de colágeno (Disolución de partida de 3 mg/ml de Vitrogen; concentración final 2,4 mg/ml) con  $\alpha$ Apo-1 (2  $\mu$ g/ml), LZ-CD95L (5 ng/ml) o Nok1 (50 ng)/LZ-CD95L (5 ng/ml). Después de la polimerización del gel de colágeno (3060 min a 37°C) se colocó DMEM en la parte superior de los geles. La invasión de las células en la matriz de colágeno se documentó con un microscopio de lapso de tiempo (Olympus, Alemania). La distancia de las células invasoras individuales a la frontera del esferoide (n = 10 por esferoide; 3 esferoides por tratamiento) se determinó con el programa Image J 1.34 (basado en NIH Image).

#### 15 **Ejemplo 7 - Homogeneización de tejido**

Para el análisis FACS, los tumores se retiraron en los momentos indicados, se trataron con tripsina durante 20 min a 37°C, se lavaron tres veces en PBS/FCS al 10%, se trituraron con pipetas Pasteur de vidrio, se filtraron a través de una malla de nailon de 100  $\mu$ m (BD Falcon) y se resuspendieron en PBS/FCS al 10% para el análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS, Becton Dickinson).

#### **Ejemplo 8 - Análisis de migración**

La migración de las células de glioma *in vitro* se midió mediante la migración a través de insertos Transwell (Falcon) revestidos con Colágeno I (Chemicon). Se cultivaron en placa 5 x 10<sup>4</sup> células en 200  $\mu$ l de medio en insertos Transwell recubiertos con colágeno (50  $\mu$ g/ml) con un tamaño de poro de 8  $\mu$ m. Las células fueron sometidas a irradiación y antes del cultivo en placa, o se trataron después de la siembra con  $\alpha$ -Apo1 (2  $\mu$ g/ml o 0,1  $\mu$ g/ml + Proteína A para el entrecruzamiento), LZ-CD95L (5 ng/ml), Nok1 (50 ng)/LZ-CD95L (5 ng/ml), Nok1 (50 ng) sobrenadante de LZ (SN, 5 ng/ml), CD95L (10 ng/ml) y CD95L-T34. Preferiblemente 24 horas después del cultivo en placa se privó de alimento a las células en DMEM basal durante 24 horas adicionales antes de ser tratadas. El número de células completamente migradas se contó a las 12 h, 24 h y 36 h del tratamiento. En cada experimento los resultados por triplicado se contaron para cada tratamiento.

#### 35 **Ejemplo 9 - Calificación y análisis del tumor**

Se realizó la calificación de CD95L en los gliomas originales y recurrentes mediante análisis de tres zonas (ampliación de 250 veces) de cada tumor con CD95L teñido. Las células positivas se contaron en una manera doble ciego y se asignaron puntuaciones de acuerdo con el número de células positivas.

40 Para el análisis de la migración inducida por CD95 *in vivo*, se inyectó una suspensión de 5.000 células SMA-560 y 3  $\mu$ g de MFL3 o el anticuerpo de isotipo apropiado en el cuerpo estriado izquierdo de ratones Vm/Dk. Después de una semana, los ratones se sacrificaron y los cerebros se extrajeron. Tras la tinción inmunohistoquímica, se contaron las células positivas para GFP en el hemisferio contralateral de tres zonas representativas por muestra y se normalizaron a la superficie del tumor según se evaluó mediante el programa Cell<sup>^</sup>R (Olympus, Alemania).

#### 45 **Ejemplo 11 - Irradiación y**

Se sembraron en placas 2,5 x 10<sup>5</sup> células en placas de cultivo de 6 cm 12 h antes de la irradiación. Las células se irradiaron con 1, 3, 10 y 50 Gy a temperatura ambiente usando una fuente de Cs<sup>137</sup> (Gamma Móvil 1000, Atomic Energy of Canada, Ltd., ON) a 10,23 Gy/min. Las células se trataron con Nok1 (10  $\mu$ g/ml) o se dejaron sin tratar directamente después de la irradiación. Después de eso las células se utilizaron para los análisis de migración, la extracción de ARN o el análisis de Nicoletti.

#### 55 **Ejemplo 12 - Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los datos de migración y expresión del ARNm se realizó utilizando la prueba *t* de Student no paramétrica para comparar las diferencias entre los grupos de tratamiento y los controles. Los intervalos de confianza se determinaron a 95%, y los valores de \* *P* <0,05, \*\* el valor de *P* <0,01. \*\*\* el valor de *P* <0,005 fueron considerados estadísticamente significativos.

#### 60 **Ejemplo 13 - Inmunoprecipitación**

Se trataron 2 X 10<sup>7</sup> células con CD95L-T4 de 10, 500 y 5  $\mu$ g/ml durante 1 y 5 minutos (a menos que se indique lo contrario) a 37°C o se dejaron sin tratar, se lavaron dos veces en PBS más inhibidores de fosfatasa (NaF, NaN3,

pNPP, NaPPi,  $\beta$ -Glicerofosfato, 10 mM cada uno y ortovanadato 2 mM), y posteriormente se lisaron en tampón A (Tris/HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM, cóctel inhibidor de proteasa [Roche], Triton X-100 al 1% [Serva, Heidelberg, Alemania], glicerol al 10%, e inhibidores de fosfatasa [NaF, Na<sub>3</sub>N, pNPP, NaPPi,  $\beta$ -Glicerofosfato, 10 mM cada uno y ortovanadato 2 mM]) (condiciones estimuladas) o se lisaron sin tratamiento (condiciones no estimuladas). La concentración de proteína se determinó utilizando el kit BCA (Pierce). Se inmunoprecipitó 1 mg de proteína durante la noche con cualquiera de anti-caspasa 8 como se ha descrito anteriormente<sup>58</sup>, 5  $\mu$ g de  $\alpha$ Apo-1 o 2,5  $\mu$ g de anti-p85 y 30  $\mu$ l de proteína A-Sefarosa. Las cuentas se lavaron 5 veces con 20 volúmenes de tampón de lisis. Los productos inmunoprecipitados se analizaron en SDS-PAGE al 15% o al 7,5%. Posteriormente, los geles se transfirieron a membrana de nitrocelulosa Hybond (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Alemania), se bloquearon con BSA al 2% en PBS/Tween (PBS más Tween 20 al 0,05%) durante 1 hora, y se incubaron con anticuerpos primarios en BSA al 2% con PBS/Tween a 4°C durante la noche. Las transferencias se revelaron con un método de quimioluminiscencia siguiendo el protocolo del fabricante (Perkin Elmer Life Sciences, Rodgan, Alemania).

#### 15 **Ejemplo 14 - Análisis celular por citometría de flujo**

##### **Tinción extracelular:**

Se analizó la expresión de CD95 en la superficie de células individuales por medio de FACS. Se incubaron  $1 \times 10^6$  células/ml en solución salina tamponada con fosfato que contenía suero de ternera fetal al (PBS FCS al 10%) con AaPO-1 (0,01 g/l) durante 20 minutos en hielo, seguido por el anticuerpo secundario (anti-ratón de cabra conjugado con ficoeritrina 1:30; Dianova) durante 30 minutos. El análisis de citometría de flujo se realizó en un FACSCalibur (Becton Dickinson) utilizando el soporte lógico Cell Quest. Se analizaron un mínimo de 10.000 células por muestra.

##### 25 **Tinción intracelular FACS:**

Para medir o bien la eficacia de la expresión en exceso de PTEN, la eficacia de la reducción de la expresión génica de Yes o los niveles basales de FADD, Fyn y Yes, se realizaron coloraciones FACS intracelulares. Las células se trataron con tripsina, el sobrenadante se desechó y el sedimento se volvió a suspender en paraformaldehído al 4% en tampón PB durante 15 minutos en hielo. Después de la incubación, las células fijadas se centrifugaron (3.000 rpm, 4°C, 5 minutos) el sobrenadante se descartó y el sedimento se lavó dos veces con PBS/Saponina al 0,1% y FCS al 10%. Las muestras se incubaron en hielo durante 30 minutos con el primer anticuerpo ( $\alpha$ -HA 1:1000 Roche,  $\alpha$ -Yes 1:200 o  $\alpha$ -Fyn 1:200 Santa Cruz), seguido por dos etapas de lavado con PBS/saponina al 0,1% y FCS al 10% antes de la adición del anticuerpo secundario ( $\alpha$ -ratón-PE 1:33 Phamningen o  $\alpha$ -conejo-Alexa488<sup>®</sup> 1:250 Molecular Probes) durante 20 minutos más. Las células teñidas se lavaron dos veces con PBS/saponina al 0,1% y FCS al 10% y el sedimento se resuspendió en el mismo tampón. Después las células se analizaron por FACS. Los valores se dieron como la intensidad media de fluorescencia normalizada (IMF) para el antígeno específico.

#### 40 **Ejemplo 15 - Detección de la apoptosis (ensayo de Nicoletti)**

Para cuantificar la fragmentación del ADN, se centrifugaron las células desprendidas con tripsina/EDTA (Gibco) a 200 x g y se fijaron con etanol del 70% a -20°C durante 1 h. Las células fijadas se tiñeron con solución de yoduro de propidio (50 g/ml; citrato de sodio al 0,0025% y Triton-X-100 al 0,0025%) durante 1 hora o durante la noche a 4°C y se analizaron por medio de FACS.

#### 45 **Ejemplo 16 - Zimografía de gelatina para MMP-2 y -9**

Se cargó el medio acondicionado de las células T98G no tratadas o tratadas (10 ng/ml y 20 ng/ml de CD95L-T4) en condiciones no reductoras sobre un gel de SDS-poliacrilamida al 10% que contenía 1 mg/ml de gelatina. Después de la electroforesis y el lavado del gel con Triton X-100 (2,5% v/v, dos veces durante 30 minutos), el gel se incubó en tampón de reacción de MMP [Tris-HCl de 50 mmol/L (pH 7,8), NaCl de 200 mmol/L, CaCl<sub>2</sub> de 5 mmol/L] a 37°C durante 16 h. Se detectó la actividad gelatinolítica en forma de bandas transparentes en la tinción con disolución de Azul Brillante de Coomassie G-250 e incubación en disolución de decoloración (ácido acético al 10%, metanol al 20%).

#### 55 **Ejemplo 17 - Inmunohistoquímica**

Se fijaron células T98G con PFA al 4% a 37°C durante 15 minutos, se incubaron con cloruro de amonio 50 mM y se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1% en PBS durante 5 minutos. Después del bloqueo, las células se incubaron con los respectivos anticuerpos primarios, y se visualizaron las inmunorreactividades con un anticuerpo monoclonal o policlonal acoplado a rodamina o isotiocianato de fluoresceína (FITC).

Se fijaron las muestras clínicas de GBM OMS IV con PFA al 4% PFA y se embebieron en parafina. Se sometieron a inmunotinción secciones consecutivas de 5  $\mu$ m de espesor con anticuerpos de ratón contra CD95L, Yes y fosfo-Src



(Tyr416). Para la validación de los anticuerpos anti-CD95L y anti-CD95, se utilizaron amígdalas humanas. Después de la incubación con anticuerpos secundarios acoplados con biotina seguido de incubación con estreptavidina-fosfatasa alcalina (Dako) se revelaron las secciones con Fastred (Dako) y se embebieron en Glycergel (Dako).

- 5 Los tumores murinos se fijaron con PFA al 4%. Después de inclusión en parafina, se sometieron a inmunotinción cortes consecutivos de 5 µm de espesor con anti-GFP de conejo.

#### Ejemplo 18 - infección con Lentivirus

- 10 Se infectaron células T98G y LN18 con el vector lentiviral pEIGW y pEIGW-GSK3βS9A a una multiplicidad de infección (MOI) de 5. Los plásmidos se construyeron mediante la sustitución de la secuencia de EGFP entre el promotor EF1a y el elemento WPRE en pWPTSeGFP (amablemente proporcionado por D. Trono, Ginebra) con la casete IRES-EGFP a partir de pIRES2-EGFP (Clontech, Alemania). El vector lentiviral recombinante pEIGW-GSK3βS9A se construyó utilizando pcDNA3 HA-GSK3βS9A (amablemente proporcionado por Trevor C. Dale). Este vector codifica un mutante GSK3b constitutivamente activo que contiene una sustitución de serina por alanina en el residuo 9 (GSK3βS9A). Todos los lentivirus se propagaron utilizando los métodos descritos previamente<sup>41</sup>. La expresión de todos los transgenes se confirmó en las células infectadas por medio de análisis FACS de la expresión de GFP. El porcentaje de células infectadas fue de 80-90%.

#### 20 Ejemplo 19 - PCR en tiempo real

- Se extrajo el ARN de las células tratadas ya sea con αApo-1 (1 µg/ml) o sin tratar con el RNeasy Mini Kit de Qiagen a las 48 horas a menos que se indique lo contrario. Después de la transcripción inversa, se detectó ARNm diana por medio de PCR Taqman en tiempo real con los siguientes cebadores específicos del gen: CD95-directo 5'- ACT GTG ACC CTT GCA CCA AAT-3'; CD95-inv. 5'- GCC ACC CCA AGT TAG ATC TGG-3'; CD95-sonda 5'-AAT CAT CAA GGA ATG CAC ACT CAC CAG CA-3'; CD95L-directo 5'- AAA GTG GCC CAT TTA ACA GGC-3'; CD95L-inv. 5'-AAA GCA GGA CAA TTC CAT AGG TG-3'; CD95L-sonda 5'- TCC AAC TCA AGG TCC ATG CCT CTG G-3'; MMP-9-directo 5'- GAT CCA AAA CTA CTC GGA AGA CTT G-3'; MMP-9-inv. 5'- GAA GGC GCG GGC AAA-3'; MMP-9-sonda 5'- CGC GGG CGG TGA TTG ACG AC-3'; MMP-2-directo 5'- GGA CAC ACT AAA GAA GAT GCA GAA GT-3'; MMP-2-inv. 5'- CGC ATG GTC TCG ATG GTA TTC-3'; MMP-2-sonda 5'- AGT GCC CCA GCA AGG TGA TCT TGA CC-3'; b-Actina-directo 5'- ACC CAC ACT GTG CCC ATC TAC GA-3'; b-Actina-inv. 5'- CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG G-3'; b-Actina sonda 5'- ATG CCC TCC CCC ATG CCA TCC TGC GT-3'. Para probar la reducción de la expresión génica de Yes, se detectó el ARNm diana mediante PCR en tiempo real SybrGreen con el uso de los siguientes cebadores de la familia de quinasas Src: Yes-directo 5'- TAT GGC TGC CAG ATT GCT G-3'; Yes inv. 5'- ZCC AGG AGC TGT CCA TTT GA-3'; Fyn-directo 5'- TGA ACA GCT CGG AAG GAG AT-3'; Fyn-inv. 5'- GGT TTV ACT CTC CGC GAT AA - 3'; como gen doméstico se utilizó Gapdh con las siguientes secuencias: Gapdh-directo 5'- GGT CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG-3'; Gapdh-inv. 5'- CCT CCG ACG CCT GCT TCA CCA C-3'. La PCR en tiempo real se midió en un ABI PRISM-7300i (Applied Biosystems, EE.UU.).

#### 40 Ejemplo 20 – Expresión en exceso de PTEN

- Los plásmidos para la expresión en exceso de PTEN (pBP-PTEN-HA) y el vector vacío (pBP) fueron amablemente proporcionados por Frank Fumari (San Diego, USA)<sup>59</sup>. Las células T98G fueron transfectadas con pBP-PTEN-HA y pBP (6 µg) utilizando JetPei. Las células transfectadas se cultivaron durante 48 - 72 horas más antes del tratamiento.

#### Ejemplo 21 – Experimentos de Reducción de la Expresión Génica

- Se llevaron a cabo experimentos de reducción de la expresión génica mediante transfección transitoria con Lipofectamine 2000™ (Invitrogen Life Technologies) siguiendo el manual de instrucciones. Los experimentos de migración se realizaron usando o bien ARNip contra Yes (Qiagen S100302218), y un segundo ARNip, dirigido a un miembro diferente de las quinasas de la familia Src, Fyn (Qiagen S100605451), que se utilizó como un control negativo o reservas de vectores shRNAmir-pGIPZ validados para Yes, MMP-2 y MMP-9 y un vector shRNAmir-pGIZ no dirigido como control negativo (RHS 4430-98843955, -98820654, -99161516, -98514235, -98709361, -99137419, -99291751, -99298712, -99138418 y RHS4346-OB, respectivamente, Open Biosystems, USA). Después de la transfección transitoria con los diferentes ARNip, las células se cultivaron durante 72 h antes de ser tratadas con CD95LT4 (10 ng/ml y 20 ng/ml), se analizó la migración 24 horas después del tratamiento con un análisis de migración de dos dimensiones. La reducción de la expresión génica fue controlada por medio de PCR cuantitativa en tiempo real y FACS. Para excluir los efectos fuera de la diana del ARNip de Yes, se transfectaron las células con ARNip contra Yes, un plásmido de expresión en exceso de Yes (p-CMV-Yes) o ambos y se cultivaron durante 48 h antes de ser transferidas a una placa de migración. Después de 48h más, las células se trataron con CD95L-T4 (10 ng/ml y 20 ng/ml). La migración se midió 24 horas después del tratamiento en un análisis de migración en dos dimensiones.

Para los estudios de inmunoprecipitación, se cultivaron las células transfectadas durante 72 h antes del tratamiento.

### Ejemplo 22 – Análisis con gen informador de luciferasa

5 Los vectores informadores de luciferasa fueron proporcionados amablemente de las siguientes fuentes: pTOPFLASH y pFOPFLASH (Randall T. Moon, Howard Hughes Medical Institute of Washington, USA) y el plásmido NFκB con seis sitios de unión (Min Li-Weber, German Cancer Research Center de Heidelberg, Alemania). Los experimentos de transfección se llevaron a cabo usando reactivo Lipofectamine 2000™ (Invitrogen Life Technologies), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de  $5 \times 10^4$  células por pocillo 24 horas antes de la transfección. Los constructos de Luciferasa de Luciérnaga se cotransfectaron con un plásmido de CMV-Luciferasa de Renilla (10 ng) para normalizar los valores de luciferasa. La actividad de luciferasa se midió 24 horas después de la transfección en función del constructo mediante el uso de kits disponibles comercialmente de Promega (Madison, WI, USA). La luminiscencia se cuantificó usando un luminómetro de microplacas de 96 pocillos Ascient. Todas las transfecciones se llevaron a cabo por cuadruplicado en al menos dos ocasiones independientes, y las barras de error se representan como ETM.

### Ejemplo 23 - Generación de CD95L-T4

#### Ingeniería genética del Ligando de CD95-T4 (CD95L-T4) humano

20 Se utilizaron el complejo TRAIL/DR5, así como la estructura de TNF-α como modelos para el desarrollo de estrategias de expresión para el dominio de unión del receptor de CD95L humano (CD95L-RBD). Siempre que la estructura trimérica del RBD de CD95L humano sea, en principio, similar a la de las estructuras de RBD de TNF-α o TRAIL (entradas PDB: 1TNF y 1D0G/1DU3, respectivamente<sup>51,55,62</sup>), se tuvieron en cuenta las siguientes observaciones:

1. Los aminoácidos N y C terminales del RBD de TRAIL y TNF-α forman una hebra β antiparalela.
2. Los aminoácidos terminales de esta hebra β se encuentran uno junto al otro en el mismo sitio de la molécula cerca del eje central del trímero de TRAIL-RBD (véase la Figura 19).

30 Esto significa, que por razones estéricas, el uso de extremos N y C en la misma molécula para la fusión de los dominios de la proteína (por ejemplo, para la adición de motivos de estabilización o etiquetas) es mutuamente exclusivo. El motivo de estabilización ideal debería ser un trímero pequeño, bien definido situado cerca del eje central del trímero de CD95L con su extremo N y C en sitios opuestos del motivo de estabilización con el fin de minimizar el riesgo de interferencia con los sitios de interacción ligando/receptor. Un dominio de proteína trimérico apropiado que cumple con estos criterios es el motivo Foldon de T4 de fibritina del bacteriófago T4<sup>61,65</sup>. De acuerdo con las consideraciones anteriormente mencionadas, el Foldon de T4 estaba fusionado C-terminalmente al CD95L-RBD humano (Glu142-Leu281 de CD95L). Entre el CD95L-RBD y el Foldon de T4, se colocó un elemento conector flexible (GSSGSSGSSGS) y se añadió una etiqueta de hexahistidina y una streptag-II (HHHHH-HSAWSPQFEK) C-terminalmente. Esta etiqueta de afinidad se unió al Foldon de T4 por medio un elemento conector flexible (SGPSSSSS). Para permitir una expresión basada en la secreción, se fusionó un péptido señal de Igκ humana al extremo N-terminal (Glu142). Se espera que el sitio de escisión del péptido señal propuesto formado por la fusión del líder Igκ a CD95LRBD libere un producto final con una glutamina localizada en posición N-terminal, correspondiente a Glu142 de CD95L humano. La secuencia de aminoácidos del constructo CD95L-T4 mostrada en la Figura 19 C se sometió a retrotraducción y se optimizó su uso de codones para la expresión basada en células de mamífero. Se realizó la síntesis génica por medio de ENTELECHON GmbH (Regensburg, Alemania). La casete de expresión final se subclonó en pCDNA4-HisMaxbackbone, usando sitios Hind-III y Not-I únicos del plásmido. Un resumen esquemático, incluyendo todas las características descritas anteriormente, se muestra a modo de ejemplo para el complejo TRAIL-T4-DR5 (Figura 19 D).

#### Expresión y purificación de CD95L-T4

55 Se transfectaron transitoriamente células HEK 293T cultivadas en DMEM + GlutaMAX (Gibco) con un suplemento de FBS al 10%, 100 unidades/ml de penicilina y estreptomina de 100 mg/ml con un plásmido que codificaba CD95L-T4. El sobrenadante de cultivo celular que contenía CD95L-T4 recombinante se cosechó tres días después de la transfección y se clarificó mediante centrifugación a 300 g seguido de filtración a través de un filtro estéril de 0,22 μm. Para la purificación de afinidad se cargó 1 ml de StrepTactin Sefarosa (IBA GmbH, Göttingen, Alemania) en una columna y se equilibró con 15 ml de tampón W (Tris-HCl 100 mM, NaCl 150 mM pH 8,0). El sobrenadante de cultivo celular se aplicó a la columna con una velocidad de flujo de 4 ml/min. Con posterioridad, se lavó la columna con tampón W y se hizo eluir el CD95L-T4 unido por etapas mediante la adición de 7 x 1 ml de tampón E (Tris-HCl 100 mM, NaCl 150 mM, Destiobiotina 2,5 mM, pH 8,0). El contenido de proteína de las fracciones de material eluido se analizó por medio SDS-PAGE y tinción con plata (Figura 19 E). Las fracciones E2-E5 se concentraron con posterioridad por ultrafiltración y se analizaron adicionalmente mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). La SEC se realizó en una columna Superdex 200 usando un sistema de cromatografía Äkta (GEHealthcare).

La columna se equilibró con solución salina tamponada con fosfato y el CD95L-T4 concentrado, purificado con StrepTactin (E2-E5) se cargó en la columna de la SEC en una velocidad de flujo de 0,5 ml/min. La elución de CD95L-T4 se controló por medio de la absorbancia a 280 nm. El peso molecular aparente de CD95L-T4 purificado se determinó basándose en el calibrado de la columna Superdex 200 con proteínas patrón de filtración en gel (Figura 19 F y G) (Bio-Rad GmbH, Munich, Alemania).

### Análisis de Apoptosis

Se utilizó un análisis celular con una línea de células T humanas permanente Jurkat A3 (núm. de cat. CRL2570, ATCC) para determinar la actividad inductora de la apoptosis de CD95L-T4. Las células Jurkat se hicieron crecer en matraces con medio RPMI-1640 + GlutaMAX (Gibco) con un suplemento de FBS al 10% (Biochrom), Penicilina de 100 unidades/ml y Estreptomina de 100 µg/ml (Gibco). Antes del análisis, se sembraron 100.000 células por pocillo en una placa de microtitulación de 96 pocillos. La adición de diferentes concentraciones de CD95L-T4 a los pocillos (volumen final: 200 µl) estuvo seguida de una incubación de 3 horas a 37°C. Las células se lisaron mediante la adición de 20 µl de tampón de lisis (HEPES 250 mM, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, EGTA 10 mM, Triton-X-100 al 5%, DTT 100 mM, AEBSF 10 mM, pH 7,5) y las placas se pusieron sobre hielo durante 30 minutos. La apoptosis está acompañada de un aumento de la actividad de la caspasa-3 y la caspasa-7. Por lo tanto, se utilizó la escisión del sustrato específico de la caspasa-3/-7 Ac-DEVD-AFC (Biomol) para determinar la extensión de la apoptosis. De hecho, la actividad de la Caspasa se correlaciona con el porcentaje de células apoptóticas determinado morfológicamente después de la tinción de las células con yoduro de propidio y Hoechst-33342 (datos no mostrados). Para el análisis de la actividad de la caspasa, se transfirieron 20 µl de producto lisado celular a una placa de microtitulación de color negro de 96 pocillos. Después de la adición de 80 µl de tampón que contenía HEPES 50 mM, sacarosa al 1%, CHAPS al 0,1%, Ac-DEVD-AFC 50 µM, y DTT 25 mM, pH 7,5, la placa se transfirió a un lector de microplacas Tecan Infinite F500 y se controló el aumento en la intensidad de fluorescencia (longitud de onda de excitación 400 nm, longitud de onda de emisión de 505 nm) (Figura 19 H).

Este análisis de la apoptosis también se utilizó para la determinación de la actividad biológica del agente biofarmacéutico APG101. ATG101 - una proteína de fusión del dominio extracelular del receptor de CD95 humano de CD95 (el compañero de unión in vivo del ligando de CD95) con Fc humana – suscita antagonismo sobre el efecto inductor de la apoptosis de CD95L. Antes de la adición de CD95L-T4 a las células Jurkat, se incubó CD95L-T4 a una concentración constante durante 30 minutos a 37°C con diferentes concentraciones de APG101 (Figura 19 I).

### Ejemplo 24 - CD95 media la invasión de células de glioblastoma resistentes a la apoptosis

En líneas celulares de glioma maligno humano a largo plazo, se analizó primero la inducción de la apoptosis tras la activación de CD95. El tratamiento con cremallera de leucina (LZ)-CD95L provocó efectos variables en diferentes líneas celulares de glioma: LZ-CD95L no indujo la apoptosis en las células A172, causó la apoptosis sólo a dosis elevadas en las células T98G o medió la apoptosis, ya a dosis bajas, en células LN18 (Fig. 1a). La especificidad de la muerte inducida por LZ-CD95L fue probada por la neutralización de la apoptosis por un anticuerpo para CD95L (NOK1; datos no mostrados). La resistencia de A172 a la apoptosis inducida por CD95 podría atribuirse al bajo nivel de expresión en superficie de CD95 (Fig. 1b). Las líneas celulares LN18 y T98G, sin embargo, mostraron una sensibilidad diferente a la apoptosis mientras mostraban niveles comparativamente altos de expresión en superficie de CD95 (Fig. 1 b).

La potencia para activar CD95 se correlaciona proporcionalmente con el grado de oligomerización de CD95L. Dado que el CD95L disponible tiene una tendencia a formar agregados, los autores de la presente invención diseñaron un CD95L humano con una capacidad para crear un trímero estable, el CD95L-T4 (Figura 19). Diferentes líneas celulares de glioma mostraron diferentes sensibilidades al tratamiento con CD95L-T4: La apoptosis se indujo ya a bajas concentraciones en las células LN18 pero no en las células T98G (Figura 11A). Especificidad de la muerte inducida por CD95L-T4 se demostró por la neutralización de la apoptosis por un anticuerpo para CD95L (NOK1; Figura 21). Las líneas celulares tanto LN18 como T98G, sin embargo, mostraron niveles comparativamente altos de expresión en superficie de CD95 (Figura 11A). Estas líneas celulares también expresaron otras moléculas necesarias para la apoptosis mediada por CD95, tales como FADD, caspasa-8 o caspasa-3 (Figura 15C y D)<sup>63,72</sup>.

Las células de glioma maligno se caracterizan por su potencial replicativo, la inducción de la angiogénesis, la migración/invasión y la evasión de la apoptosis. La estimulación de CD95 no alteró la tasa de proliferación de las células T98G (datos no mostrados). Para someter a ensayo el comportamiento de invasión los autores de la presente invención generaron cultivos esferoides de células T98G y LN18 y los cultivaron en placa dentro de una matriz de colágeno. El tratamiento con LZ-CD95L aumentó la invasión de células que migran a la matriz circundante en mayor medida en las células T98G que en las células LN18 (Fig. 1c, Fig. 11 B). Este fue también el caso cuando las células se cultivaron en placa en la cámara superior de dos cámaras separadas por una membrana recubierta con colágeno. Las células LN18 altamente sensibles a la apoptosis no reaccionaron a la activación de CD95 con un aumento de la migración. Las células T98G, en contraste, aumentaron su potencial de migración después del tratamiento con LZ-CD95L o un anticuerpo estimulador para CD95 (αAPO-1) (Fig. 3b).

La migración de células de glioma requiere la escisión de los componentes de la matriz extracelular a través de las MMP. En las células T98G, la actividad de MMP-9, evaluada por medio de zimografía en gel, se incrementó tras el tratamiento con CD95L-T4 (Figura 11C). Por consiguiente la estimulación de CD95 aumento de la expresión de los niveles de ARNm de MMP-2 y MMP-9 en T98G propensas a la migración, pero no en las células LN188 sensibles a la apoptosis (Figura 11 D y E). Lo más importante, la migración inducida por CD95 de las células T98G podría ser bloqueada con una reserva de ARNip contra MMP-2 y -9, lo que indica que estas MMP son necesarias para la migración inducida por CD95 (Figura 1F y G).

En una serie adicional de experimentos, los autores de la presente invención utilizaron cultivos de glioma a corto plazo derivados de tumores de pacientes. Estas células mostraron aberraciones genéticas GBM típicas incluidas las pérdidas de copia única de los loci PTEN y CDKN2A y la ganancia de copia única del locus EGFR, según la evaluación de los análisis de CGH en matriz (Bernhard Radlwimmer, comunicación personal). Cada cultivo derivado de GBM primario examinado en la presente memoria mostró una elevada expresión en superficie de CD95 (n = 18) y niveles similares o superiores de resistencia a la apoptosis inducida por CD95 (n = 8) en comparación con los observados en la línea celular T98G propensa a invasión (Figura 12A, Figura 20 y datos no presentados). Ni los niveles de expresión de CD95 de superficie ni la resistencia a la apoptosis mediada por CD95 se vieron afectados por el número de pases en cultivo (datos no mostrados). Además, los autores de la presente invención examinaron la invasión inducida por CD95 en los cultivos derivados de GBM NCH89, NCH125 y NCH270. La activación de CD95 en NCH125 y NCH270 aumentó la expresión de MMP-2 y MMP-9 y con posterioridad indujo migración (Figura 12B a D). La estimulación de CD95 en las células NCH89 ni aumentó la migración ni la expresión de MMP-9 (Figura 12B a D). Por lo tanto, la respuesta de la migración de CD95 no se correlaciona estrictamente con el grado de resistencia a la apoptosis. En la misma línea, la expresión del ARNm de CD95 y CD95L fue diferente entre los tumores GBM primarios altamente invasivos sometidos a ensayo (Figura 20). Las MMP son necesarias para la migración de inducida por CD95L-T4 de NCH125, ya que una reserva de ARNip para MMP-2 y -9 bloqueó significativamente la migración (Figura 12E).

#### **Ejemplo 25 - CD95 media la invasión a través de la ruta PI3K/ILK/GSK/MMP de una manera independiente de las caspasas**

La invasión de células de glioma requiere la escisión de componentes de la matriz extracelular a través de las metaloproteinasas de la matriz (MMP) como ya se ha descrito anteriormente. En consecuencia, los niveles de ARNm de MMP9 y MMP-2 se incrementan en gran medida tras la activación de CD95 en T98G propensas a la migración, pero no en las células LN18 resistentes a la apoptosis (Fig. 2). Recientemente se ha informado de que la quinasa ligada a integrina (ILK) media la expresión de MMP9 a través de la inhibición de la glucógeno sintasa quinasa-3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ )<sup>9,10</sup>. Se observó inhibición de la GSK3 $\beta$  través de la fosforilación en su residuo de serina-9 (fosfo-Ser9) en células T98G tras el tratamiento con anticuerpo para LZ-CD95L o  $\alpha$ APO-1 (Fig. 3a y Fig. 8). También se encontró fosforilación de GSK3 $\beta$  en las células LN18, pero con diferente cinética (Fig. 3A y Fig. 8). Las células T98G propensas a la migración exhibieron mayores niveles basales de fosfo-Ser9-GSK3 $\beta$  y una fosforilación de larga duración gradualmente creciente de GSK3 $\beta$  tras la activación de CD95 (Fig. 3a y Fig. 8). Las células LN18 propensas a apoptosis mostraron una fosforilación transitoria (5-10 min) de GSK3 $\beta$  tras la activación de CD95 (Fig. 3a). La expresión en exceso de un mutante de GSK3 $\beta$  constitutivamente activo (GSK S9A) bloqueó la migración inducida por CD95 de las células T98G (Fig. 3b). Las células T98G que expresaban GSK S9A y sus contrapartes de tipo salvaje mostraron niveles comparables de sensibilidad a la apoptosis inducida por CD95 y de la tasa de crecimiento (Fig. 3c-d). Por lo tanto, la inhibición de la migración por GSK3 $\beta$  constitutivamente activa en células T98G no se puede atribuir a una tasa de proliferación diferente. Por consiguiente, el tratamiento previo con el inhibidor de ILK KP-SD-1 bloqueó la migración mediada por CD95 de las células T98G sin afectar a la migración basal (Fig. 3e). ILK activa la proteína quinasa B (PKB/Akt) e inhibe la actividad de GSK3 $\beta$  de una manera dependiente de fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K)<sup>11</sup>. Por consiguiente, la inhibición de PI3K por LY294002 bloqueó la actividad AKT inducida por CD95 y la fosforilación de ser9 de GSK3 $\beta$  en las células T98G sin cambiar el estado de fosforilación de la quinasa receptora extracelular (ERK) (Fig. 3f).

La  $\beta$ -catenina forma un complejo junto con la GSK3 $\beta$  activa, la poliposis adenomatosa de colon (APC) y la proteína axina - el complejo de degradación. La fosforilación de la  $\beta$ -catenina por GSK3 $\beta$  la dirige a la degradación proteosómica. Como consecuencia de la inhibición de GSK3 $\beta$ , la  $\beta$ -catenina se acumula y se transloca al núcleo en donde se acopla el extremo N-terminal de las proteínas de unión al ADN de la familia TCF/Lef<sup>12</sup> induciendo la expresión de diferentes genes diana, incluyendo las MMP. En las células T98G, la activación de CD95 indujo la translocación nuclear de la  $\beta$ -catenina activa, no fosforilada en la serina 37 o la Treonina 41 elegidas como diana por GSK (Fig. 3g). En conjunto, la activación de CD95 induce la migración/invasión a través de la ruta PI3K/ILK/GSK3 $\beta$ / $\beta$ -catenina/MMP.

CD95 transduce la señal de apoptosis a través de la activación de las caspasas. Se ha informado recientemente de que CD95 media la migración a través de la activación de la caspasa-8, NF $\kappa$ B y ERK en líneas celulares de tumores mesenquimales resistentes a la apoptosis inducida por CD95<sup>13</sup>. En contraste con las células LN18, la estimulación con CD95 de las células T98G no indujo la escisión de la caspasa-8 (Fig. 3h). Por consiguiente, el tratamiento previo

de las células T98G con un inhibidor de caspasa de amplio espectro, benzoil-VAD.fluorometilcetona (zVAD.fmk) no bloqueó la fosforilación en Ser9 GSK3 $\beta$  en células T98G (Fig. 8). El pre-tratamiento de las células T98G con el inhibidor de MEK PD98059 tampoco interfirió en la migración inducida por CD95 (Fig. 3i).

5 Además de las caspasas, la fosfoproteína enriquecida en diabetes/fosfoproteína enriquecida en astrocitos-15 kDa (PED/PEA-15) tiene un DED y puede, por lo tanto, interactuar con otras moléculas en DISC. Se ha informado de que la expresión en exceso de PED bloquea la apoptosis inducida por CD95 y TNFR-1 a través de la activación simultánea de ERK y la inhibición de la quinasa N-terminal Jun (JNK)<sup>14,15</sup>. La actividad anti-apoptótica de PED aumenta si es fosforilada por AKT<sup>16</sup>. En las células T98G, el ARN de interferencia corto ARNip para PED, pero no un  
10 ARNip de control, disminuyó los niveles de PED, y la activación referida de ERK, pero no la inactivación mediada por CD95 de GSK3 $\beta$  (Fig. 8). Además los niveles de FLIPL, otra molécula que puede ser reclutada para DISC e inhibe la apoptosis, no se vieron afectados tras el tratamiento con LZCD95L (datos no mostrados).

15 Uno de los inductores mejores descritos de la invasión de GBM es el EGF. Su unión a EGFR promueve la expresión de MMP-9 a través de la activación de la MAPK/ERK y la ruta PI3K<sup>27</sup>. PI3K activa AKT/PKB, que a su vez es capaz de fosforilar GSK3 $\beta$  conduciendo a su inactivación. Para someter a ensayo si la señalización con PI3K o MAPK podría ser responsable de la invasión observada, se determinó la fosforilación de ERK y AKT. La estimulación de las células T98G y LN18 con CD95L-T4 activó AKT pero no ERK (Figura 13A). Curiosamente, la actividad de ERK fue incluso bloqueada al aumentar el tiempo después de la estimulación (Figura 13A). En las células T98G, NCH125 y  
20 NCH270 propensas a la invasión, la fosforilación de AKT exhibe una curva en forma de campana dependiente de la concentración (Figura 13B). En contraste, en las células NCH89, que no reaccionan a CD95 con el aumento de la invasión, CD95L-T4 no activa AKT por encima de los niveles basales (Figura 13B). Se observó inhibición de GSK3 $\beta$  por medio de la fosforilación en su serina-9 (fosfo-Ser9) en las células T98G tras el tratamiento con el anticuerpo para CD95L-T4 o  $\alpha$ Apo-1 por medio de transferencia Western y tinción FACS (Figura 13C y Figura 21).

25 La expresión en exceso de un mutante de GSK3 $\beta$  constitutivamente activo (GSK S9A) a través de la infección lentiviral bloqueó la migración inducida por CD95 de las células T98G (Figura 13D). Las células T98G que expresaban GSK S9A y sus contrapartes de tipo salvaje mostraron una tasa de crecimiento y unos niveles de sensibilidad a la apoptosis inducida por CD95 comparables (Figura 21). Por lo tanto, la inhibición de la migración por  
30 GSK3 $\beta$  constitutivamente activa en células T98G no se puede atribuir a una tasa de proliferación diferente. La GSK3 $\beta$  activa forma un complejo con  $\beta$ -catenina, la poliposis adenomatosa (APC) y las proteínas axina - el complejo de degradación. La fosforilación de la  $\beta$ -catenina por GSK3 la dirige a la degradación proteosómica. Como consecuencia de la inhibición de GSK3 $\beta$ , la  $\beta$ -catenina se acumula y se transloca al núcleo, en donde se acopla al extremo N-terminal de las proteínas de unión de la familia de TCF (factor de células T)/Lef (factor de mejora linfocitaria)<sup>12</sup>, induciendo la expresión de diferentes genes diana incluyendo c-Jun, un factor de transcripción esencial para la expresión de MMP-9<sup>31,32</sup>. Por otra parte, la inhibición de la actividad de GSK3 $\beta$  puede aumentar directamente la expresión de AP-1<sup>10</sup>. Para estudiar si la estimulación de CD95 desencadena la actividad transcripcional de la  $\beta$ -  
35 catenina los autores de la presente invención examinaron la expresión de la  $\beta$ -catenina citoplasmática y nuclear y la actividad informadora transcripcional de la  $\beta$ -catenina. Se utilizó LiCl como control positivo, un conocido inhibidor de GSK3 $\beta$  e inductor de la actividad transcripcional de la  $\beta$ -catenina. En las células T98G, la activación de CD95 indujo la acumulación citoplásmica de  $\beta$ -catenina 30 minutos después de la estimulación con CD95L-T4 (Figura 13E). Además, se observó la translocación nuclear de la  $\beta$ -catenina activa, no fosforilada en la Ser 37 o la Thr 41 elegidas como diana por GSK (Figura 13F). La actividad informadora de TCF/LEF (TOP-FLASH) también fue significativamente inducida después de CD95L-T4 (Figura 13G). La mutación del dominio de unión a TCF/Lef abolió  
40 la inducción por CD95L-T4 de la actividad luciferasa (FOP-FLASH; Figura 13G). Además, la actividad de NF $\kappa$ B aumento significativamente 8h después de la estimulación con 20 pero no con 10 ng/ml de CD95L-T4 (Figura 13H). Tomado en conjunto, la activación de CD95 induce la migración/invasión a través de la ruta PI3K/AKT/GSK3 $\beta$ / $\beta$ -catenina/MMP y, posiblemente, la ruta PI3K/AKT/NF $\kappa$ B/MMP.

#### 50 **Ejemplo 26 - La migración inducida por CD95 también se detecta en cultivos de glioma primarios resistentes a la apoptosis**

En una serie adicional de experimentos, los autores de la presente invención utilizaron cultivos de glioma a corto  
55 plazo derivados de tumores de los pacientes. Las células de astrocitoma difuso (OMS II) mostraron una elevada expresión en la superficie de CD95 y fueron relativamente sensibles a la apoptosis mediada por CD95 (Fig. 4). En contraste, las células procedentes de oligodendroglioma (OMS III) o glioblastoma (OMS IV) fueron altamente resistentes a la apoptosis mediada por CD95 a pesar de la elevada expresión en superficie de CD95 (Fig. 4 y Fig. 9). Cada cultivo primario derivado de GBM examinado aquí mostró una elevada expresión de CD95 en superficie (n = 18) y niveles similares o superiores de resistencia a la apoptosis inducida por CD95 (n = 8) en comparación con los  
60 observados en la línea celular T98G propensa a la invasión. (Fig. 9). Tanto los niveles de expresión en superficie de CD95 como la resistencia a la apoptosis mediada por CD95 no se vieron afectados por el número de pases en cultivo (datos no mostrados). Además, los autores de la presente invención sometieron a ensayo tres cultivos derivados de GBM que fueron relativamente (NCH125) o altamente resistentes (NCH89 y NCH270) a la apoptosis inducida por CD95. La activación de CD95 en NCH125 y NCH270 aumentó la expresión de MMP9 y MMP-2 y,

posteriormente, la migración (Fig. 5a-c). La estimulación de CD95 en las células NCH89 no aumentó la migración ni la expresión de MMP9 y MMP-2 (Fig. 5b-c). Por lo tanto, la respuesta de migración a CD95 no se correlaciona estrictamente con el grado de resistencia a la apoptosis. En la misma línea, la expresión del ARNm de CD95 y CD95L fue muy diferente entre los tumores GBM primarios altamente invasivos sometidos a ensayo (Fig. 9).

#### **Ejemplo 27 – La irradiación aumenta la invasividad a través del sistema CD95/CD95L**

En el ámbito clínico, las células invasoras que escapan de la cirugía son las dianas de la radioterapia y la quimioterapia coadyuvante. Se ha informado de que la irradiación y aumenta la expresión de CD95 y CD95L y de ese modo induce la apoptosis<sup>3</sup>. Teniendo en cuenta los datos actuales los autores de la presente invención quisieron analizar si CD95 y CD95L inducidos por la irradiación también podrían aumentar la invasividad de las células de glioma. En primer lugar, los autores de la presente invención demostraron que la irradiación de las células T98G aumenta la expresión del ARNm de CD95 y CD95L (Fig. 6a). La expresión más alta de ARNm de CD95 y CD95L se encontró en una dosis de 3 Grays (Gy). A la misma dosis, el ARNm de MMP-2 se había reducido significativamente (Fig. 6b). El ARNm de MMP9 también fue regulado al alza significativamente a 3 y 10 Gy pero en un grado inferior (Fig. 6b). Sobre todo, la expresión de MMP se reflejó en una mayor tasa de migración de las células irradiadas que podría ser revertida por la neutralización de CD95L (Fig. 6c). Los cultivos de GBM primarios también mostraron un fenotipo más invasivo después de la irradiación (Fig. 6d y Fig. 10). La migración inducida por irradiación fue completamente dependiente de CD95L (Fig. 6d). Curiosamente, incluso en cultivos de NCH89 que no mostraron un fenotipo invasivo después de la activación directa de CD95, 10 Gy de irradiación aumentaron el número de células que migraban a través de CD95L (Fig. 6d). Irradiación indujo significativamente la migración de una manera dependiente de CD95 en nueve de los diez cultivos primarios derivados de GBM examinados aquí (Fig. 6d y Fig. 10). El único cultivo que no pudo mostrar una tendencia significativa a migrar tras la estimulación de CD95 tuvo uno niveles de expresión de CD95 en superficie inferiores (NCH 417; Fig. 10). Los autores de la presente invención estudiaron adicionalmente la expresión de estas moléculas en tumores recurrentes que surgieron después de la cirugía y la irradiación del tumor original. Los niveles de expresión de CD95L dentro del tumor se puntuaron de 0 a 4 (Fig. 6e). Mientras que los niveles en el primer glioma detectado nunca estuvieron por encima de 0 (1-24 células positivas para CD95L por campo), se detectó un aumento espectacular de la expresión de CD95L después de la radioterapia en ocho de los nueve tumores recurrentes estudiados (Fig. 6e). Se detectó CD95L en las células tumorales positivas para GFAP (Fig. 6f). Se detectó la expresión adicional de CD95 y MMP9 en la misma región en cortes consecutivos (Fig. 6f). Sobre todo, no se observaron células apoptóticas cerca de las células que expresaban CD95L (datos no mostrados).

#### **Ejemplo 28 - PI3K se activa a través del reclutamiento de Src por CD95**

Src conecta CD95 a la actividad PI3K como se muestra por los experimentos de co-inmunoprecipitación (Figura 14A a C). En efecto, el tratamiento de las células T98G y LN18 con CD95L-T4 indujo el reclutamiento de Src y la subunidad p85 de PI3K por CD95. La asociación del p85 con CD95 fue examinada por medio de inmunoprecipitación o bien de CD95 o bien de p85. El grado de asociación de p85 con CD95 está inversamente correlacionado con la concentración de CD95L-T4 en células T98G (Figura 14B). Sin embargo, en las células LN18 el reclutamiento de p85 a CD95 solamente se detectó a altas concentraciones de CD95L-T4 (Figura 14A). La inmunoprecipitación de CD95 permitió la detección de un miembro de la familia de Src cinco minutos después del tratamiento con una baja concentración de CD95L-T4 (Figura 14A y B). La asociación a Src disminuyó a una concentración más alta (Figura 14A y B). Por lo tanto, a bajas concentraciones de CD95L-T4 tanto Src como p85 se asociaron a niveles detectables con CD95 en las células T98G pero en las células LN18 solo se detectó Src. Adicionalmente, después de un escrutinio con anticuerpos frente a varios SFK, tales como Fyn, Lyn, pp60 y Yes, los autores de la presente invención identificaron Yes como miembro de la familia Src que une CD95 a PI3K (Figura 14C). Para validar el papel de Yes en la migración de células de glioma, se realizaron experimentos de reducción de la expresión génica. En las células transfectadas con ARNip de Yes, la expresión de Yes, evaluada por medio de FACS y qRT-PCR, se redujo mientras que la expresión de Fyn, otro miembro de la familia Src, no se vio afectada (Figura 14E). El ARNip de Yes, pero no de Fyn, anuló significativamente la migración inducida por CD95L-T4 de las células T98G y NCH125 (Figura 14D). Este bloqueo de la migración fue rescatado por la expresión en exceso de Yes en las células T98G y LN18 (Figura 14F). Al igual que el inhibidor de PI3K LY290059, el ARNip para Yes también inhibió la fosforilación inducida por CD95 de AKT (Figura 14G).

#### **Ejemplo 29 - formación ineficaz de DISC en células de glioma resistentes a la apoptosis**

Se examinó el papel del represor PTEN de la ruta de PI3K (MMAC1, TEP1). Mientras que las células LN18 propensas a la apoptosis tienen un PTEN intacto, las células T98G portan a una mutación puntual (codón 42 CTT a CGT; Glicina a Glutamina) en un alelo y carecen del segundo alelo de PTEN y una pérdida total de uno del cromosoma 10<sup>57,59</sup>. No obstante, la expresión en exceso de PTEN no sensibilizó las células T98G ni NCH125 a la apoptosis mediada por CD95 (Figura 15A).

Los autores de la presente invención se cuestionaron si las caspasas estaban involucradas en la activación de PIK3 inducida por CD95. La inhibición de las caspasas por el inhibidor general de caspasas zVAD-FMK no impidió la fosforilación de GSK3 $\beta$  (Figura 15B). Del mismo modo, la escisión de la caspasa-8 inducida por CD95 sólo pudo ser detectada en células LN18 pero no en células T98G (Figura 15C). Para investigar si los componentes de DISC

5 habían sido reclutados de manera eficaz en estas células, los autores de la presente invención analizaron el reclutamiento de FADD en productos inmunoprecipitados con CD95. Si bien tras la estimulación con CD95L-T4 aumentó el reclutamiento de FADD por CD95 en las células LN18, no se detectó ningún aumento en las células T98G (Figura 15D). En consecuencia, el reclutamiento de caspasa-8 por CD95 aumentó tras la estimulación con CD95L-T4 en las células LN18 y J16, pero no en las células T98G (Figura 15D). Lo más importante, en las células

10 T98G, la reducción de la expresión génica del ARNip de Yes permitió la inducción por CD95L-T4 del reclutamiento de FADD por CD95 (Figura 15E). En esta línea, mientras que los niveles de expresión de FADD fueron similares en las células LN18 y T98G, los niveles de Yes fueron significativamente mayores en las células T98G (Figura 15F). A diferencia de Yes, la expresión de Fyn fue significativamente mayor en las células LN18 (Figura 15F).

### 15 **Ejemplo 30 - El sistema CD95/CD95L es un mediador importante de la invasión por glioma *in vivo***

La expresión de CD95L en pacientes que padecen glioblastoma multiforme mostró una distribución de tipo triángulo de CD95L en todos los tumores examinados (Fig. 7a, 17A). En el interior del tumor, se expresaron sólo pequeñas cantidades de CD95L (Fig. 7a.1, 17A.a). La expresión aumentó en la interfase tumor-parénquima (Fig. 7a.2), alcanzó

20 su punto máximo en el parénquima del cerebro adyacente al tumor (Fig. 7a.3, 17A.b) y volvió a disminuir al aumentar la distancia con el glioma (Fig. 7a.4, 17A.c). Se detectó CD95L en las células de glioma, neuronas y macrófagos (datos no mostrados). Se observó una expresión adicional de CD95L dentro del tumor en células de glioma que rodeaban los vasos del tumor. Del mismo modo, la fosforilación de las quinasas de la familia Src (pSrc) y la expresión de Yes se encontraron constantemente en la interfase tumor-anfitrión en cada muestra examinada, lo que

25 sugiere un papel en la invasión tumoral (Figura 17B). Dentro de las zonas de tumores sólidos, la expresión de Yes varió entre las muestras tumorales, de una expresión muy alta a una expresión sólo en las células tumorales dispersas. En estas zonas con alta expresión de Yes no se detectó fosforilación de Src o fue más bien limitada (Figura 17B).

30 Para la traducción de los hallazgos de los autores de la presente invención a un entorno más fisiológico *in vivo*, los autores de la presente invención examinaron el papel del sistema CD95/CD95L en un modelo de ratón de Glioblastoma multiforme. Para estos estudios, se inyectó por vía intracraneal la línea celular de glioma murino establecida SMA-560 en un anfitrión singénico Vm/Dk como se ha descrito. El uso de un modelo de tumor singénico fue importante para permitir la inducción en el tumor de la expresión de CD95L en el tejido cerebral circundante.

35 Las células SMA-560 expresaron sólo bajos niveles de receptor de CD95 sobre su superficie (Fig. 7b, 18A) y no CD95L en absoluto (Fig. 7c, 18B) cuando se mantuvieron en condiciones de cultivo celular. Según lo informado por otros autores<sup>17</sup>, los autores de la presente invención encontraron que las células SMA-560 eran resistentes a la apoptosis inducida por CD95 (datos no presentados). Después de la formación de esferoides, los niveles de CD95 aumentaron ligeramente (Fig. 7b, 18A), mientras que el análisis FACS no logró identificar CD95L en la superficie celular (Fig. 7c, 18B). A pesar de la cantidad relativamente baja de los niveles de CD95 en la superficie, los esferoides formados a partir de estas células presentan un aumento de la migración en el análisis de invasión de colágeno después de la estimulación con CD95 de una manera dependiente de la dosis (Fig. 7d, 18C). De acuerdo con el descubrimiento de los autores de la presente invención de que los esferoides no expresan CD95L (Fig. 7c, 40 18B), el bloqueo de CD95L usando el anticuerpo neutralizador de D95L MFL3 no alteró la invasión (Fig. 7d, 18C).

Curiosamente, el análisis FACS de los niveles en la superficie de CD95 y CD95L mostró un aumento significativo de ambas moléculas (Fig. 7b y 7c, 18A y 18B) cuando se analizaron células aisladas de tumores sólidos 14 y 18 días después de la inoculación. Esto indica el requerimiento de la interacción tumor-anfitrión y, por lo tanto, una

50 intercomunicación entre los factores del anfitrión y las células tumorales como se da en el caso del GBM murino.

Para un análisis más detallado de la importancia funcional de este aumento, los autores de la presente invención extrajeron fragmentos de tumores sólidos 14 días después de la inyección intracraneal de las células y preincubaron éstas durante una hora, ya sea con medio solo, con medio con MFL3 o con el anticuerpo de isotipo apropiado, respectivamente. Después de embeberlos en geles de colágeno, se controló la migración durante un periodo de 72

55 horas (Fig. 7e, 18D). Sorprendentemente, la preincubación con el anticuerpo neutralizante de CD95L MFL3, pero no con el isotipo o el medio solos, redujo la migración de las células fuera del núcleo del tumor en aproximadamente 50% (Fig. 7e, 18D).

60 Para verificar estos resultados *in vivo*, los autores de la presente invención inyectaron células SMA-560 positivas para GFP y MFL3 o el anticuerpo de isotipo apropiado en el cuerpo estriado izquierdo de Vm/Dk. El tratamiento de los ratones con MFL3 redujo de manera significativa la migración de las células tumorales en el hemisferio contralateral (Fig. 7f, 18E). Los autores de la presente invención concluyen, a partir de estos datos, que el sistema CD95/CD95L es un importante mediador de la invasión de glioma maligno en el cerebro circundante *in vivo*.

## Lista de referencias

Toda la bibliografía citada en esta solicitud se incorpora a la presente memoria como referencia.

- 5 1. Kleihues, P., Burger, P. C., & Scheithauer, B. W. The new WHO classification of brain tumours *Brain Pathol.* 3, 255-268 (1993).
2. Friesen, C., Herr, I., Krammer, P. H., & Debatin, K. M. Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug- induced apoptosis in leukemia cells. *Nat Med* 2, 574-7 (1996).
3. Fulda, S. et al. Activation of the CD95 (APO-1/Fas) pathway in drug- and gamma- irradiation-induced apoptosis of brain tumor cells. *Cell Death Differ* 5, 884-93 (1998).
- 10 4. Kischkel, F. C. et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* 14, 5579-88 (1995).
5. Kischkel, F. C. et al. Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8 *J.Biol.Chem.* 276, 46639-46646 (2001).
- 15 6. Boldin, M. P. et al. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem* 270, 7795-8 (1995).
7. Medema, J. P. et al. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *Embo J* 16, 2794-804 (1997).
8. Scaffidi, C. et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* 17, 1675-87 (1998).
- 20 9. Troussard, A. A., Tan, C., Yoganathan, T. N., & Dedhar, S. Cell-extracellular matrix interactions stimulate the AP-1 transcription factor in an integrin-linked kinase- and glycogen synthase kinase 3-dependent manner. *Mol. Cell Biol.* 19, 7420-7427 (1999).
10. Troussard, A. A. et al. The integrin linked kinase (ILK) induces an invasive phenotype via AP-1 transcription factor-dependent upregulation of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9). *Oncogene* 19, 5444-5452 (2000).
- 25 11. Delcommenne, M. et al. Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 11211-11216 (1998).
12. Eastman, Q. & Grosschedl, R. Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals. *Curr.Opin.Cell Biol.* 11, 233-240 (1999).
- 30 13. Bamhart, B. C. et al. CD95 ligand induces motility and invasiveness of apoptosis-resistant tumor cells. *EMBO J.* 23, 3175-3185 (2004).
14. Condorelli, G. et al. PED/PEA-15: an anti-apoptotic molecule that regulates FAS/TNFR1-induced apoptosis *Oncogene* 18, 4409-4415 (1999).
- 35 15. Condorelli, G. et al. Multiple members of the mitogen-activated protein kinase family are necessary for PED/PEA-15 anti-apoptotic function *J.Biol.Chem.* 277, 11013-11018 (2002).
16. Trencia, A. et al. Protein kinase B/Akt binds and phosphorylates PED/PEA-15, stabilizing its antiapoptotic action *Mol.Cell Biol.* 23, 4511-4521 (2003).
- 40 17. Ashley, D. M., Kong, F. M., Bigner, D. D., & Hale, L. P. Endogenous expression of transforming growth factor beta1 inhibits growth and tumorigenicity and enhances Fas-mediated apoptosis in a murine high-grade glioma model. *Cancer Res.* 58, 302-309 (1998).
18. Krammer, P. H. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407, 789-795 (2000).
19. Biancone, L. et al. Development of inflammatory angiogenesis by local stimulation of Fas in vivo *J.Exp.Med.* 186, 147-152 (1997).
- 45 20. Hohlbaum, A. M., Saff, R. R., & Marshak-Rothstein, A. Fas-ligand--iron fist or Achilles' heel? *Clin.Immunol.* 103, 1-6 (2002).
21. Lee, J. K., Sayers, T. J., Back, T. C., Wigginton, J. M., & Wiltrout, R. H. Lack of FasL-mediated killing leads to in vivo tumor promotion in mouse Lewis lung cancer *Apoptosis.* 8, 151-160 (2003).
22. Shinohara, H., Yagita, H., Ikawa, Y., & Oyaizu, N. Fas drives cell cycle progression in glioma cells via extracellular signal-regulated kinase activation *Cancer Res.* 60, 1766-1772 (2000).
- 50 23. Choi, C. et al. Fas-induced expression of chemokines in human glioma cells: involvement of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase *Cancer Res.* 61, 3084-3091 (2001).
24. Choi, C., Gillespie, G. Y., Van Wagoner, N. J., & Benveniste, E. N. Fas engagement increases expression of interleukin-6 in human glioma cells *J.Neurooncol.* 56, 13-19 (2002).
- 55 25. Choi, K., Benveniste, E. N., & Choi, C. Induction of intercellular adhesion molecule-1 by Fas ligation: proinflammatory roles of Fas in human astrogloma cells *Neurosci.Lett.* 352, 21-24 (2003).
26. Jarad, G. et al. Fas activation induces renal tubular epithelial cell beta 8 integrin expression and function in the absence of apoptosis *J.Biol.Chem.* 277, 4782647833 (2002).
27. Rao, J. S. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases *Nat. Rev. Cancer* 3, 489-501 (2003).
- 60 28. Sawaya, R. et al. Elevated levels of Mr 92,000 type IV collagenase during tumor growth in vivo. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 251, 632-636 (1998).
29. Frei, K., Ambar, B., Adachi, N., Yonekawa, Y., & Fontana, A. Ex vivo malignant glioma cells are sensitive to Fas (CD95/APO-1) ligand-mediated apoptosis *J.Neuroimmunol.* 87, 105-113 (1998).



30. 30. Weller, M. et al. Anti-Fas/APO-1 antibody-mediated apoptosis of cultured human glioma cells. Induction and modulation of sensitivity by cytokines *J.Clin.Invest* 94, 954-964 (1994).
31. 31. Sato, H. & Seiki, M. Regulatory mechanism of 92 kDa type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumor cells *Oncogene* 8, 395-405 (1993).
- 5 32. 32. Gum, R. et al. Stimulation of 92-kDa gelatinase B promoter activity by ras is mitogen-activated protein kinase kinase 1-independent and requires multiple transcription factor binding sites including closely spaced PEA3/ets and AP-1 sequences *J.Biol.Chem.* 271, 10672-10680 (1996).
33. 33. Lakka, S. S. et al. Downregulation of MMP-9 in ERK-mutated stable transfectants inhibits glioma invasion in vitro *Oncogene* 21, 5601-5608 (2002).
- 10 34. 34. Ellerbroek, S. M. et al. Phosphatidylinositol 3-kinase activity in epidermal growth factor-stimulated matrix metalloproteinase-9 production and cell surface association. *Cancer Res.* 61, 1855-1861 (2001).
35. 35. Reya, T. & Clevers, H. Wnt signalling in stem cells and cancer *Nature* 434, 843-850 (2005).
36. 36. Mann, B. et al. Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96, 16031608 (1999).
- 15 37. 37. Staal, F. J. et al. Wnt target genes identified by DNA microarrays in immature CD34+ thymocytes regulate proliferation and cell adhesion *J.Immunol.* 172, 10991108 (2004).
38. 38. Burton, E. C. & Prados, M. D. Malignant gliomas *Curr. Treat. Options. Oncol.* 1, 459-468 (2000).
39. 39. Ohgaki, H. & Kleihues, P. Epidemiology and etiology of gliomas *Acta Neuropathol.(Berl)* 109, 93-108 (2005).
- 20 40. 40. Valente, P. et al. TIMP-2 over-expression reduces invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis. *Int.J.Cancer* 75, 246-253 (1998).
41. 41. Zuliani, C. et al. Control of neuronal branching by the death receptor CD95 (Fas/Apo-1). *Cell Death.Differ.* 13, 31-40 (2006).
42. 42. Demjen, D. et al. Neutralization of CD95 ligand promotes regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Nat.Med.* 10, 389-395 (2004).
- 25 43. 43. Martin-Villalba, A. et al. CD95 ligand (Fas-L/APO-1 L) and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand mediate ischemia-induced apoptosis in neurons. *J Neurosci* 19, 3809-17 (1999).
44. 44. Martin-Villalba, A. et al. Therapeutic neutralization of CD95L and TNF attenuates brain damage in stroke. *Cell Death and Differentiation* 8, 679-686(2001).
- 30 45. 45. Mattson, M. P. Apoptosis in neurodegenerative disorders *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 120-129 (2000).
46. 46. Trauth, B. C. et al. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 245, 301-5 (1989).
47. 47. Scaffidi, C., Medema, J. P., Krammer, P. H., & Peter, M. E. FLICE is predominantly expressed as two functionally active isoforms, caspase-8/a and caspase-8/b. *J Biol Chem* 272, 26953-8 (1997).
- 35 48. 48. Ninck, S. et al. Expression profiles of angiogenic growth factors in squamous cell carcinomas of the head and neck *Int.J.Cancer* 106, 34-44 (2003).
49. 49. Del Duca, D., Werbowetski, T., & Del Maestro, R. F. Spheroid preparation from hanging drops: characterization of a model of brain tumor invasion *J.Neurooncol.* 67, 295-303 (2004).
50. 50. Boggon, T.J. y Eck, M.J. (2004). Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene* 23, 7918-7927.
- 40 51. 51. Cha, S.S., Shin, H.C., Choi, K.Y., y Oh, B.H. (1999). Expression, purification and crystallization of recombinant human TRAIL. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 55, 1101-4.
52. 52. Choi, K., Benveniste, E.N., y Choi, C. (2003). Induction of intercellular adhesion molecule-1 by Fas ligation: proinflammatory roles of Fas in human astrogloma cells. *Neurosci. Lett.* 352, 21-24.
- 45 53. 53. Cursi, S., Rufini, A., Stagni, V., Condo, I., Matafora, V., Bachi, A., Bonifazi, A.P., Coppola, L., Superti-Furga, G., Testi, R., y Barila, D. (2006). Src kinase phosphorylates Caspase-8 on Tyr380: a novel mechanism of apoptosis suppression. *EMBO J.* 25, 1895-1905.
54. 54. Daigle, I., Yousefi, S., Colonna, M., Green, D.R., y Simon, H.U. (2002). Death receptors bind SHP-1 and block cytokine-induced anti-apoptotic signaling in neutrophils. *Nat. Med.* 8, 61-67.
- 50 55. 55. Eck, M.J. y Sprang, S.R. (1989). The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 A resolution. Implications for receptor binding. *J Biol Chem* 264, 17595-605.
56. 56. Eischen, C.M., Dick, C.J., y Leibson, P.J. (1994). Tyrosine kinase activation provides an early and requisite signal for Fas-induced apoptosis. *J Immunol* 153,1947-54.
57. 57. Fan, X., Aalto, Y., Sanko, S.G., Knuutila, S., Klatzmann, D., y Castresana, J.S. (2002). Genetic profile, PTEN mutation and therapeutic role of PTEN in glioblastomas. *Int. J. Oncol.* 21, 1141-1150.
- 55 58. 58. Feig, C., Tchikov, V., Schutze, S., y Peter, M.E. (2007). Palmitoylation of CD95 facilitates formation of SDS-stable receptor aggregates that initiate apoptosis signaling. *EMBO J.* 26, 221-231.
59. 59. Furnari, F.B., Lin, H., Huang, H.S., y Cavenee, W.K. (1997). Growth suppression of glioma cells by PTEN requires a functional phosphatase catalytic domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 12479-12484.
- 60 60. 60. Gulbins, E., Hermisson, M., Brenner, B., Grassme, H.U., Linderkamp, O., Dichgans, J., Weller, M., y Lang, F. (1998). Cellular stimulation via CD95 involves activation of phospho-inositide-3-kinase. *Pflugers Arch.* 435, 546-554.
61. 61. Guthe, S., Kapinos, L., Moglich, A., Meier, S., Grzesiek, S., y Kiefhaber, T. (2004). Very fast folding and association of a trimerization domain from bacteriophage T4 fibrin. *J. Mol. Biol.* 337, 905-915.

62. 62. Hymowitz, S.G., Christinger, H.W., Fuh, G., Ultsch, M., O'Connell, M., Kelley, R.F., Ashkenazi, A., y de Vos, A.M. (1999). Triggering cell death: the crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5 [In Process Citation]. *Mol Cell* 4, 563-71.
- 5 63. 63. Kugler, W., Erdlenbruch, B.; Junemann, A., Heinemann, D., Eibl, H., y Lakomek, M. (2002). Erucylphosphocholine-induced apoptosis in glioma cells: involvement of death receptor signalling and caspase activation. *J. Neurochem.* 82, 1160-1170.
64. 64. Madrid, L.V., Wang, C.Y., Guttridge, D.C., Schottelius, A.J., Baldwin, A.S., Jr., y Mayo, M.W. (2000). Akt suppresses apoptosis by stimulating the trans activation potential of the RelA/p65 subunit of NF-kappaB. *Mol. Cell Biol.* 20, 1626-1638.
- 10 65. 65. Meier, S., Guthe, S., Kiefhaber, T., y Grzesiek, S. (2004). FcγRIIIb, the natural trimerization domain of T4 fibrinogen, dissociates into a monomeric A-state form containing a stable beta-hairpin: atomic details of trimer dissociation and ocal betahairpin stability from residual dipolar couplings 1. *J. Mol. Biol.* 344, 1051-1069.
66. 66. Ozes, O.N., Mayo, L.D., Gustin, J.A., Pfeffer, S.R., Pfeffer, L.M., y Donner, D.B. (1999). NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* 401, 82-85.
- 15 67. 67. Park, C.M., Park, M.J., Kwak, H.J., Lee, H.C., Kim, M.S., Lee, S.H., Park, I.C., Rhee, C.H., y Hong, S.I. (2006). Ionizing Radiation Enhances Matrix Metalloproteinase-2 Secretion and Invasion of Glioma Cells through Src/Epidermal Growth Factor Receptor-Mediated p38/Akt and Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling Pathways. *Cancer Res.* 66, 8511-8519.
68. 68. Patt, S. y Cervos-Navarro, J. (1992). Combined erbB gene overexpression and decreased H-ras gene expression in human gliomas. *Acta Histochem. Suppl* 42, 131-138.
- 20 69. 69. Schlottmann, K.E., Gulbins, E., Lau, S.M., y Coggeshall, K.M. (1996). Activation of Srcfamily tyrosine kinases during Fas-induced apoptosis. *J. Leukoc. Biol.* 60, 546-554.
70. 70. Thomas, S.M. y Brugge, J.S. (1997). Cellular functions regulated by Src family kinases 1. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 513-609.
- 25 71. 71. Wong, B.R., Besser, D., Kim, N., Arron, J.R., Vologodskaya, M., Hanafusa, H., y Choi, Y. (1999). TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through a signalling complex involving TRAF6 and c-Src. *Mol. Cell* 4, 1041-1049.
72. 72. Karmakar, S., Weinberg, M.S., Banik, N.L., Patel, S.J., y Ray, S.K. (2006). Activation of multiple molecular mechanisms for apoptosis in human malignant glioblastoma T98G and U87MG cells treated with sulforaphane. *Neuroscience* 141, 1265-1280.
- 30 73. 73. Kleber, S.: "Gamma-Bestrahlung führt zur CD95-abhängiger Invasivität in apoptoseresistenten Glioblastomzellen." 3 January 2006, Dissertation, Heidelberg

**LISTADO DE SECUENCIAS**

5 <110> Deutsches Krebsforschungszentrum Universitätsklinikum Heidelberg  
 <120> La neutralización de la actividad CD95 bloquea la invasión de células de glioblastoma in vivo  
 <130> 41373P WO/WWHCrm  
 <150> US 60/877.367  
 <151> 2006-12-28  
 <160> 22  
 <170> PatentIn versión 3.3  
 10 <210> 1  
 <211> 400  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 15 <221> SEÑAL  
 <222> (1)..(16)  
 <220>  
 <221> DOMINIO  
 <222> (17)..(172)  
 20 <223> CD95R-ECD  
 <220>  
 <221> DOMINIO  
 <222> (173)..(400)  
 <223> IgG1-Fc  
 25 <400> 1

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

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

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

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

Pro Gly Glu Arg Lys Ala Arg Asp Cys Thr Val Asn Gly Asp Glu Pro  
 65 70 75 80

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

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

Leu Glu Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg Thr Gln Asn Thr Lys Cys Arg

ES 2 523 992 T3

115						120									125
Cys	Lys	Pro	Asn	Phe	Phe	Cys	Asn	Ser	Thr	Val	Cys	Glu	His	Cys	Asp
130						135					140				
Pro	Cys	Thr	Lys	Cys	Glu	His	Gly	Ile	Ile	Lys	Glu	Cys	Thr	Leu	Thr
145					150					155					160
Ser	Asn	Thr	Lys	Cys	Lys	Glu	Glu	Gly	Ser	Arg	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr
				165					170					175	
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser
			180					185					190		
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg
		195					200					205			
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro
	210					215					220				
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala
225					230					235					240
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val
				245					250					255	
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr
			260					265					270		
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr
		275					280					285			
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu
	290					295					300				
Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys
305					310					315					320
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser
				325					330					335	
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp
			340					345					350		
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser
		355					360					365			
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala
	370					375					380				
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys
385					390					395					400

5

<210> 2  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

ES 2 523 992 T3

	<220> <223> Cebador (directo CD95) <400> 2	
5	actgtgaccc ttgcaccaa t	21
	<210> 3 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Cebador (inv. CD95) <400> 3	
15	gccaccccaa gttagatctg g	21
	<210> 4 <211> 29 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Cebador (sonda CD95) <400> 4	
25	aatcatcaag gaatgcacac tcaccagca	29
	<210> 5 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Cebador (directo CD95L) <400> 5	
35	aaagtggccc attaacagg c	21
	<210> 6 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Cebador (inv. CD95) <400> 6	
45	aaagcaggac aattccatag gtg	23
	<210> 7 <211> 25 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> Cebador (sonda CD95L) <400> 7	
55	tccaactcaa ggtccatgcc tctgg	25
	<210> 8 <211> 25 <212> ADN <213> Artificial	
60		

ES 2 523 992 T3

<220>  
 <223> Cebador (directo MMP-9)  
 <400> 8  
 5 gatccaaaac tactcggaag acttg 25  
 <210> 9  
 <211> 15  
 10 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador (inv. MMPs-9)  
 <400> 9  
 15 gaaggcgcg gcaaa 15  
 <210> 10  
 <211> 20  
 20 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador (sonda MMP-9)  
 <400> 10  
 25 cgcgggcggt gattgacgac 20  
 <210> 11  
 <211> 26  
 30 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador (directo MMP-2)  
 <400> 11  
 35 ggacacacta aagaagatgc agaagt 26  
 <210> 12  
 <211> 21  
 40 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador (inv. MMP-2)  
 <400> 12  
 45 cgcatgtct cgatgtatt c 21  
 <210> 13  
 <211> 26  
 50 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <221> Cebador (sonda MMP-2)  
 <400> 13  
 55 agtgccccag caagtgatc ttgacc 26  
 <210> 14  
 <211> 23  
 60 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Cebador (directo b-actina)  
  
 <400> 14  
 5  
 acccacactg tgcccatcta cga 23  
  
 <210> 15  
 <211> 25  
 10  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador (inv. b-actina)  
  
 <400> 15  
 15  
 cagcgggaacc gctcattgcc aatgg 25  
  
 <210> 16  
 <211> 26  
 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador (sonda b-actina)  
 25  
 <400> 16  
  
 atgccctccc ccatgccatc ctgcgt 26  
  
 <210> 17  
 <211> 19  
 30  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador (directo Yes)  
 35  
 <400> 17  
  
 tatggctgcc agattgctg 19  
  
 <210> 18  
 <211> 20  
 40  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador (inv. Yes)  
 45  
 <400> 18  
  
 ttcaggagct gtccattga 20  
  
 <210> 19  
 <211> 20  
 50  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <2231> Cebador (directo Fyn)  
 55  
 <400> 19  
  
 tgaacagctc ggaaggagat 20  
  
 <210> 20  
 <211> 20  
 60  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

# ES 2 523 992 T3

<220>  
<223> Cebador (inv. Fyn)  
<400> 20

5 ggtttcactc tccgcgataa 20

<210> 21  
<211> 24  
<212> ADN  
10 <213> Artificial  
<220>  
<221> Cebador (directo GADPH)  
<400> 21

15 ggtcggagtc aacggattg gtcg 24

<210> 22  
<211> 22  
<212> ADN  
20 <213> Artificial  
<220>  
<223> Cebador (inv. GADPH)  
<400> 22

25 cctccgacgc ctgcttcacc ac 22



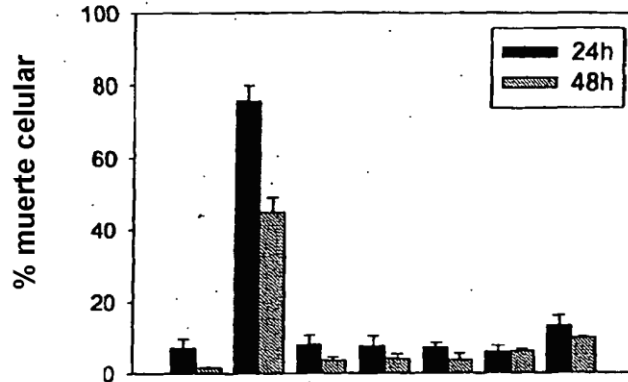
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un medicamento para su uso en el tratamiento de un individuo con glioma de alto grado, que comprende un agente que neutraliza la actividad del receptor CD95 mediante evitando la unión de CD95 a CD95L o alterando el complejo de receptor CD95/CD95L, en donde el agente se selecciona entre
- (a) un anticuerpo anti-CD95L inhibidor o un fragmento funcional del mismo,
  - (b) una molécula de receptor CD95 soluble o una porción de unión a CD95L de la misma,
  - (c) un inhibidor del ligando Fas seleccionado entre FLINT, DcR3 o fragmentos de los mismos,
  - (d) un anticuerpo que se une al receptor CD95 o un fragmento funcional del mismo, y
  - 10 (e) una proteína de fusión que comprende un dominio extracelular del receptor CD95 y un dominio Fc humano.
- 15 2. El medicamento para su uso en el tratamiento de un individuo con glioma de alto grado de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto es un anticuerpo que se une al receptor CD95.
3. El medicamento para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el compuesto es un anticuerpo que se une al receptor CD95L.
- 20 4. El medicamento para su uso en el tratamiento de un individuo con glioma de alto grado de la reivindicación 1, en donde el agente es un compuesto que se une a CD95L.
5. El medicamento para su uso en el tratamiento de un individuo con glioma de alto grado de la reivindicación 1, en donde el compuesto es un anticuerpo que se une a CD95L.
- 25 6. El medicamento para su uso en el tratamiento de un individuo con glioma de alto grado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el glioma de alto grado es un glioma de Grado IV de la OMS.

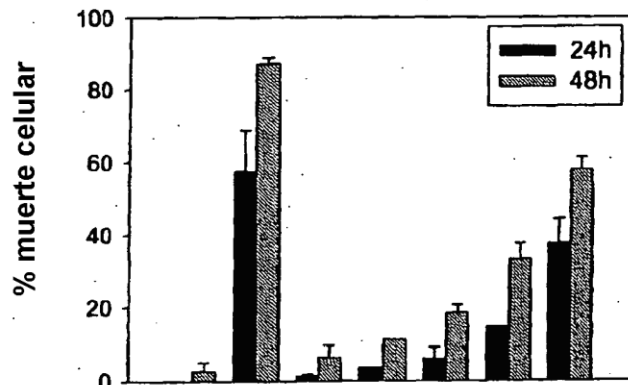
Figura 1

**a**

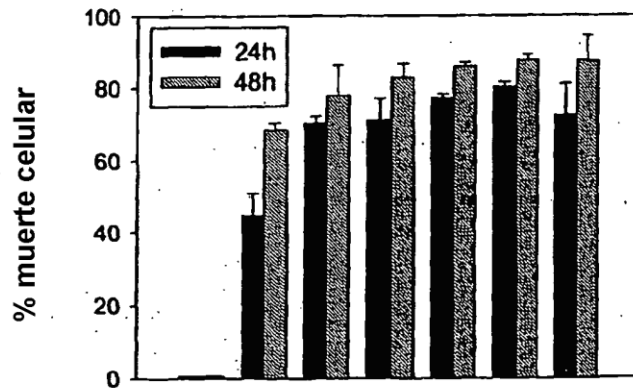
**A172**



**T98G**



**LN18**



Co St. 2,5 5 25 50 250

**LZ-CD95L(ng/ml)**

Figura 1 (continuación)

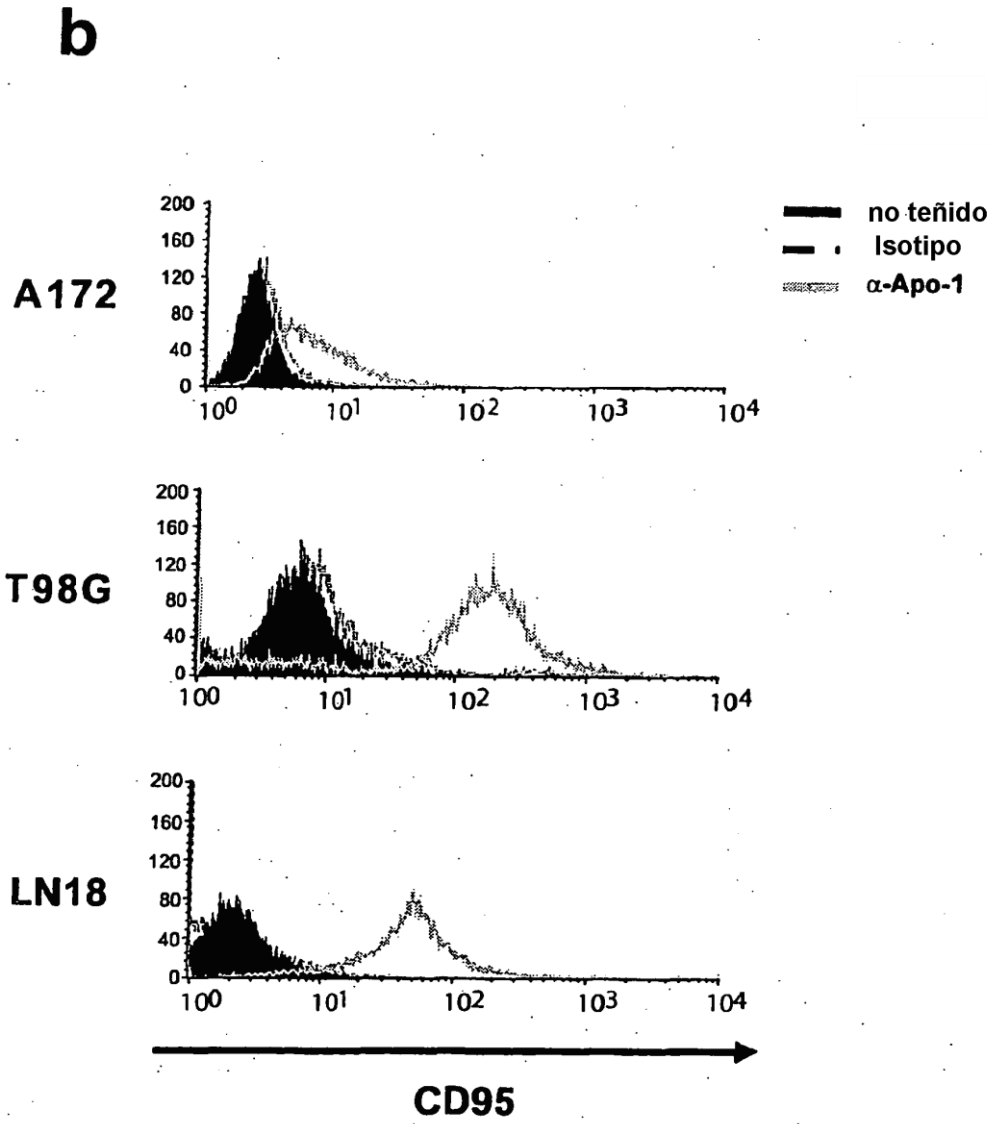
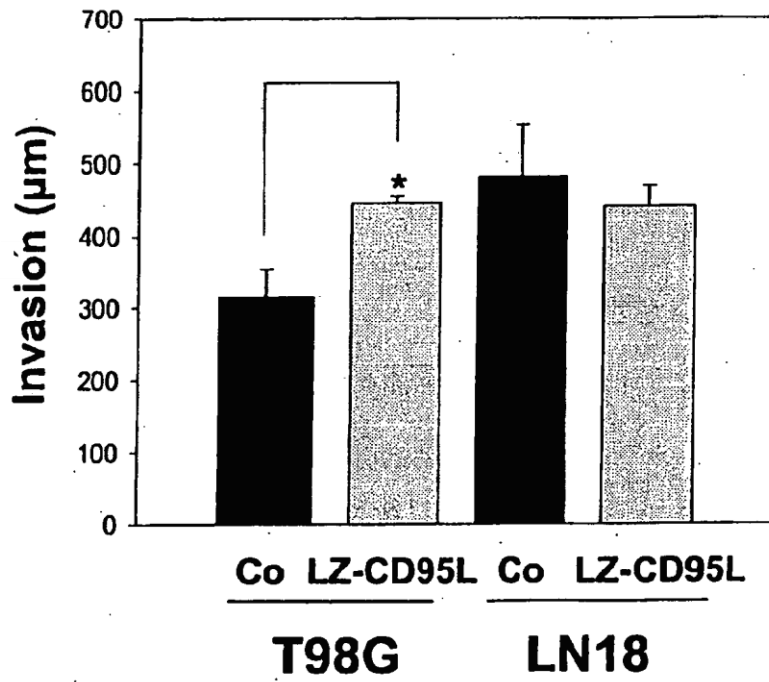


Figura 1 (continuación)

**C**



**d**

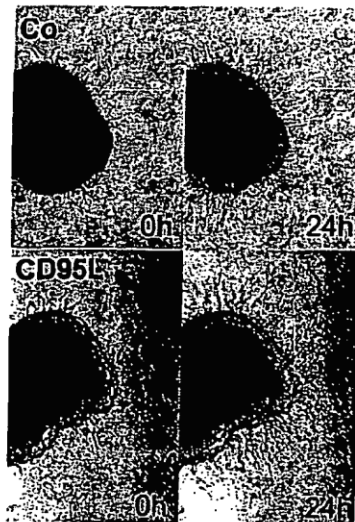
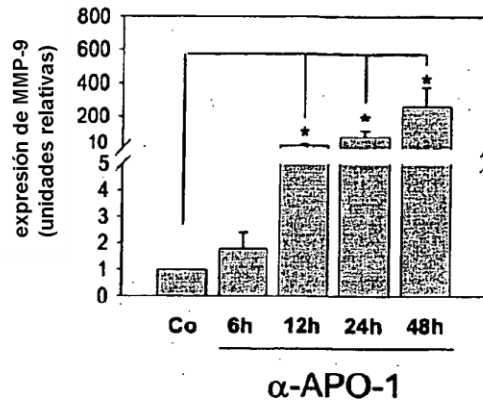
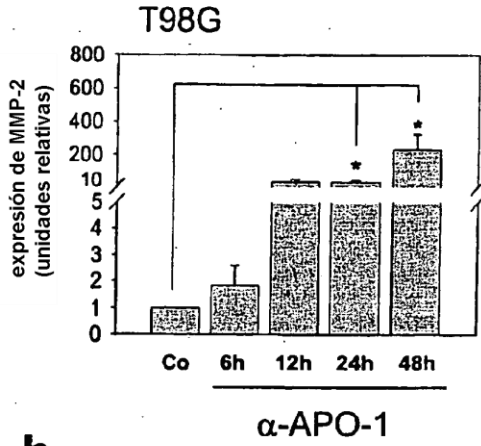


Figura 2

**a**



**b**

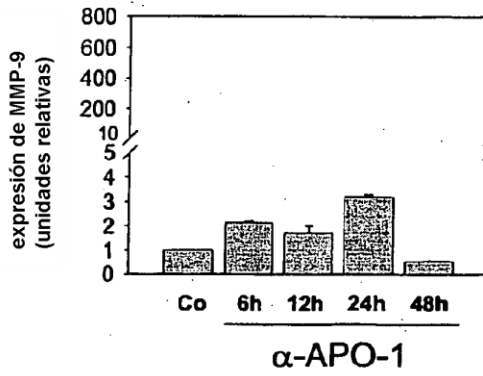
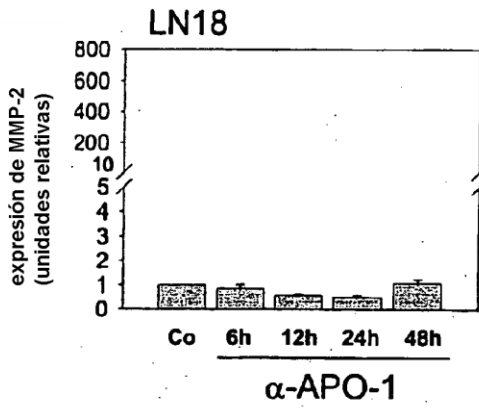


Figura 3

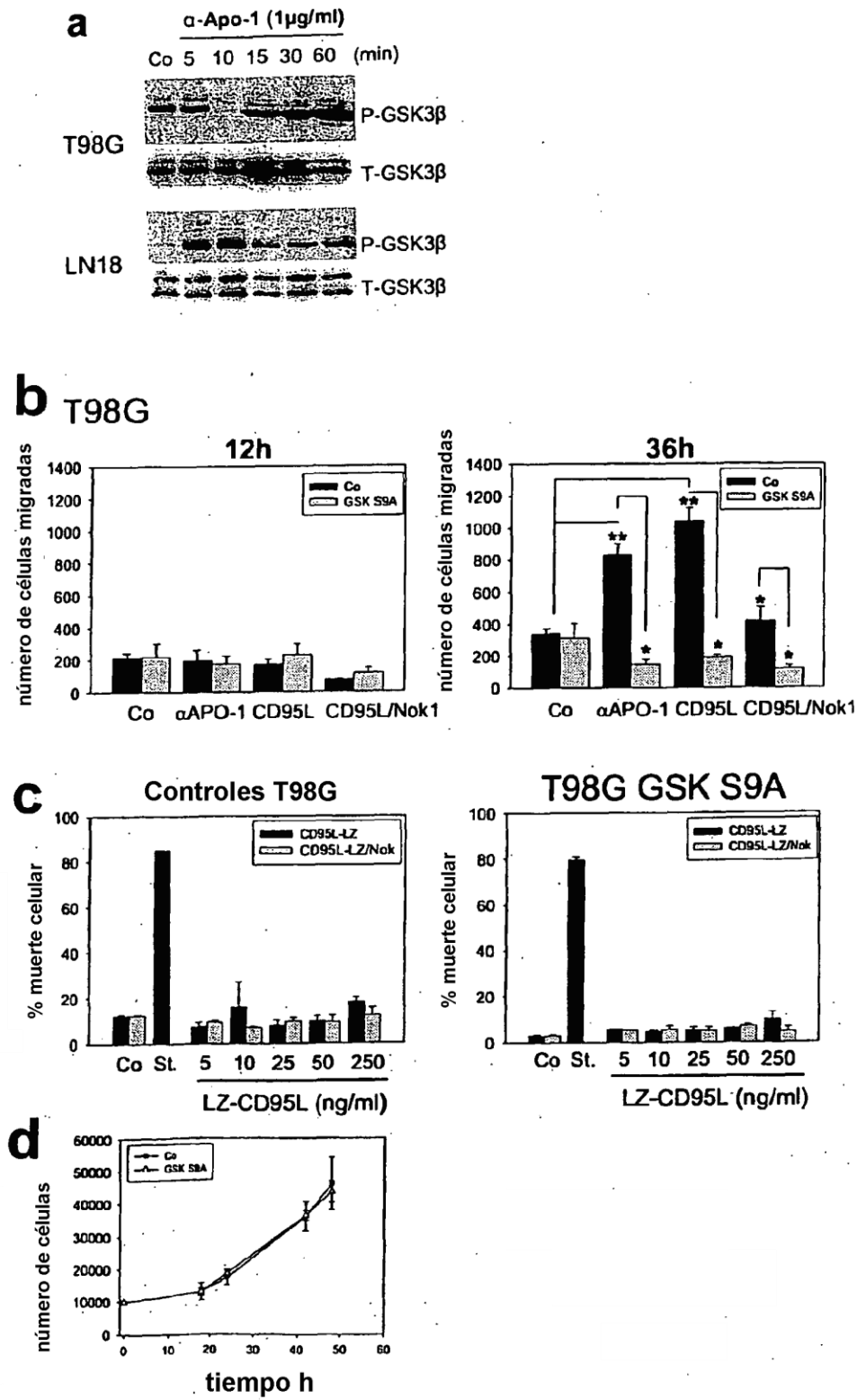
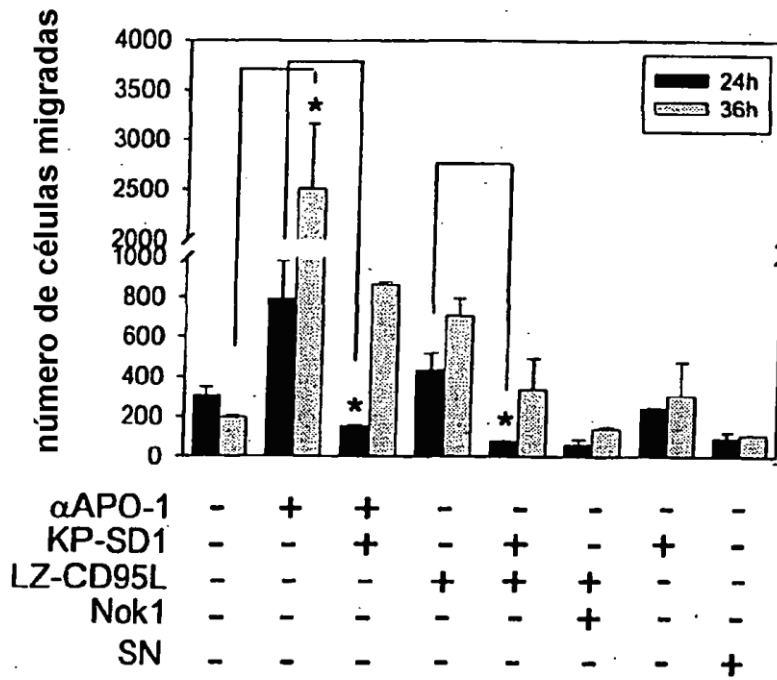


Figura 3 (continuación)

**e**



**f**

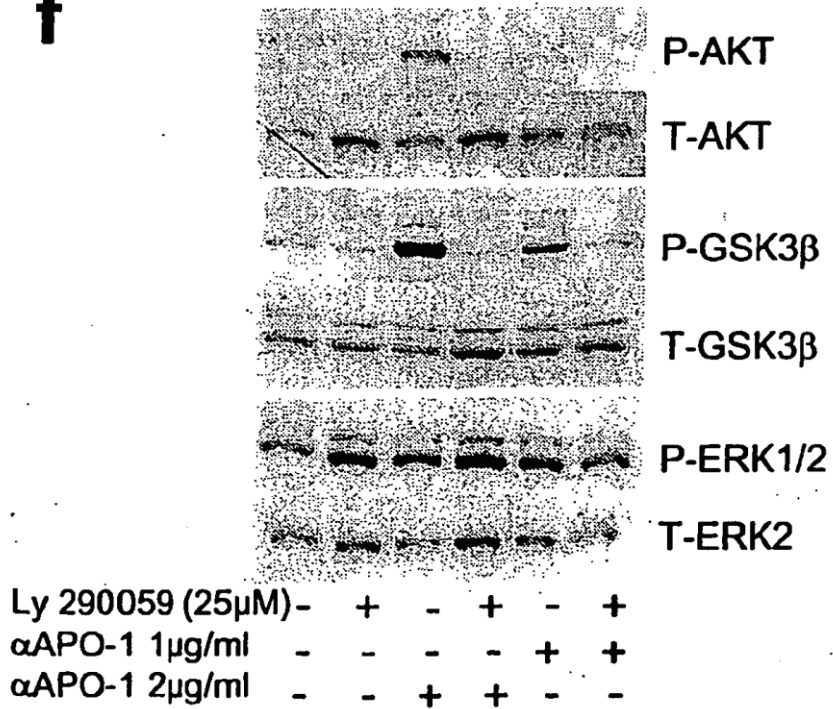


Figura 3 (continuación)

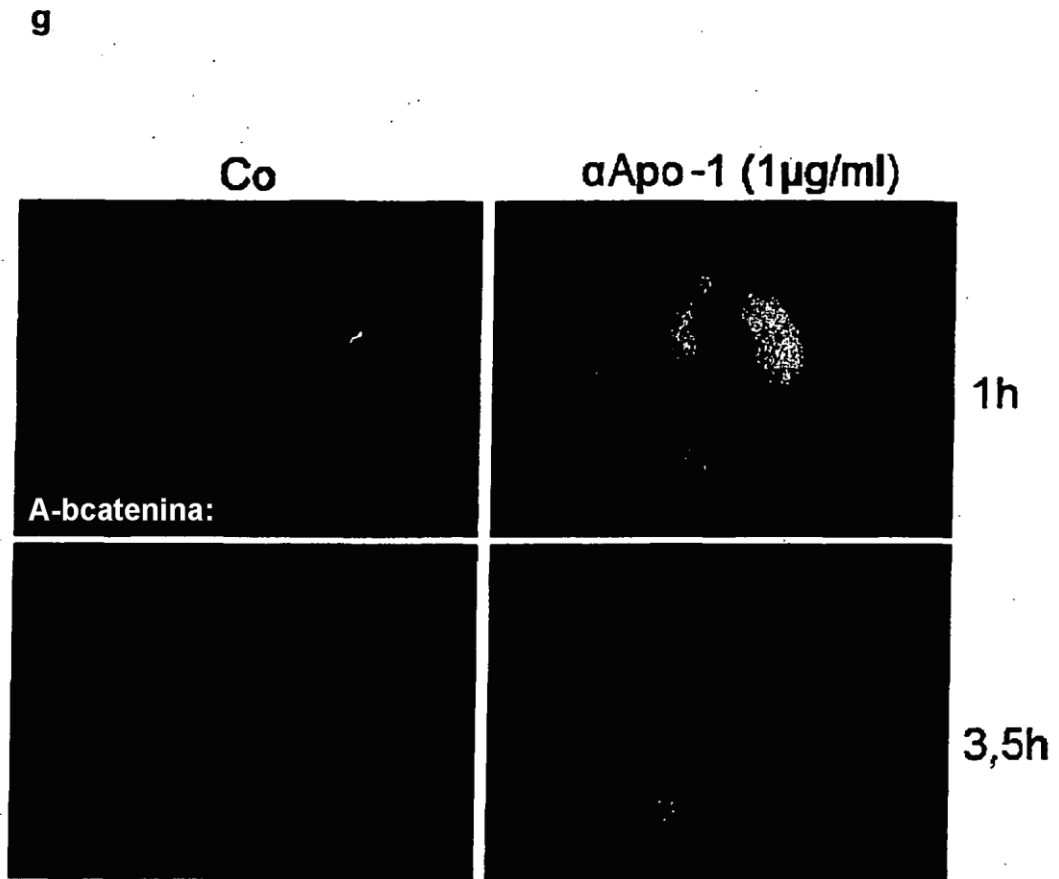
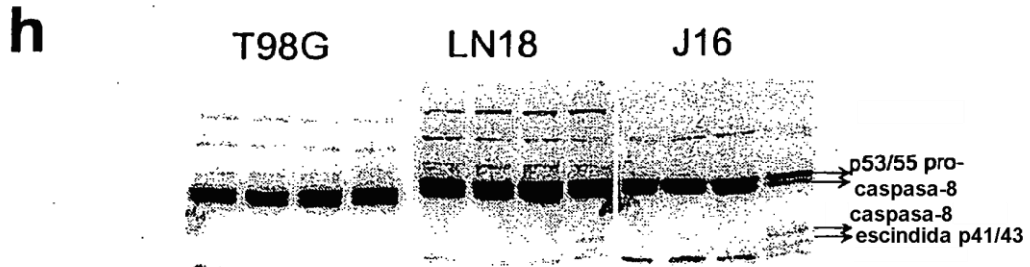




Figura 3 (continuación)



$\alpha$ APO-1 (5 $\mu$ g/ml)	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
LZ-CD95L (25ng/ml)	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
LZ-CD95L (5mg/ml)	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+

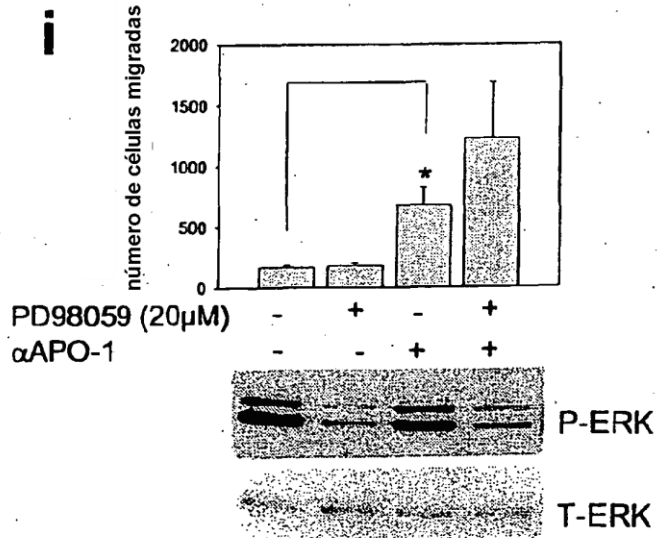


Figura 4

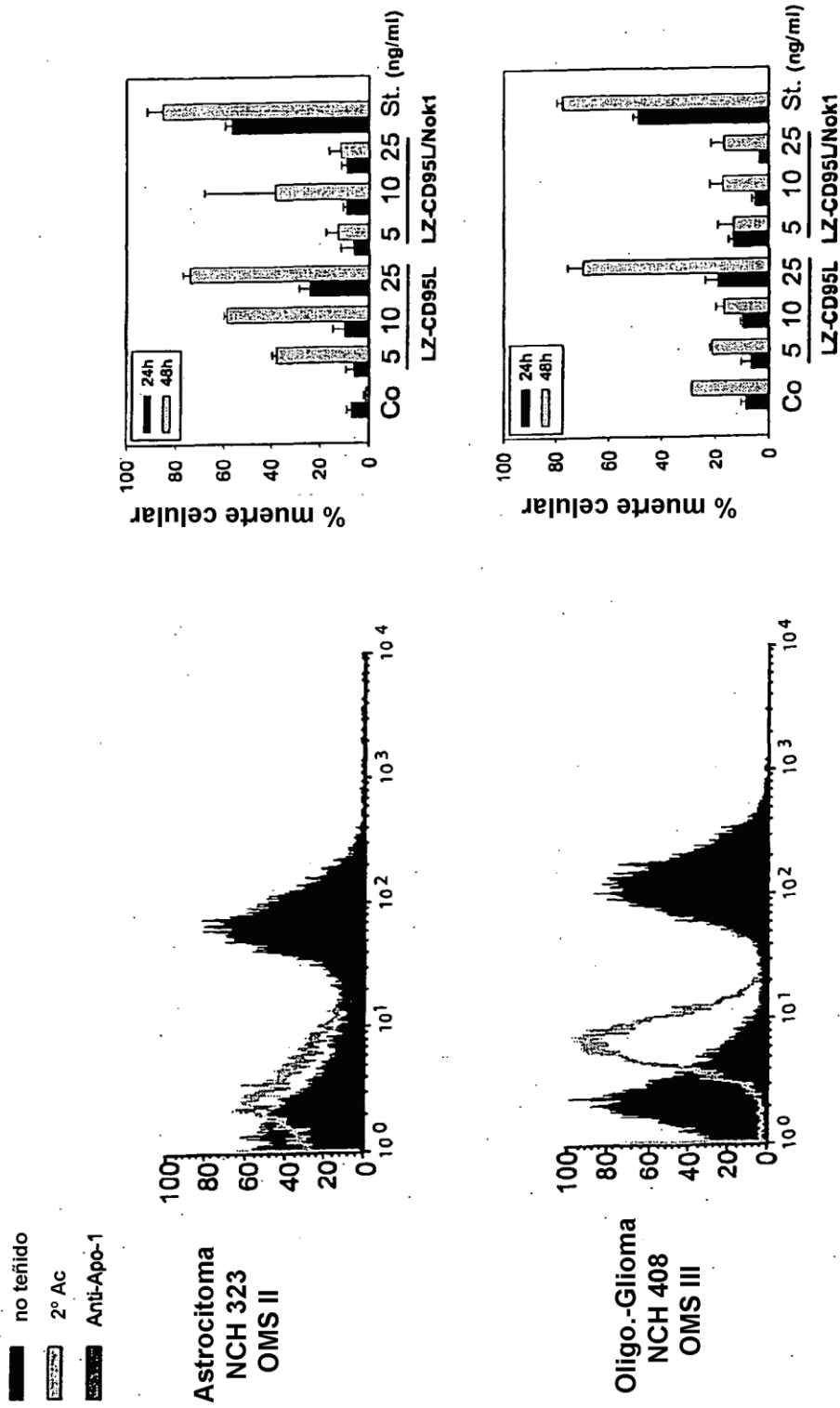


Figura 5

**a**

■ no teñido  
 ▨ isotipo  
 ▩ αAPO-1

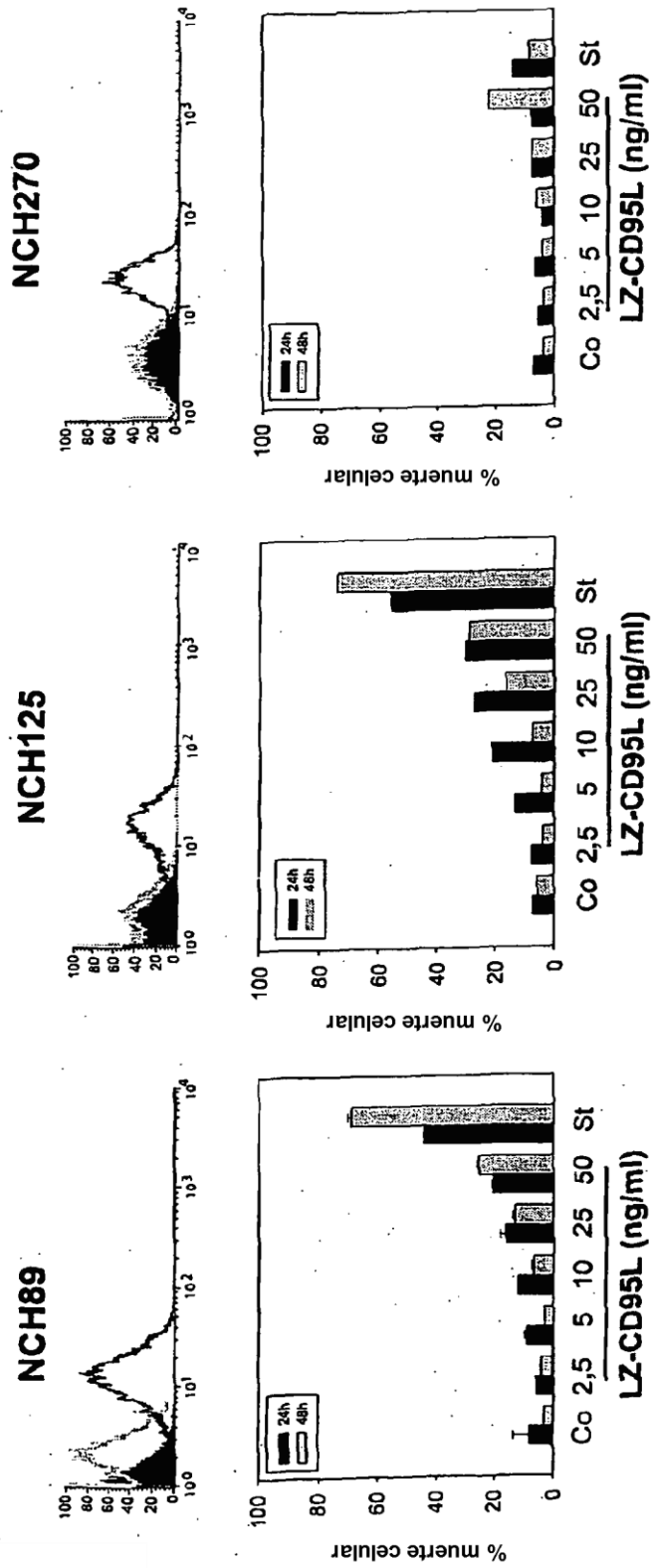


Figura 5 (continuación)

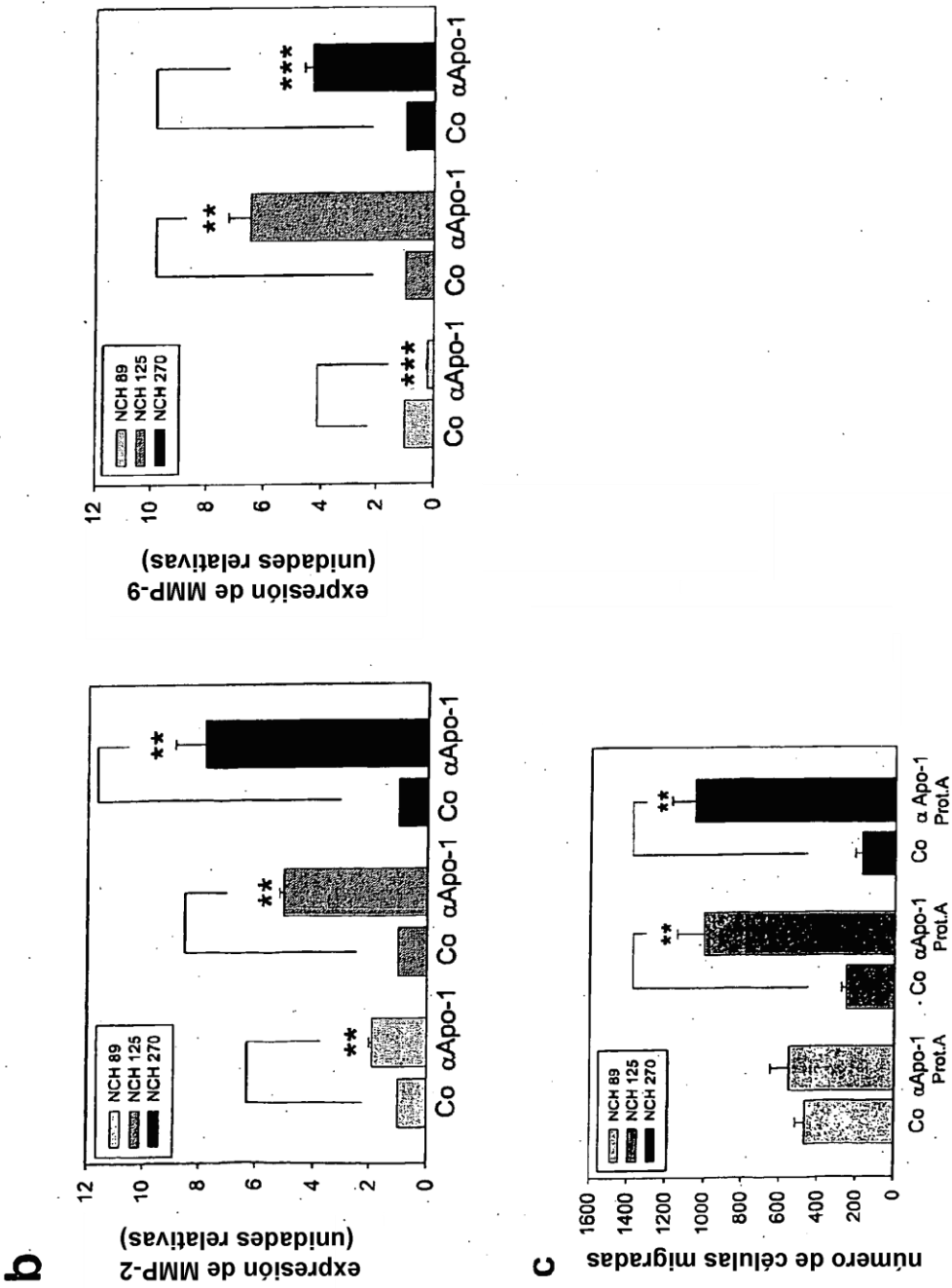


Figura 6

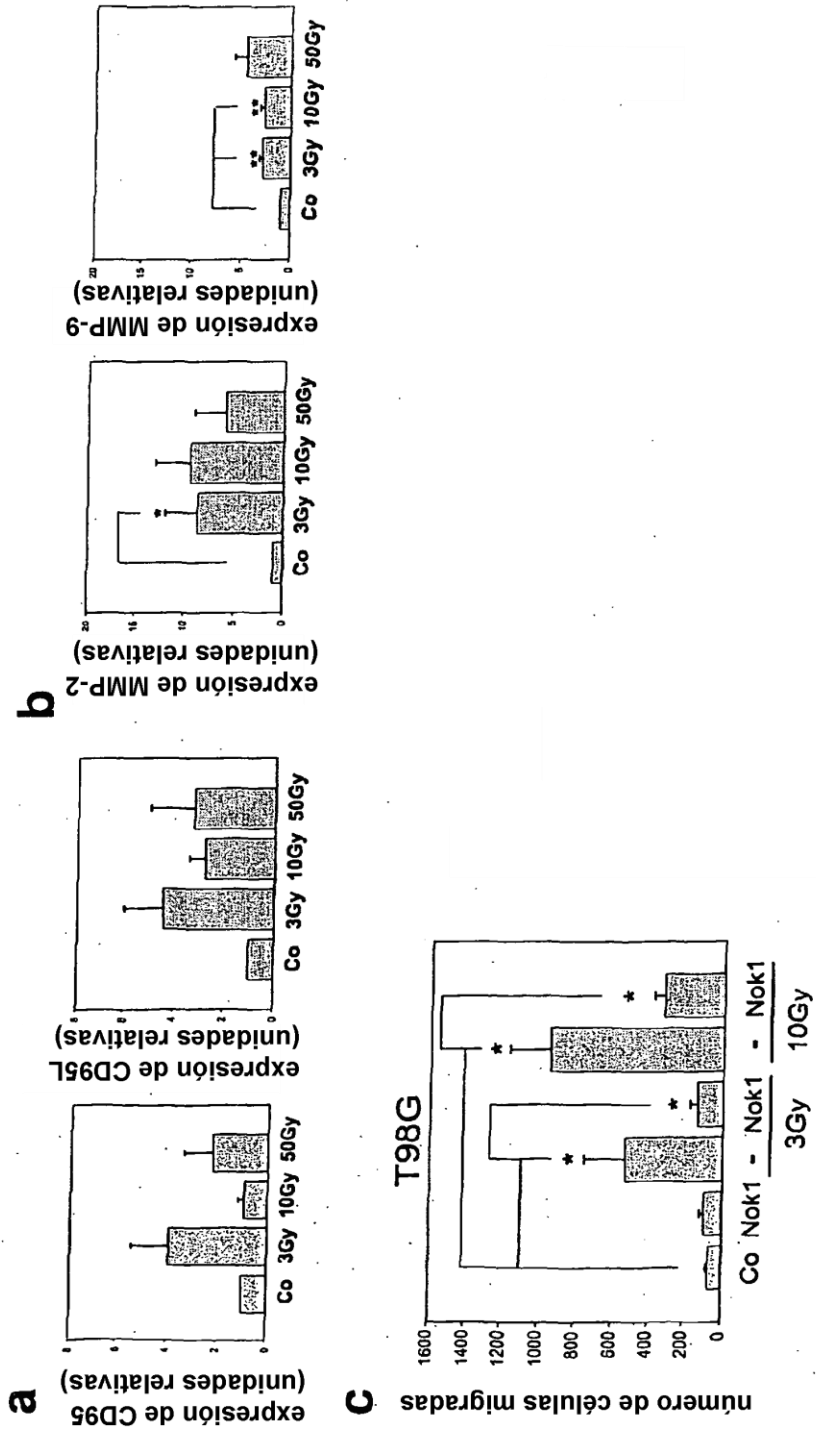


Figura 6 (continuación)

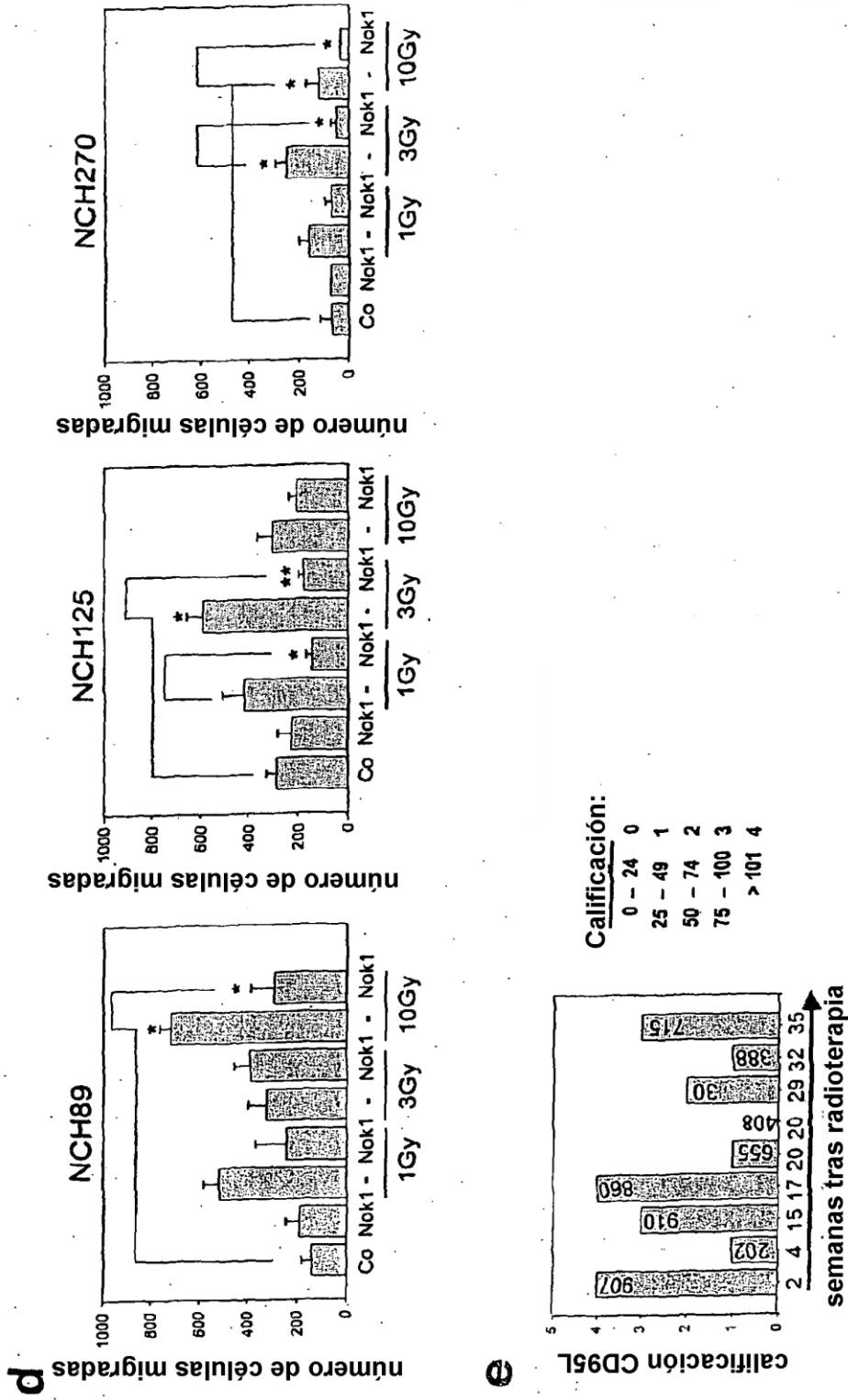


Figura 6 (continuación)

f

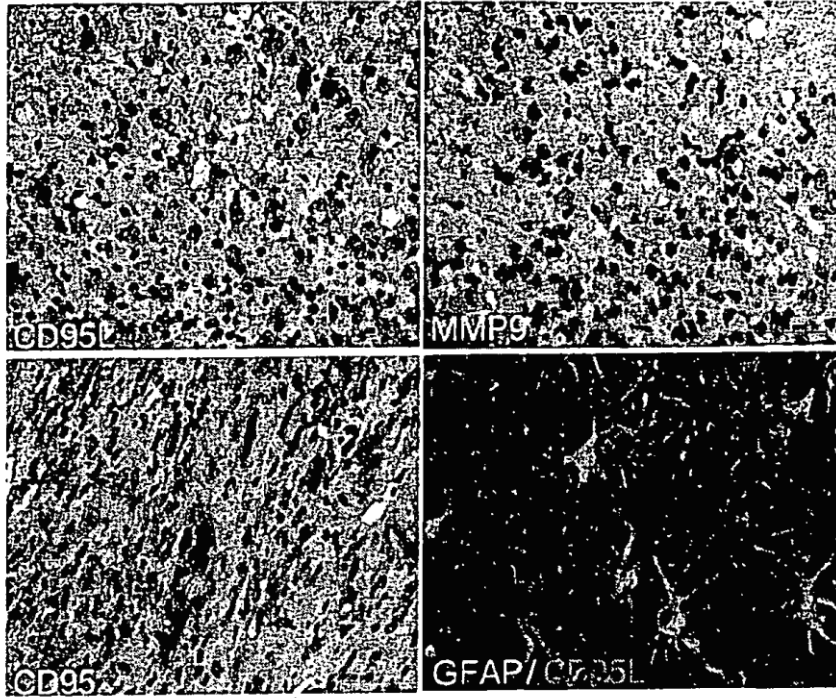


Figura 7

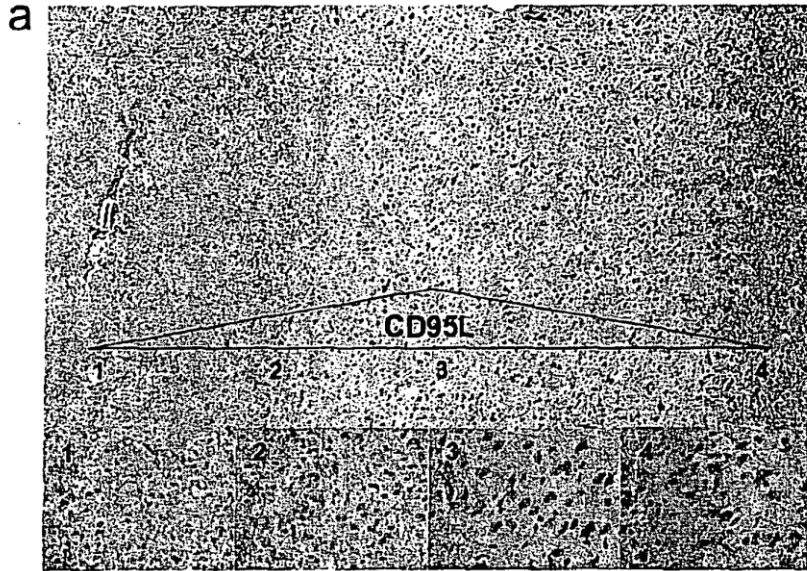




Figura 7 (continuación)

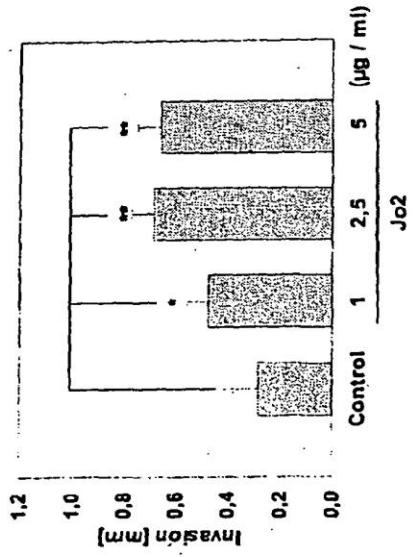
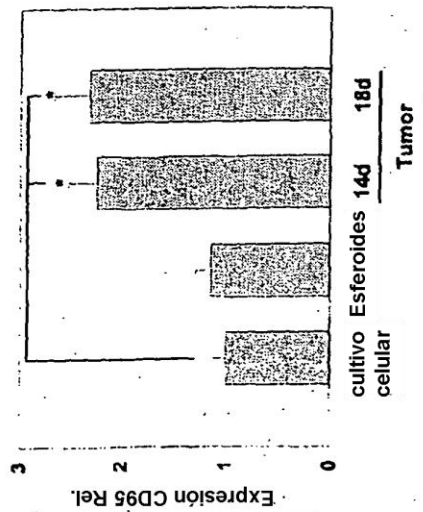
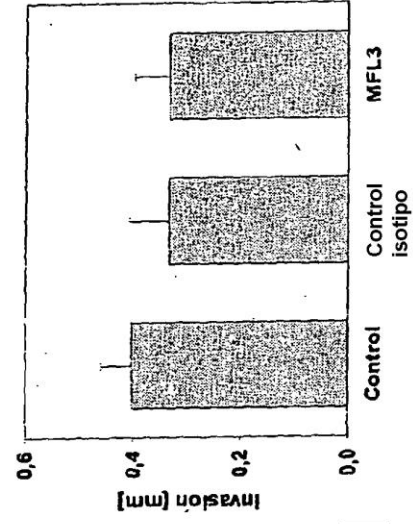
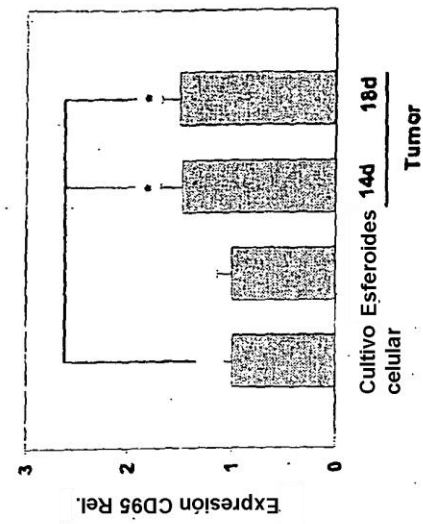
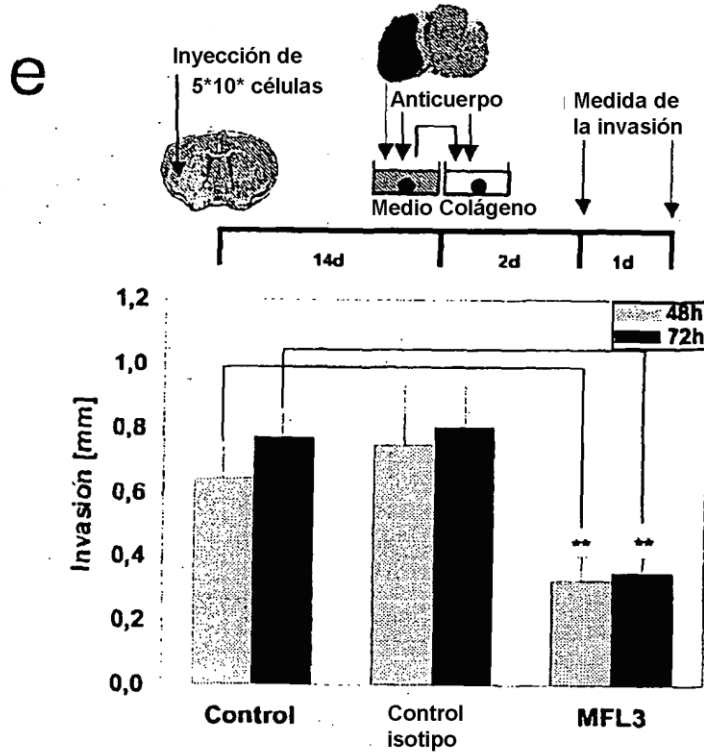


Figura 7 (continuación)



**f**

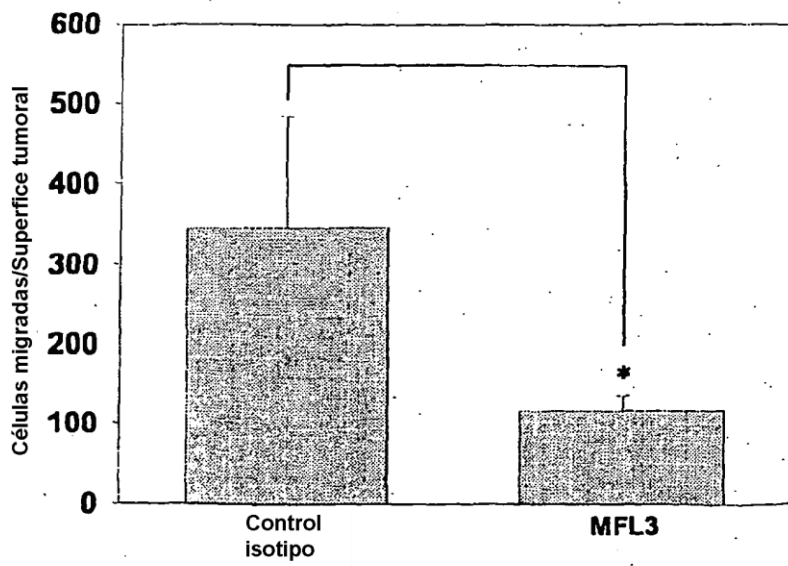


Figura 8

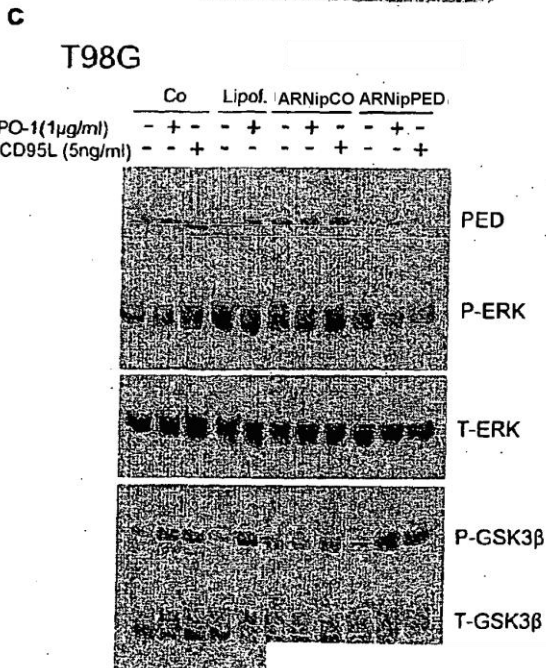
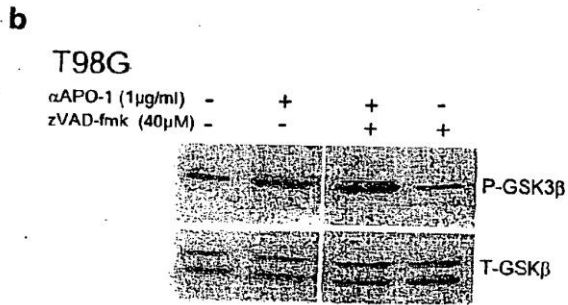
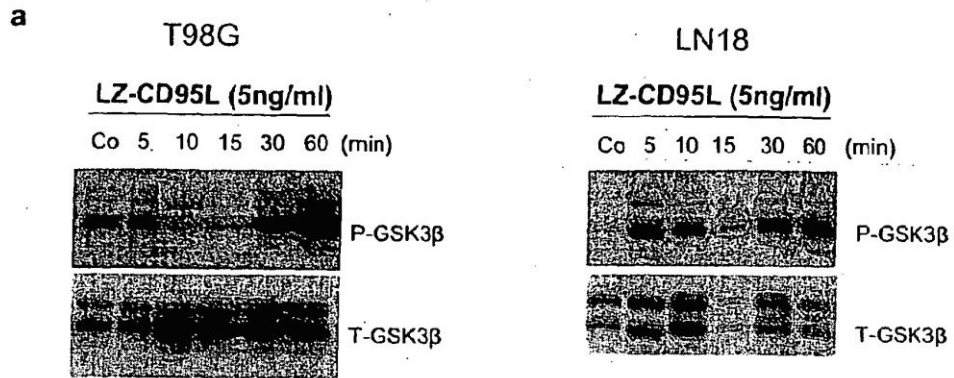


Figura 9

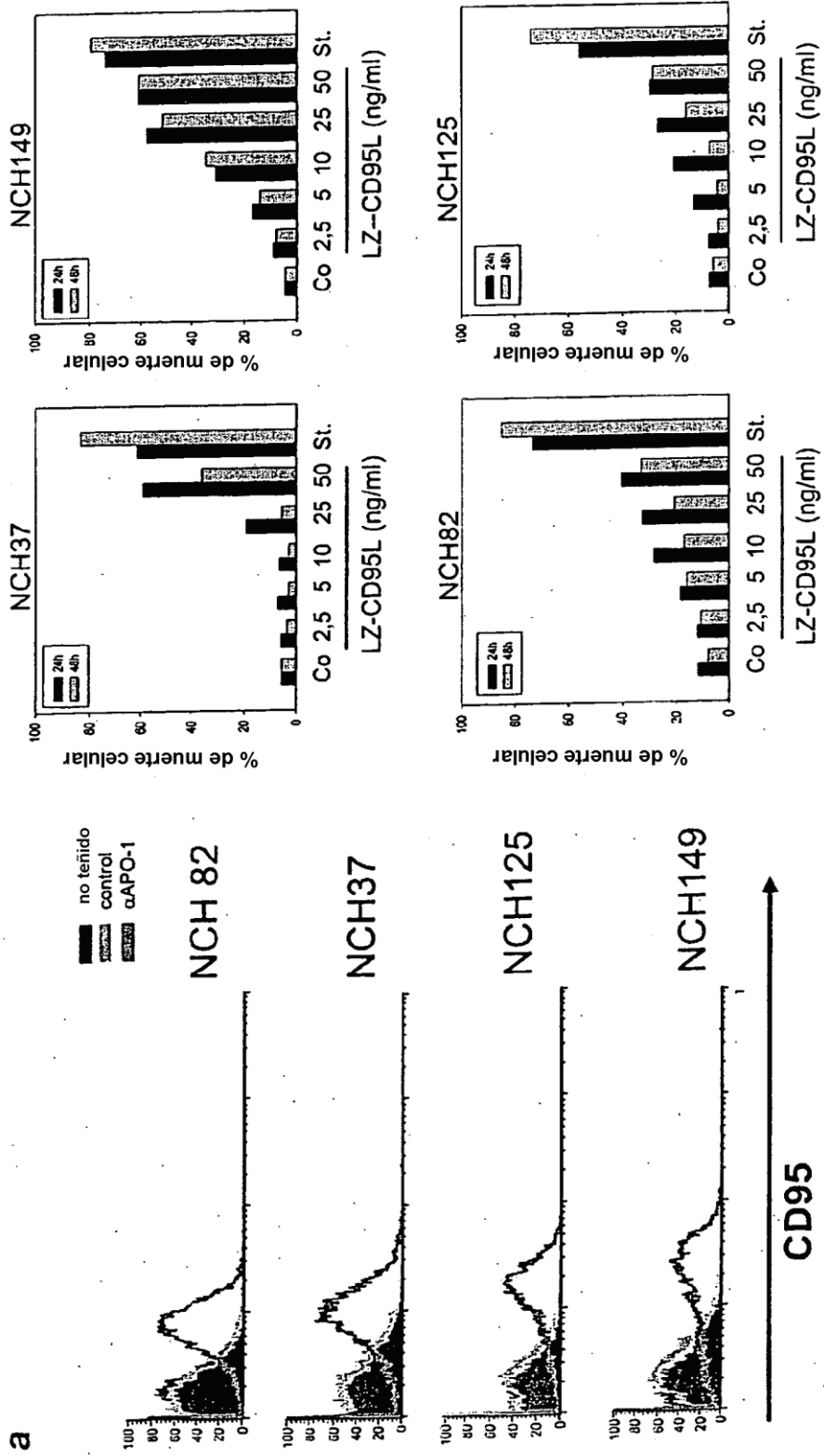


Figura 9 (continuación)

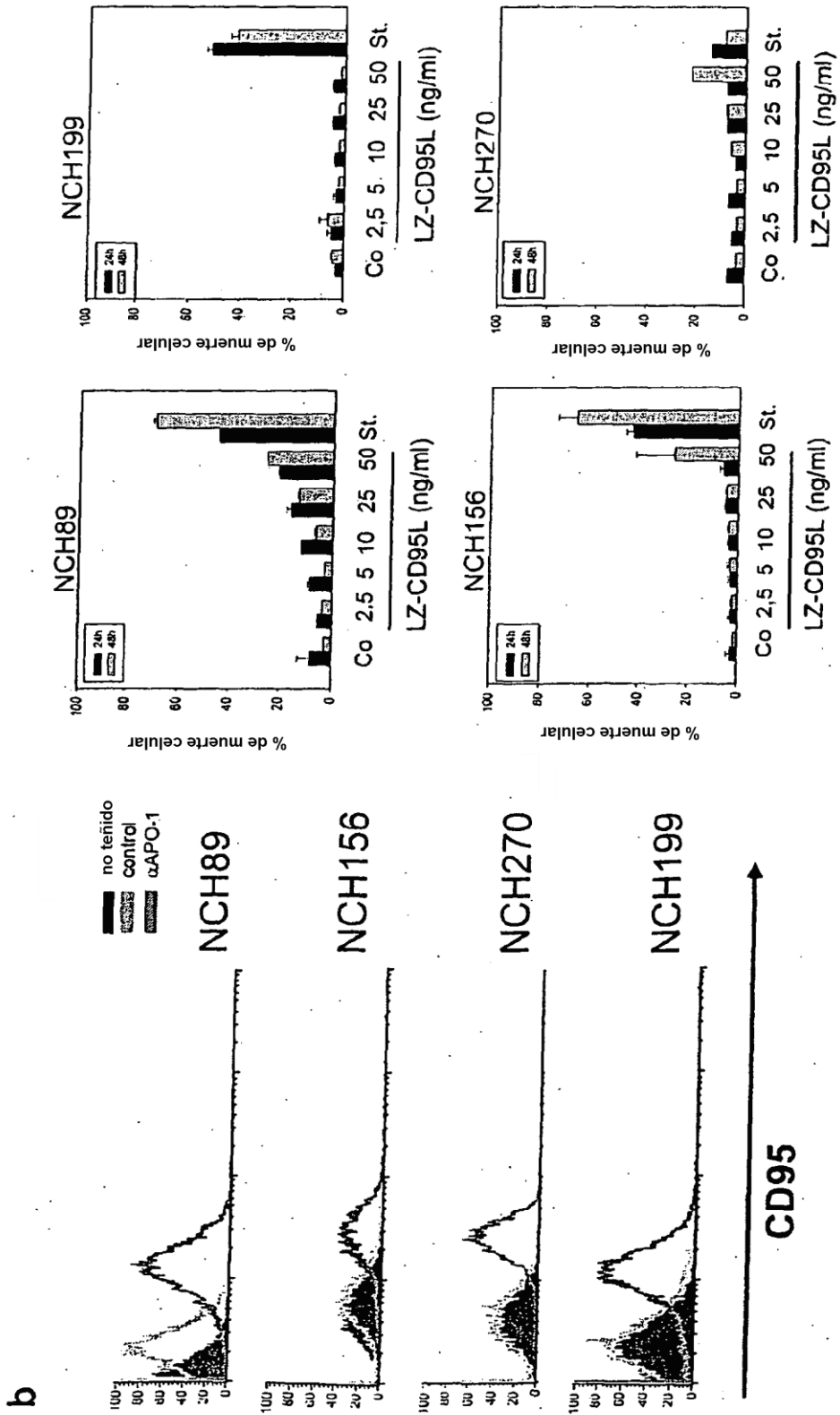


Figura 9 (continuación)

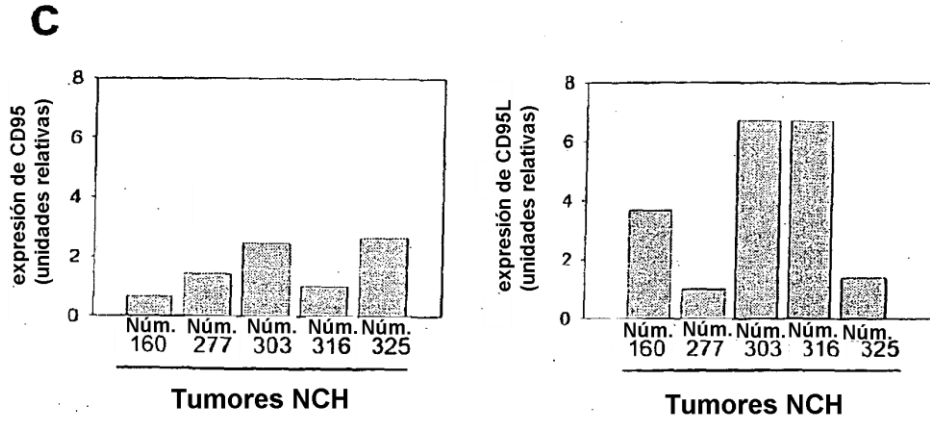


Figura 10

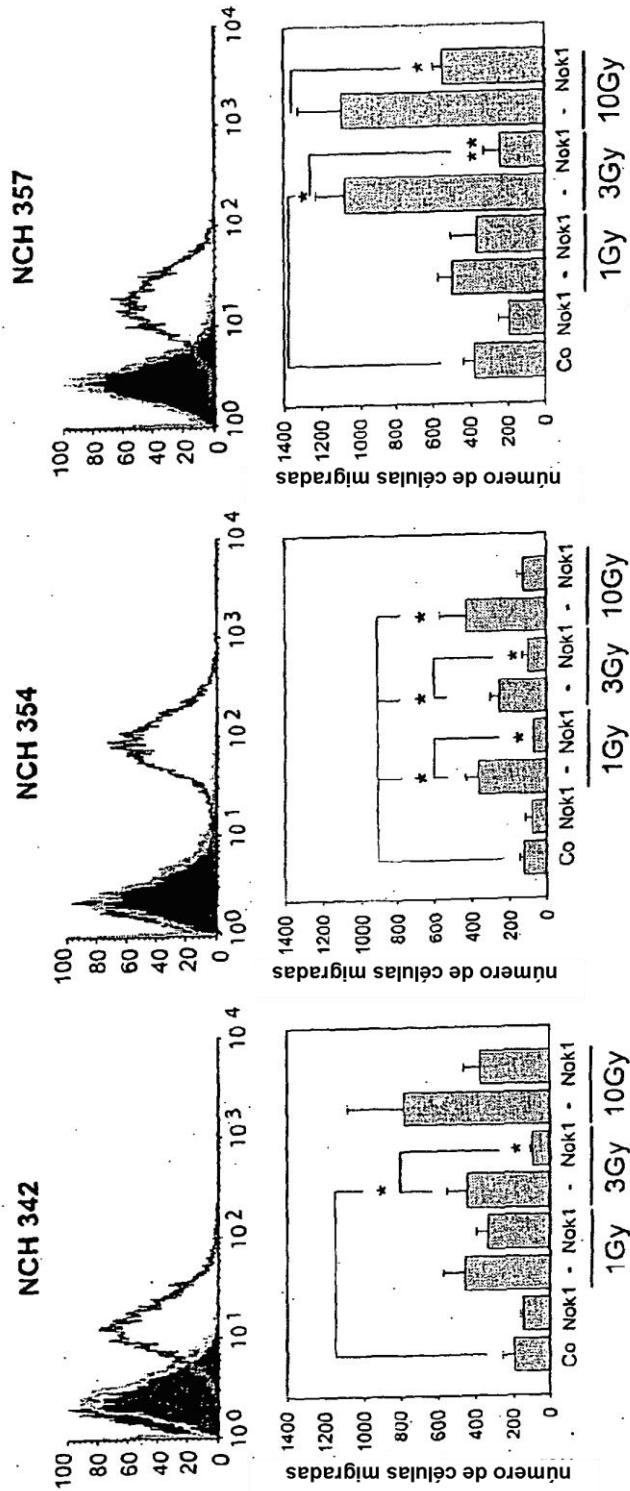


Figura 10 (continuación)

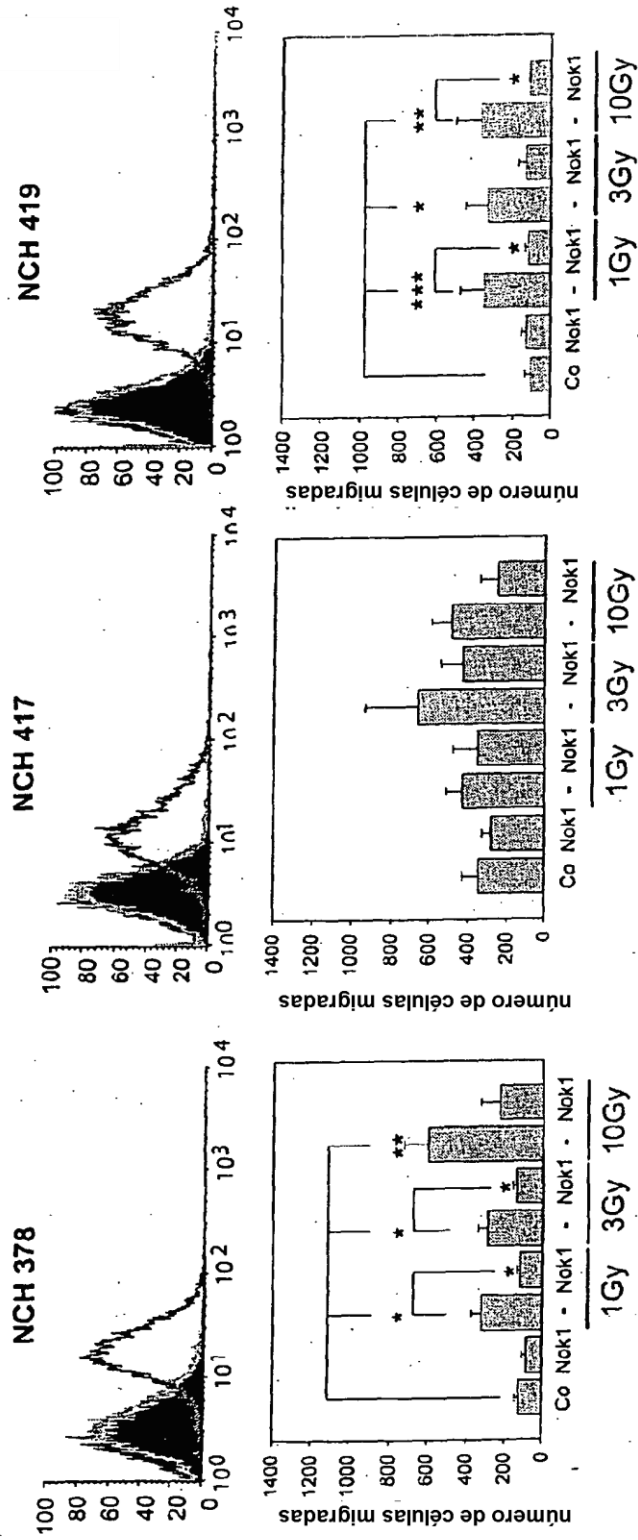




Figura 10 (continuación)

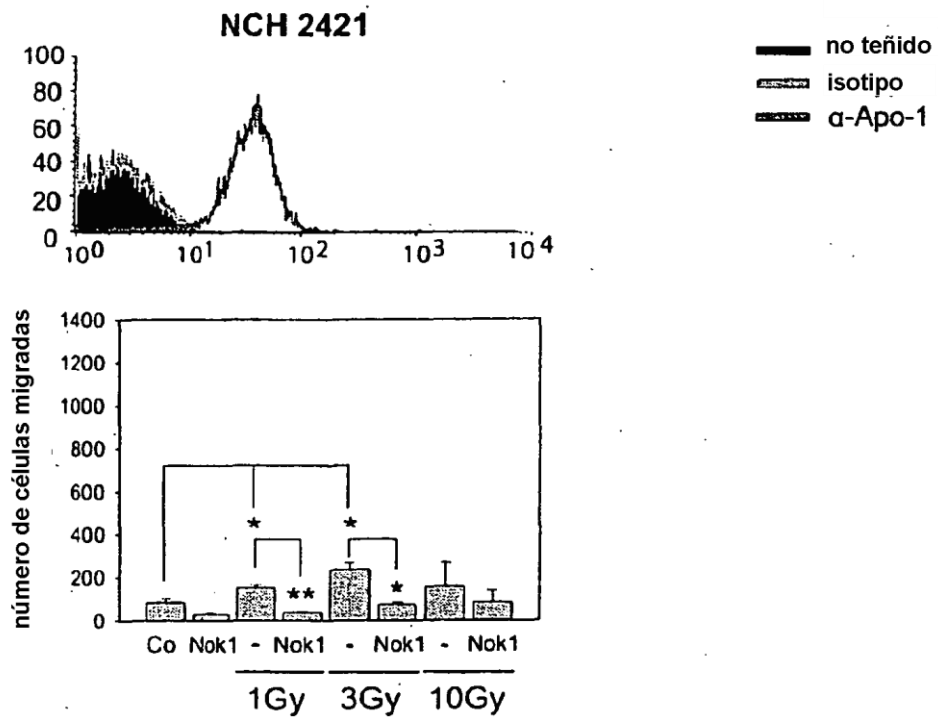
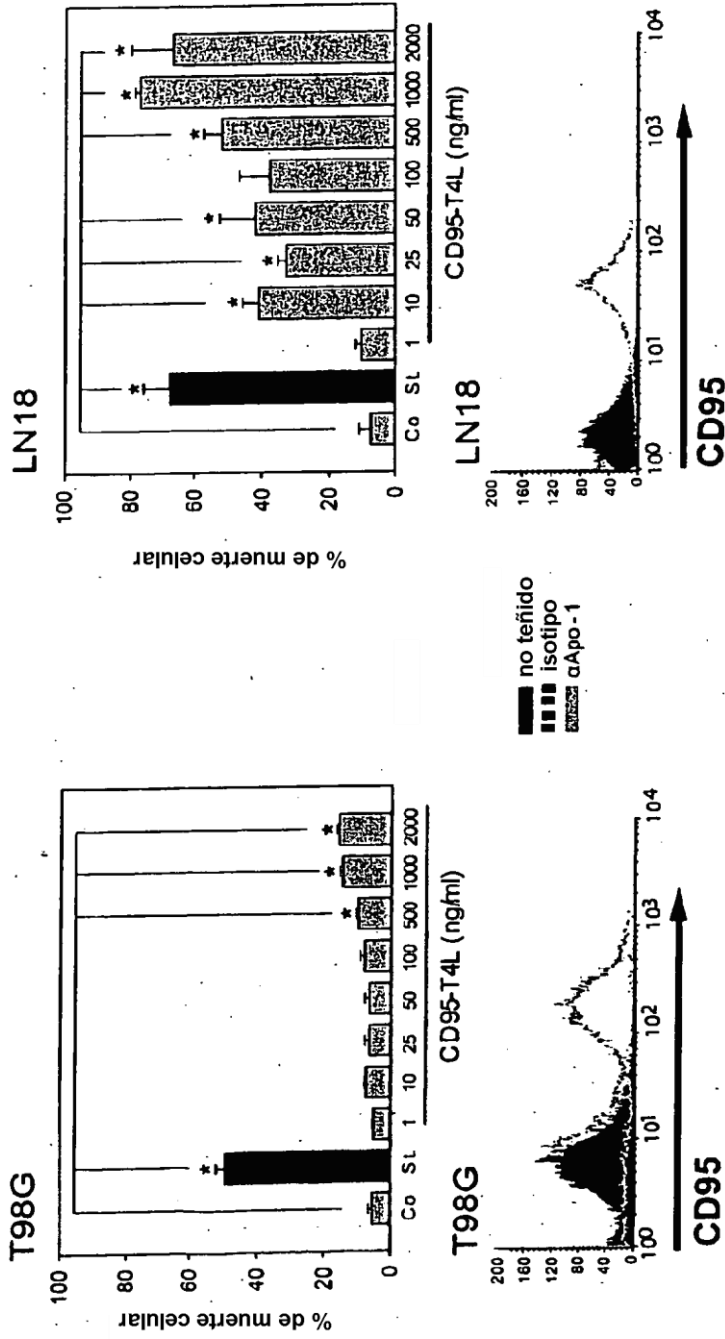
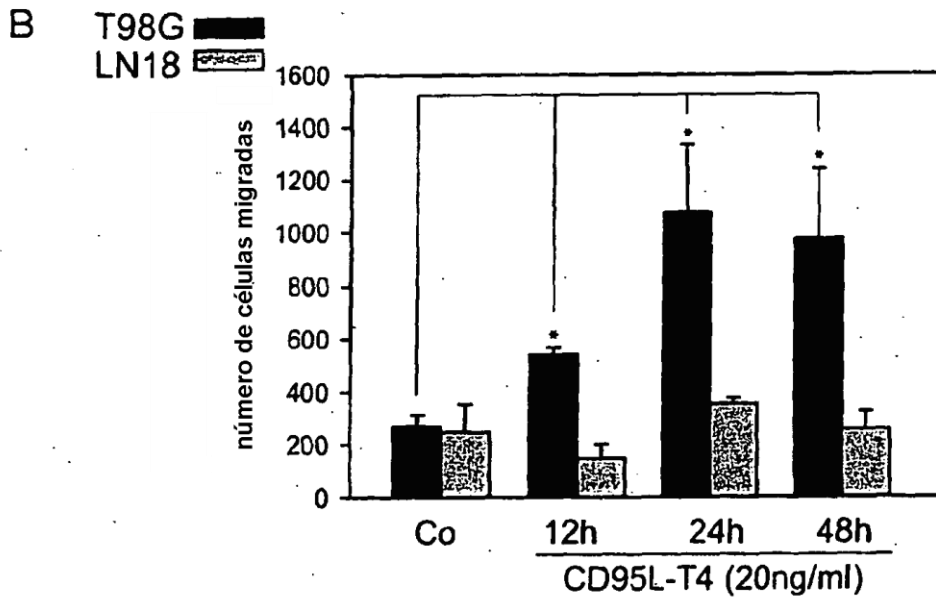


Figura 11



A

Figura 11 (continuación)



**C**

T98G

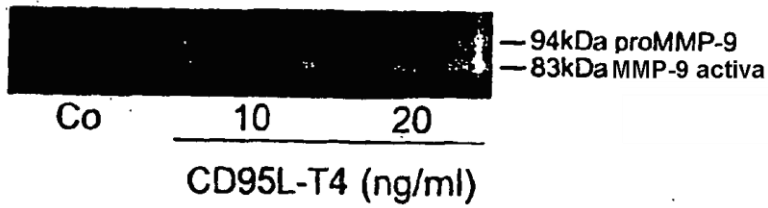


Figura 11 (continuación)

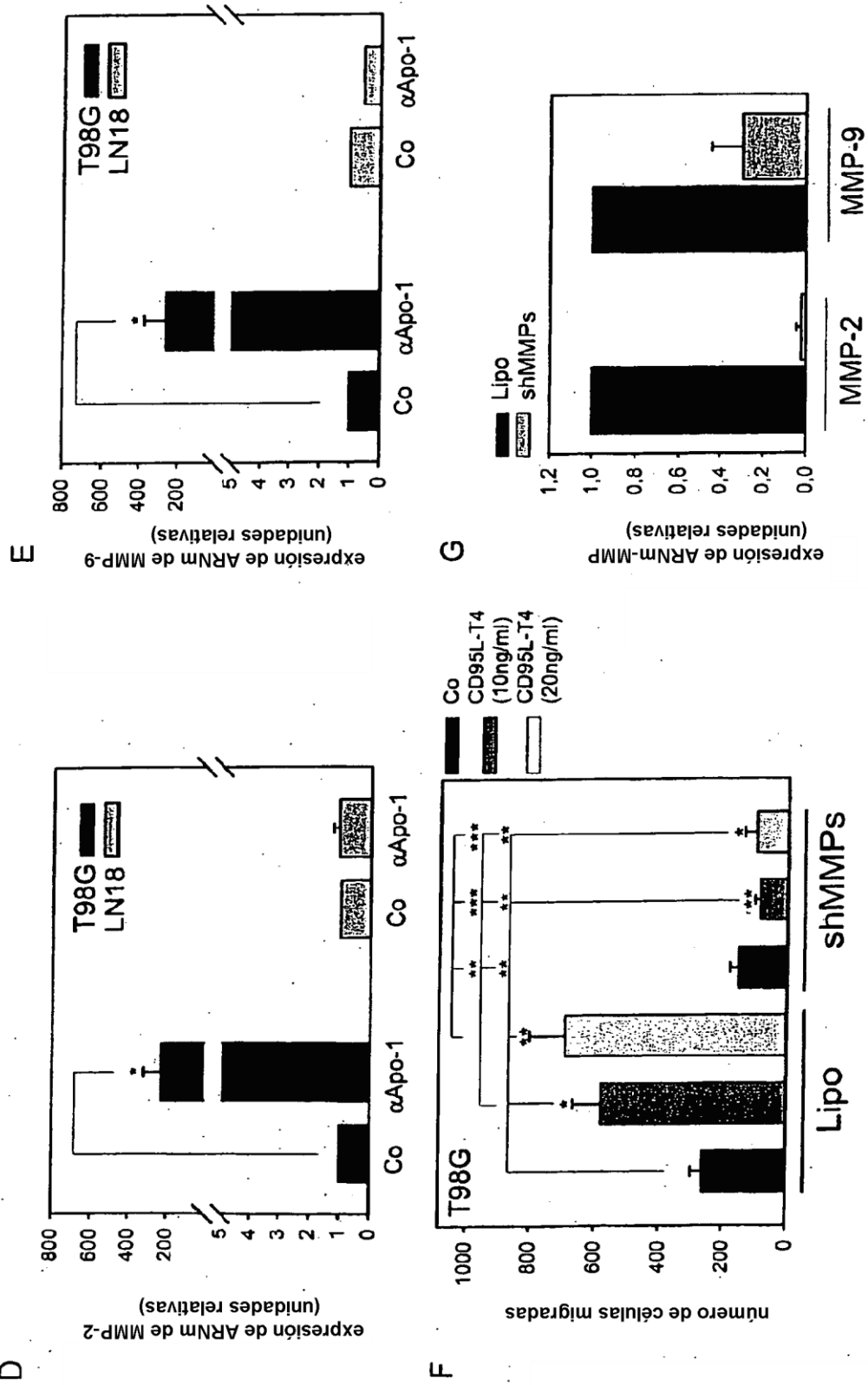


Figura 12

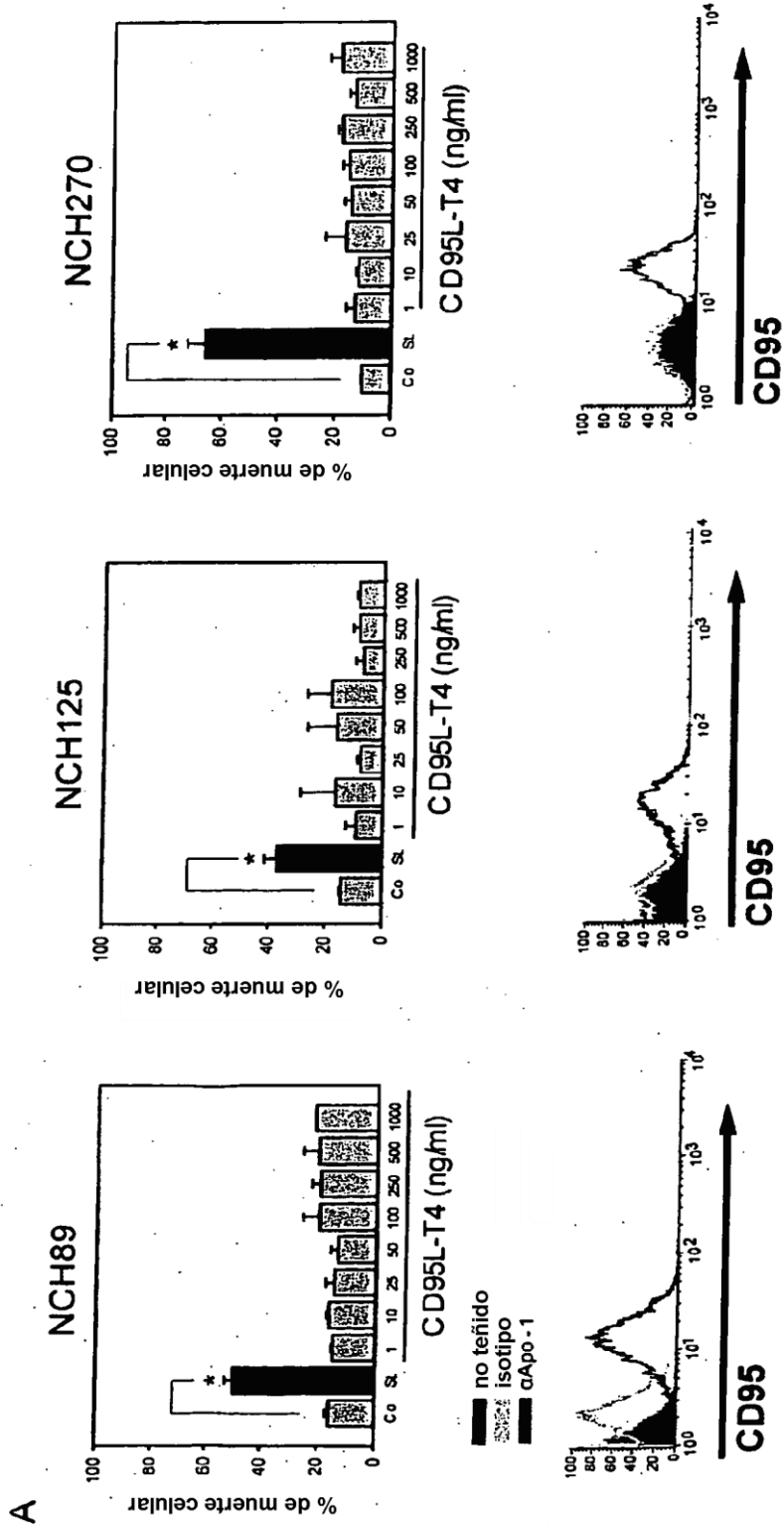


Figura 12 (continuación)

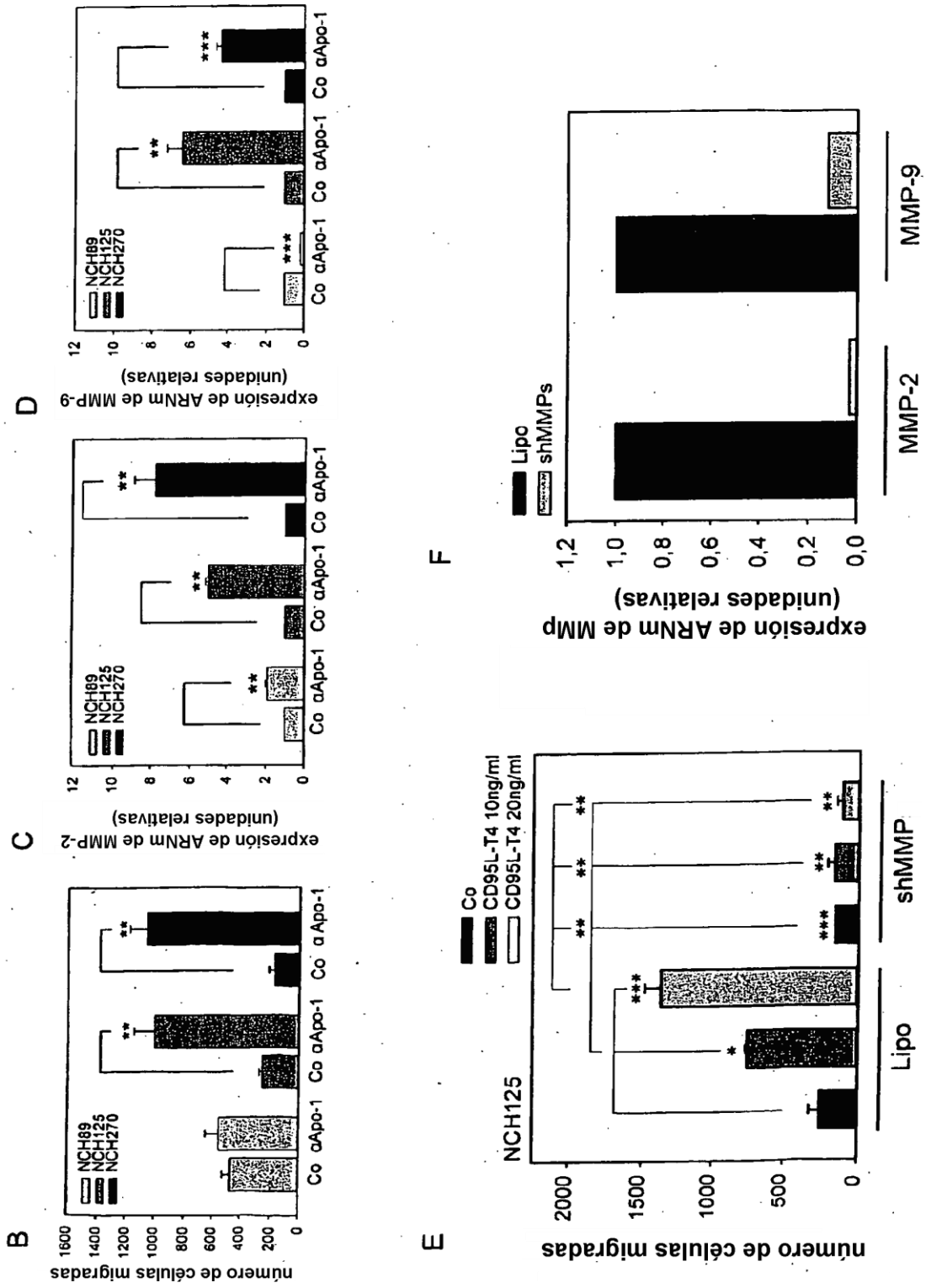


Figura 13

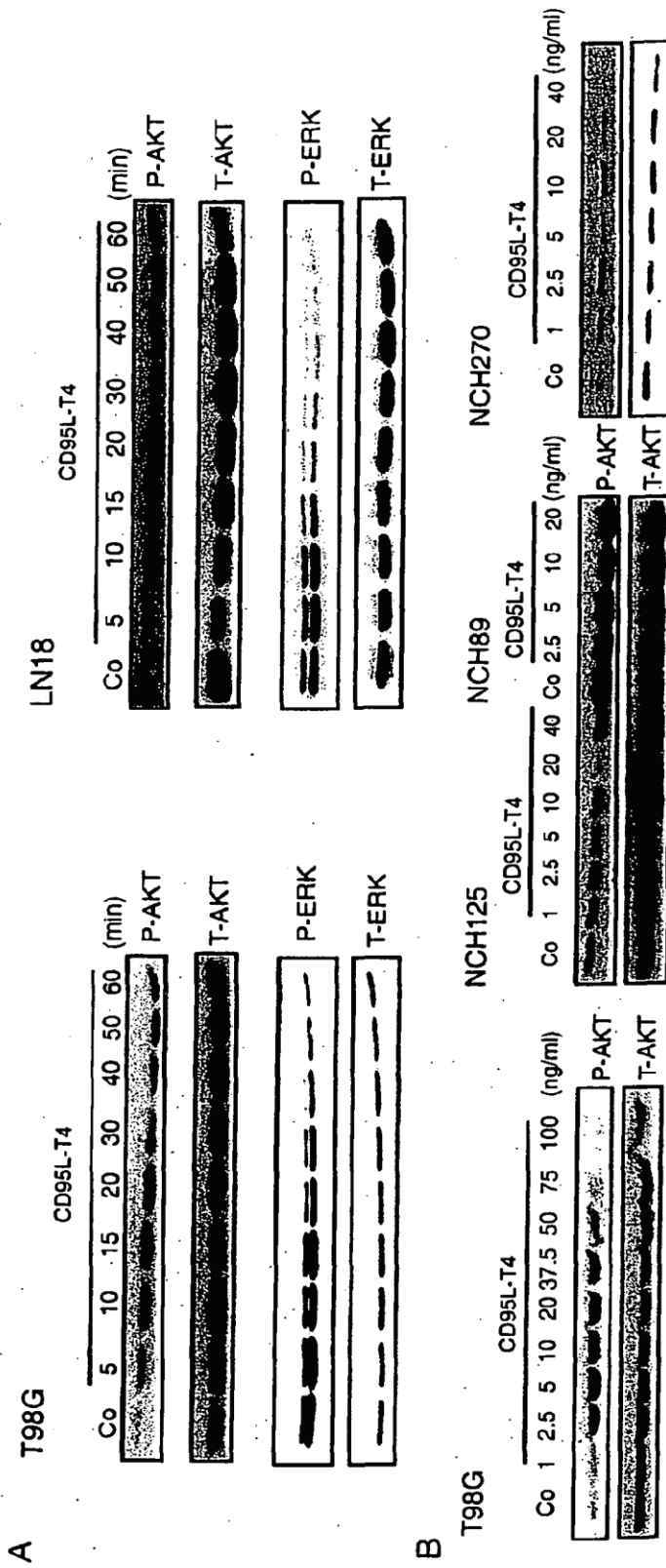


Figura 13 (continuación)

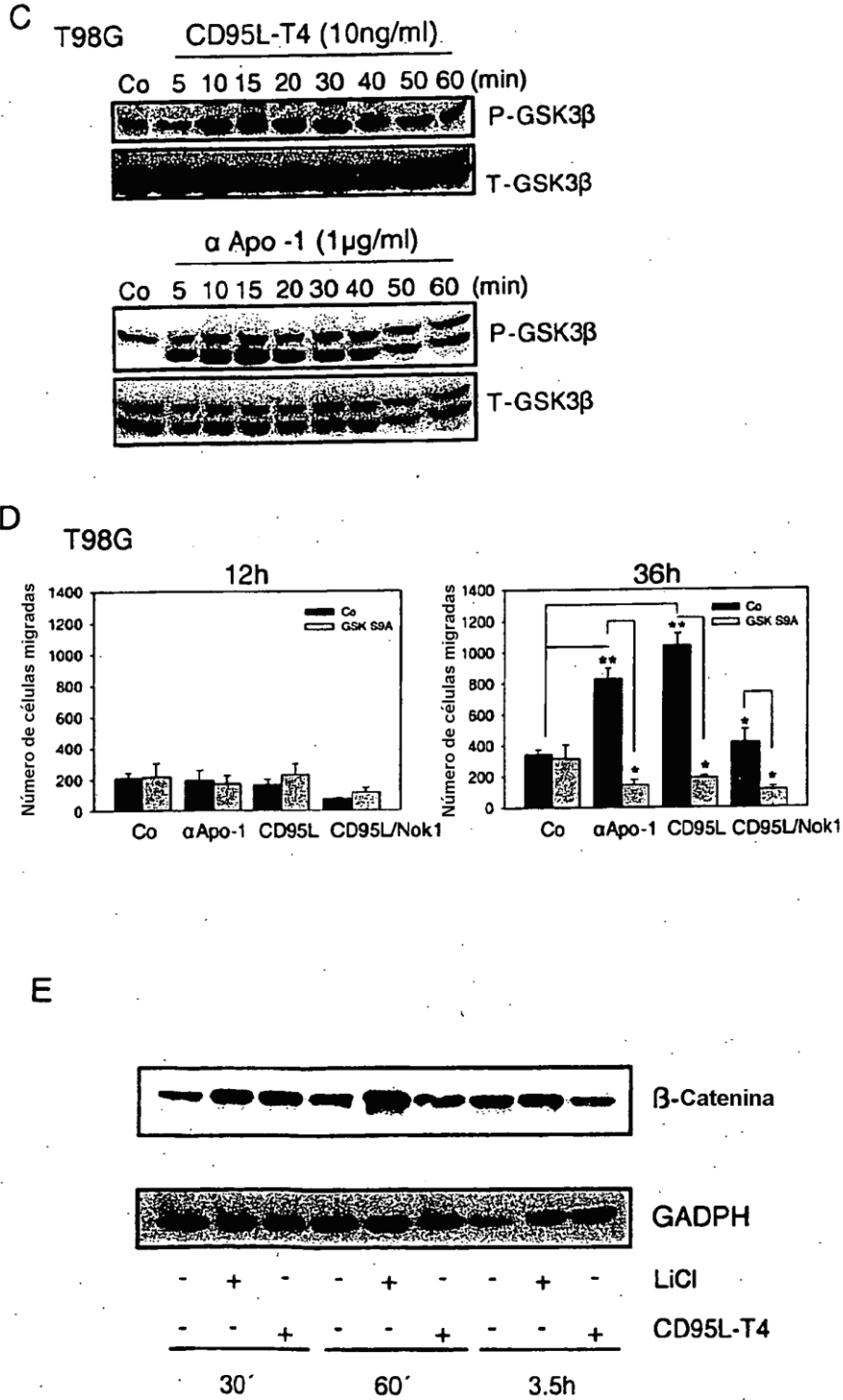




Figura 13 (continuación)

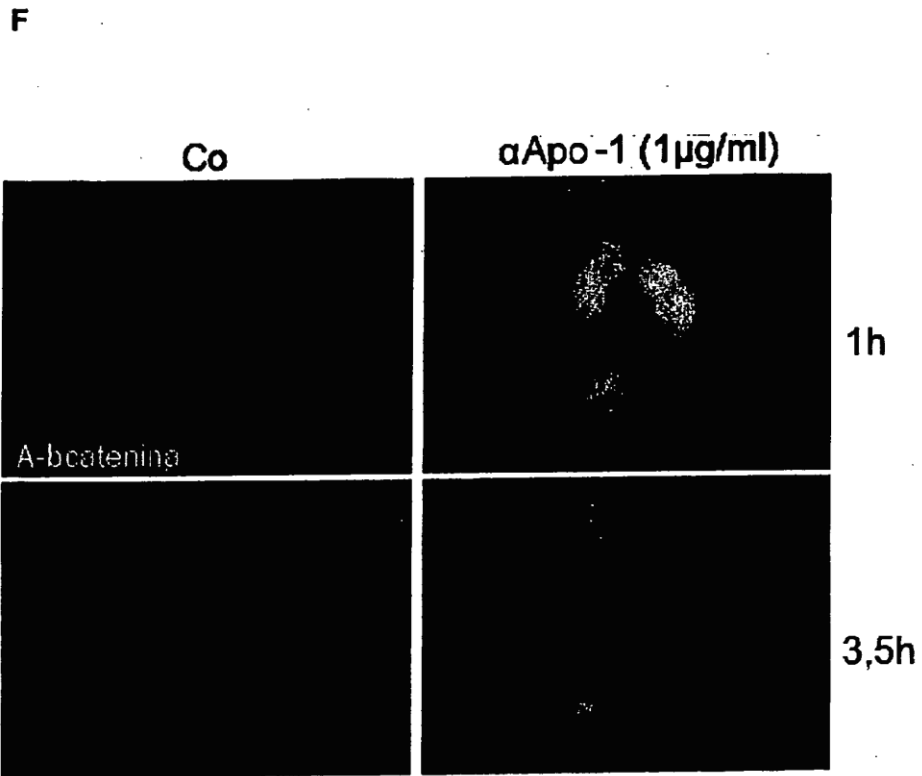


Figura 13 (continuación)

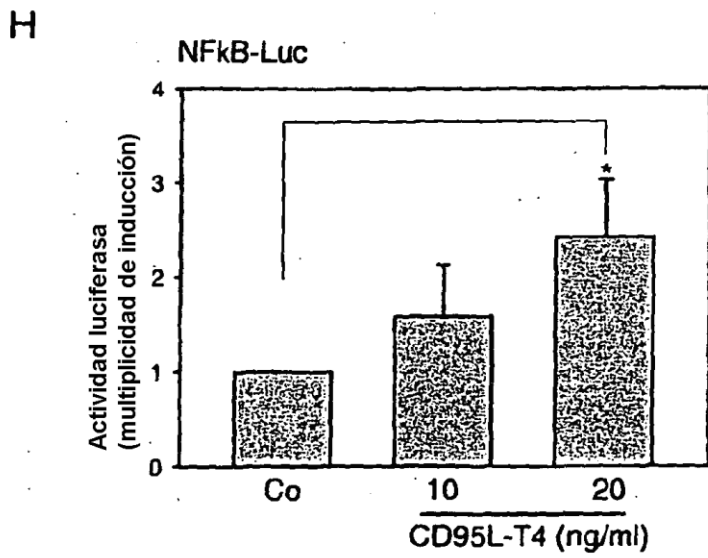
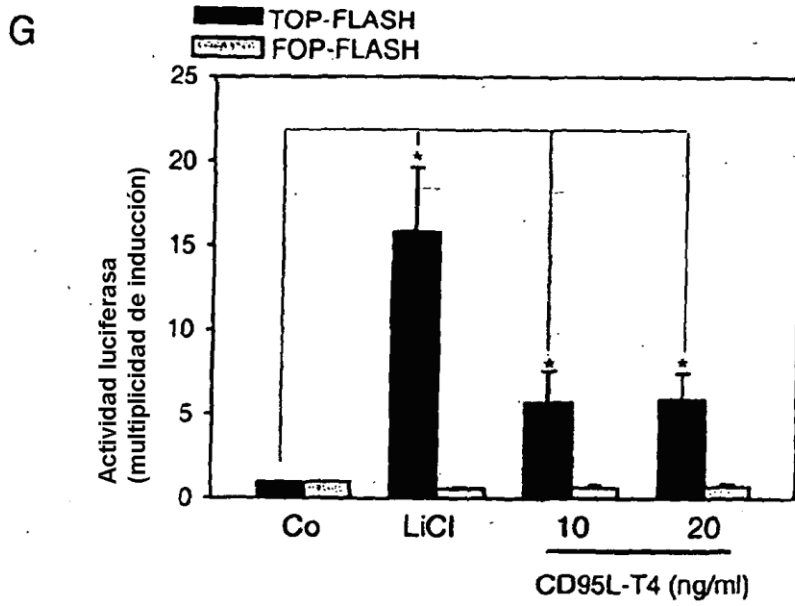


Figura 14

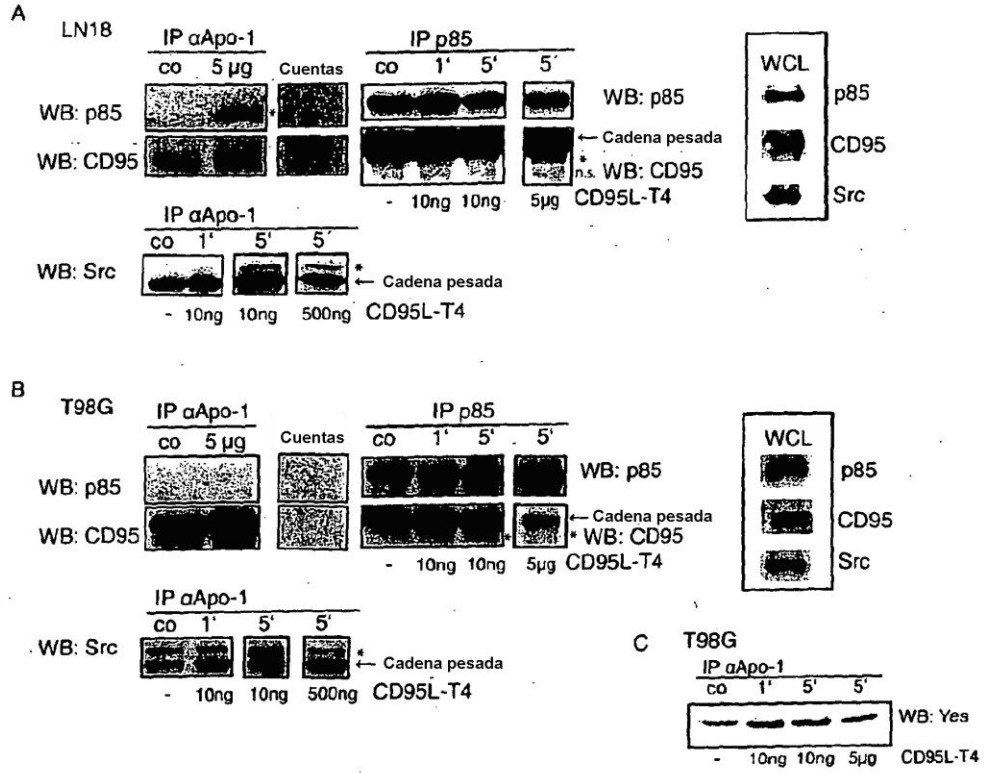
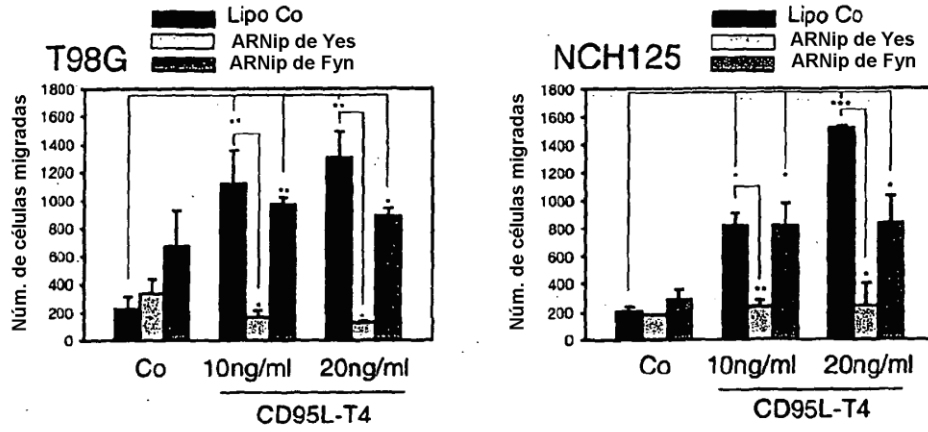


Figura 14 (continuación)

D



E

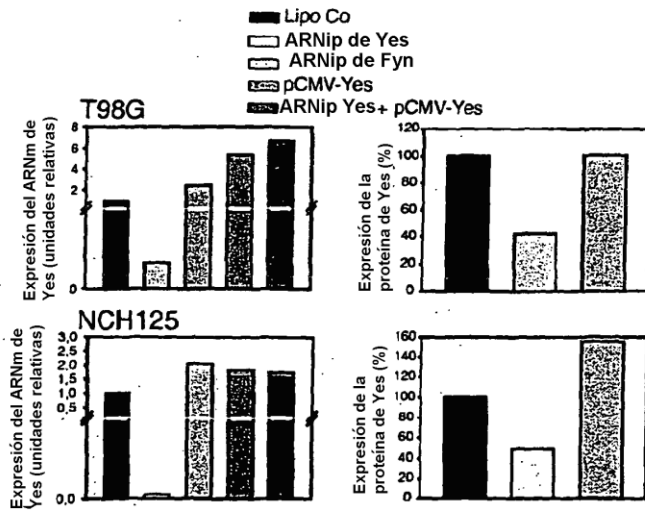
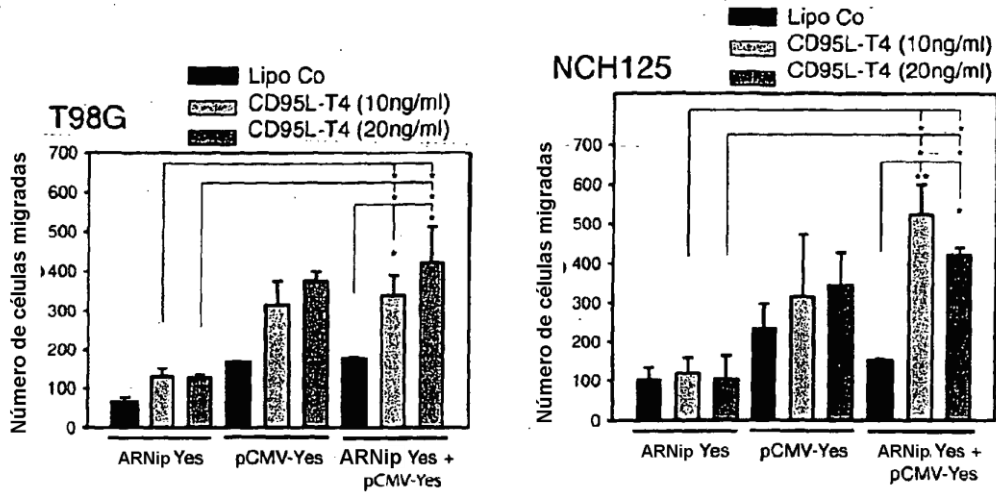


Figura 14 (continuación)

F



G

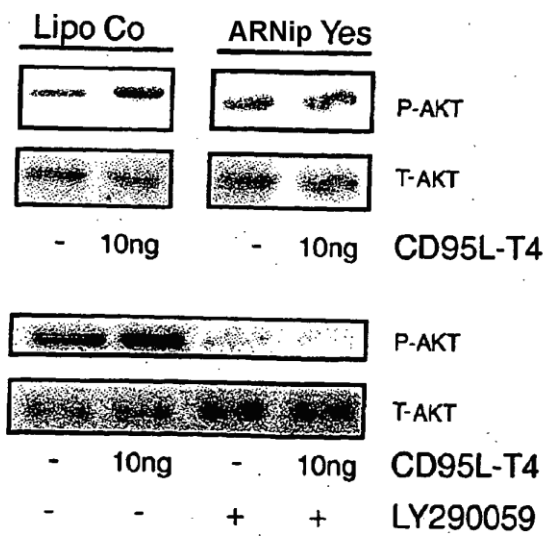


Figura 15

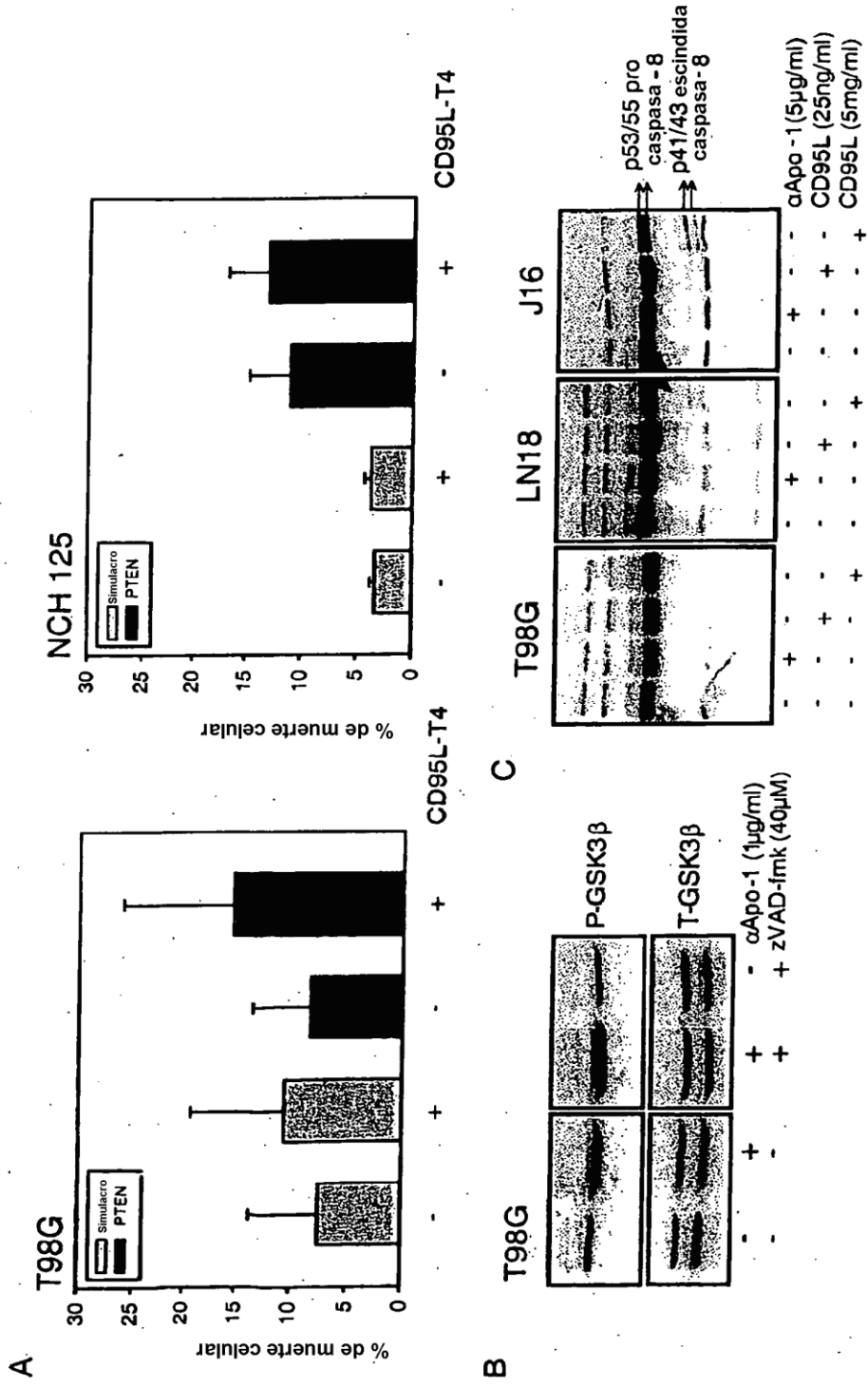


Figura 15 (continuación)

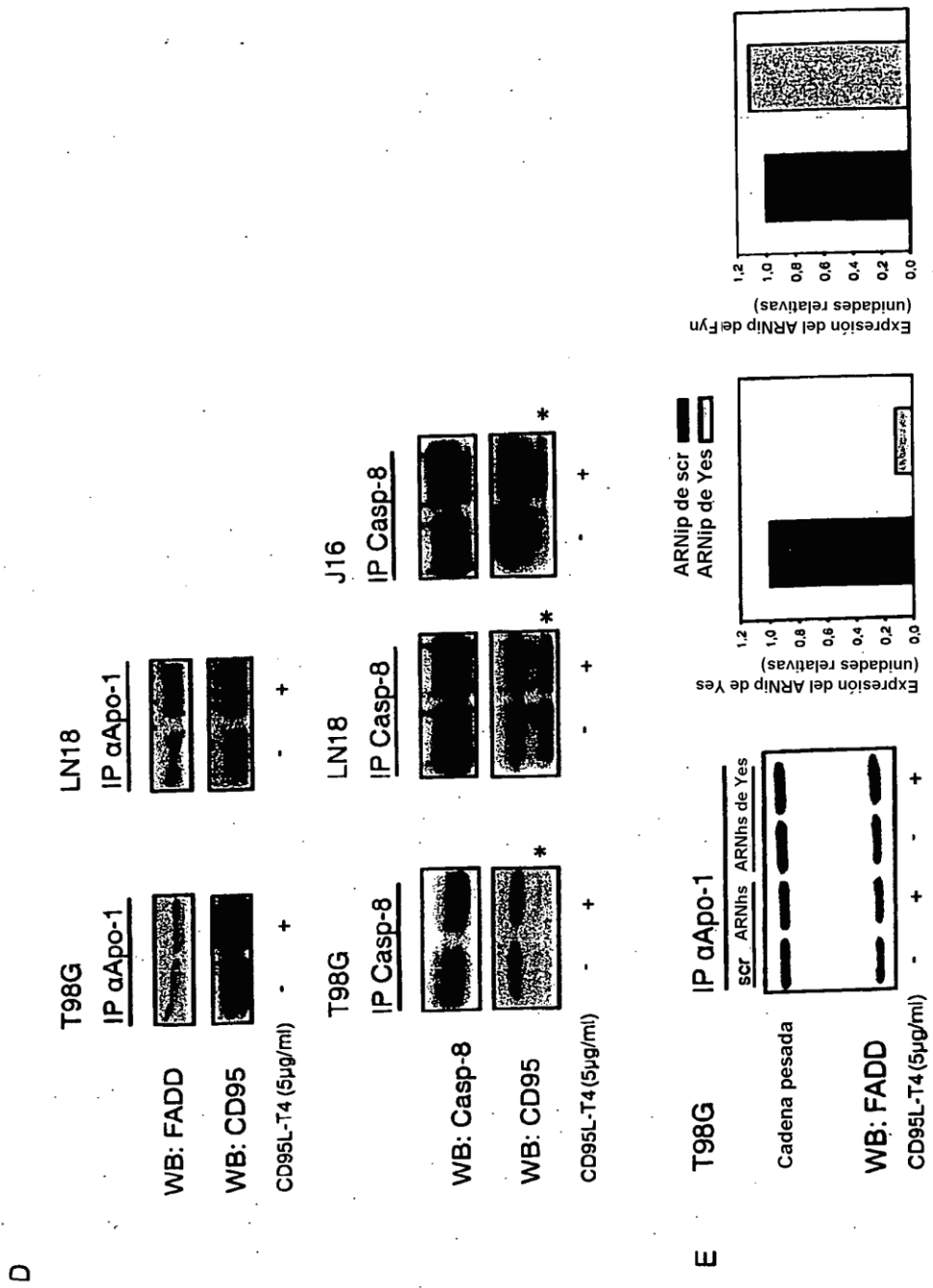


Figura 15 (continuación)

F

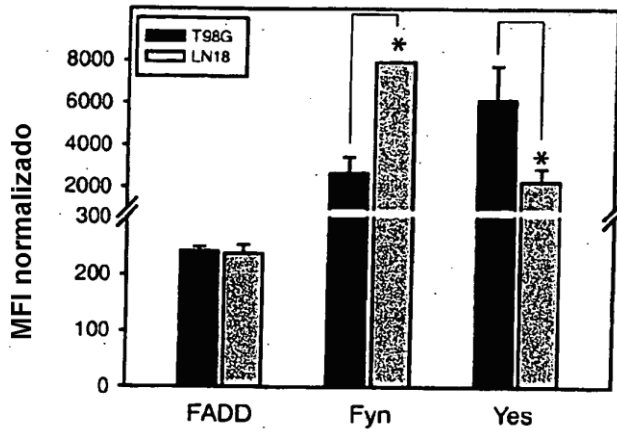


Figura 16

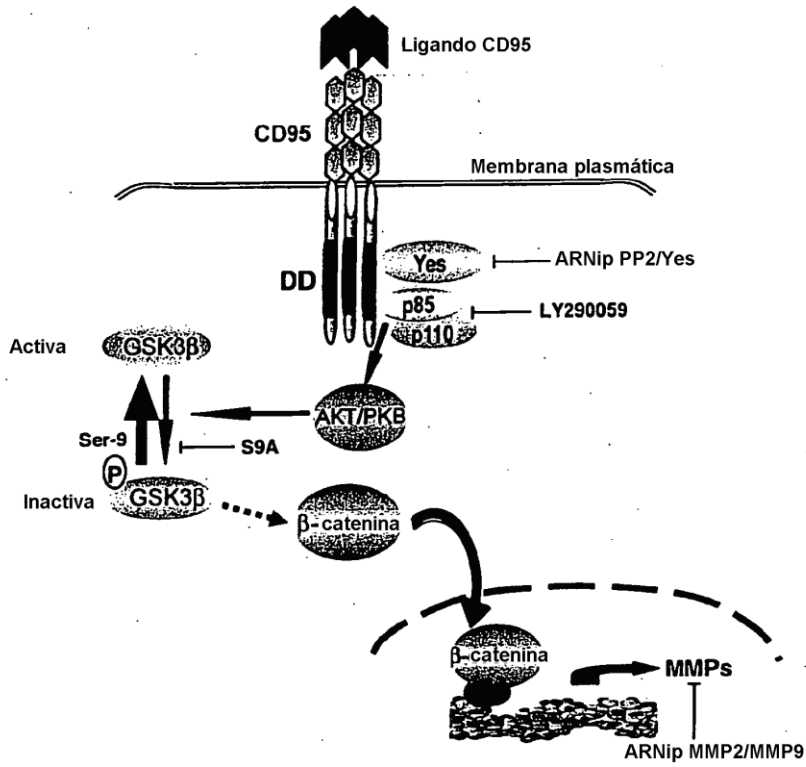




Figura 17

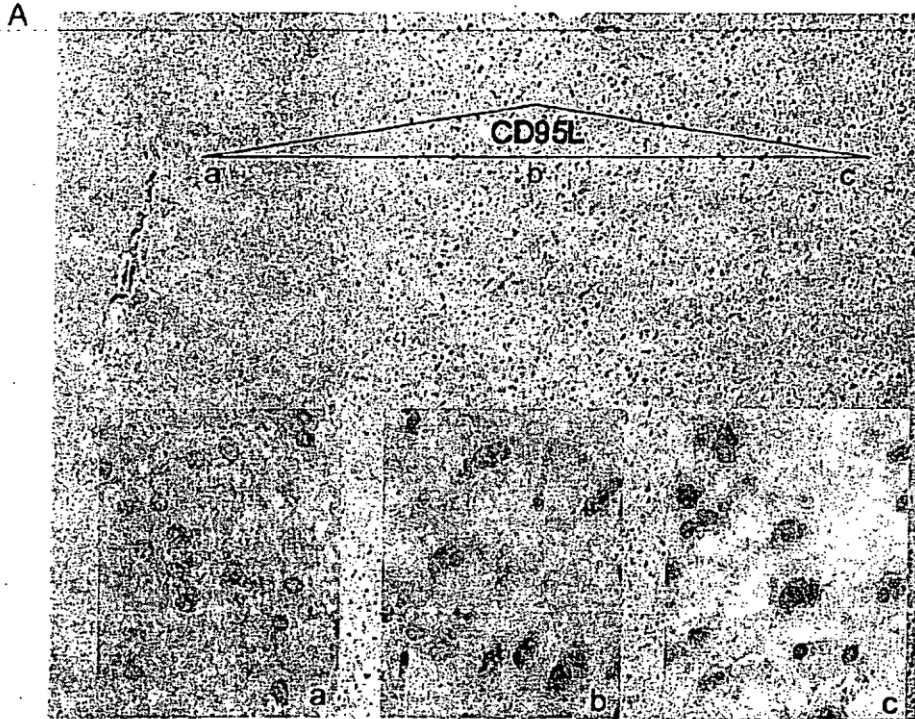


Figura 17 (continuación)

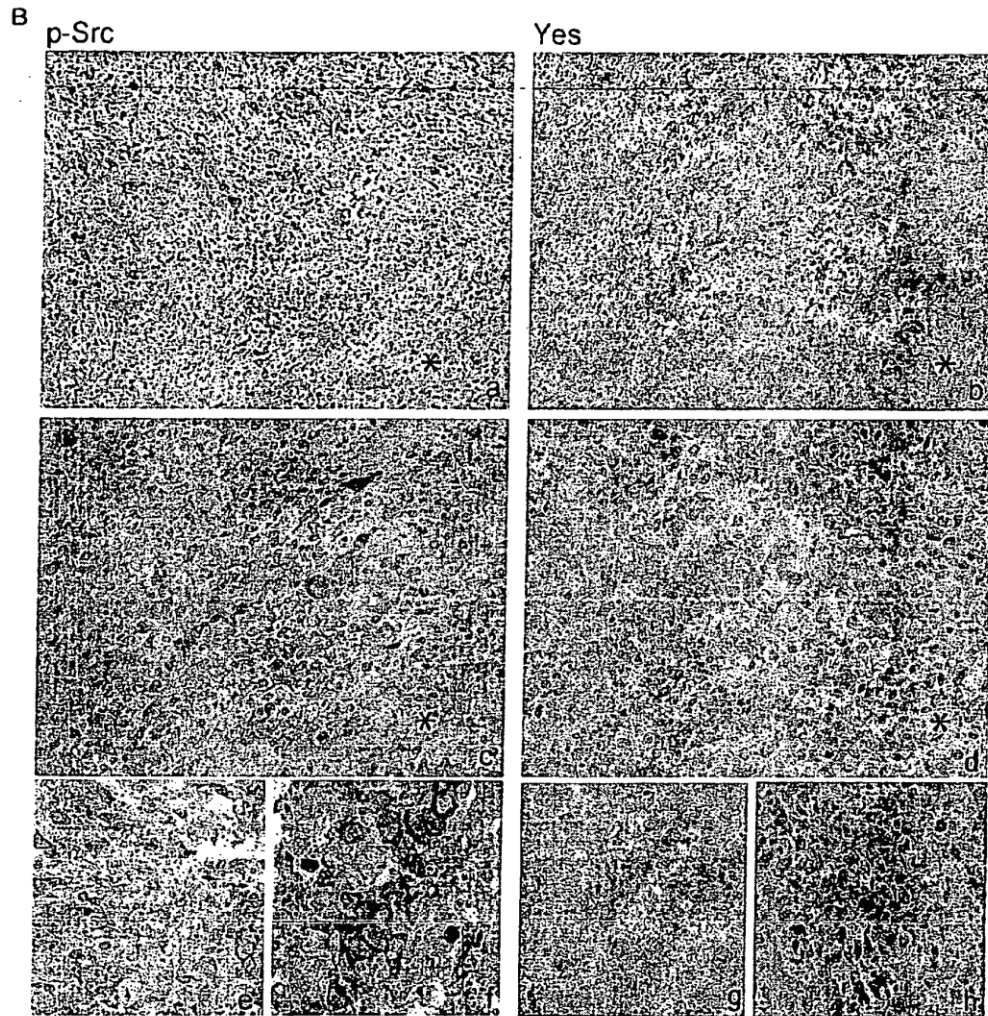
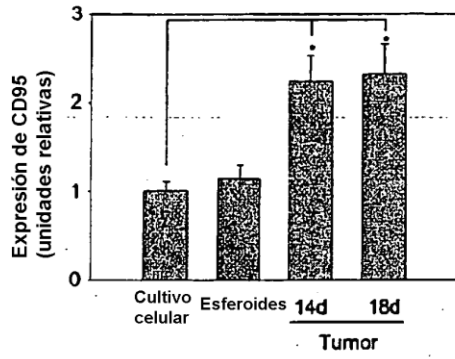
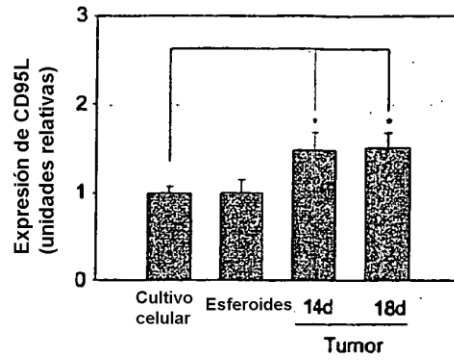


Figura 18

A



B



C

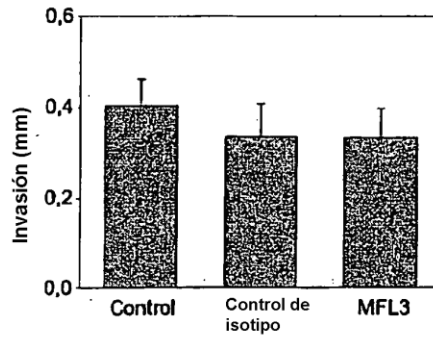
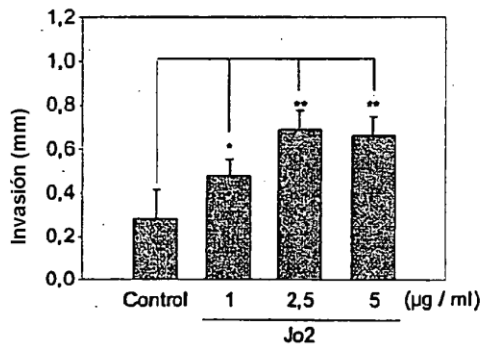


Figura 18 (continuación)

D

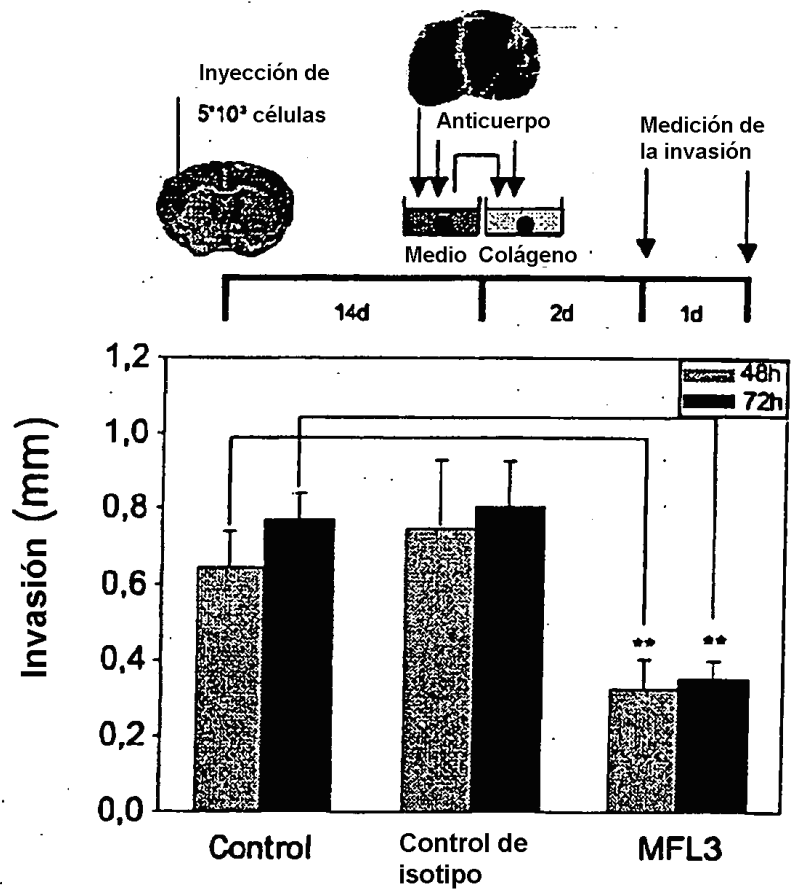


Figura 18 (continuación)

E

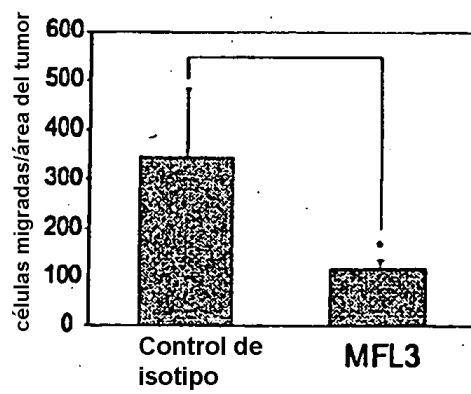
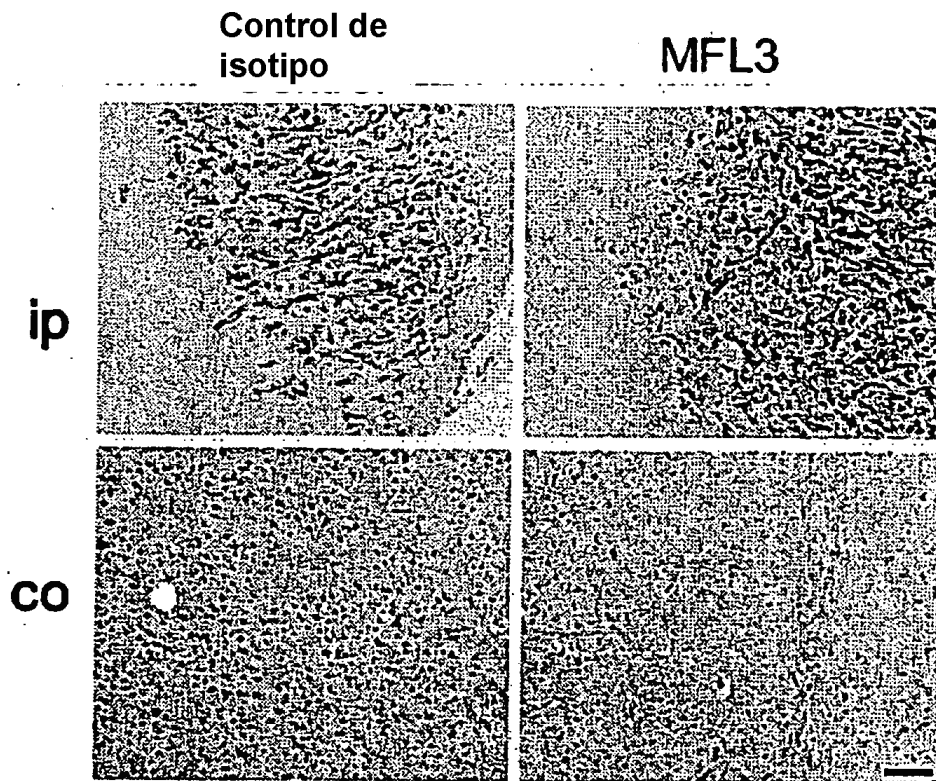


Figura 19

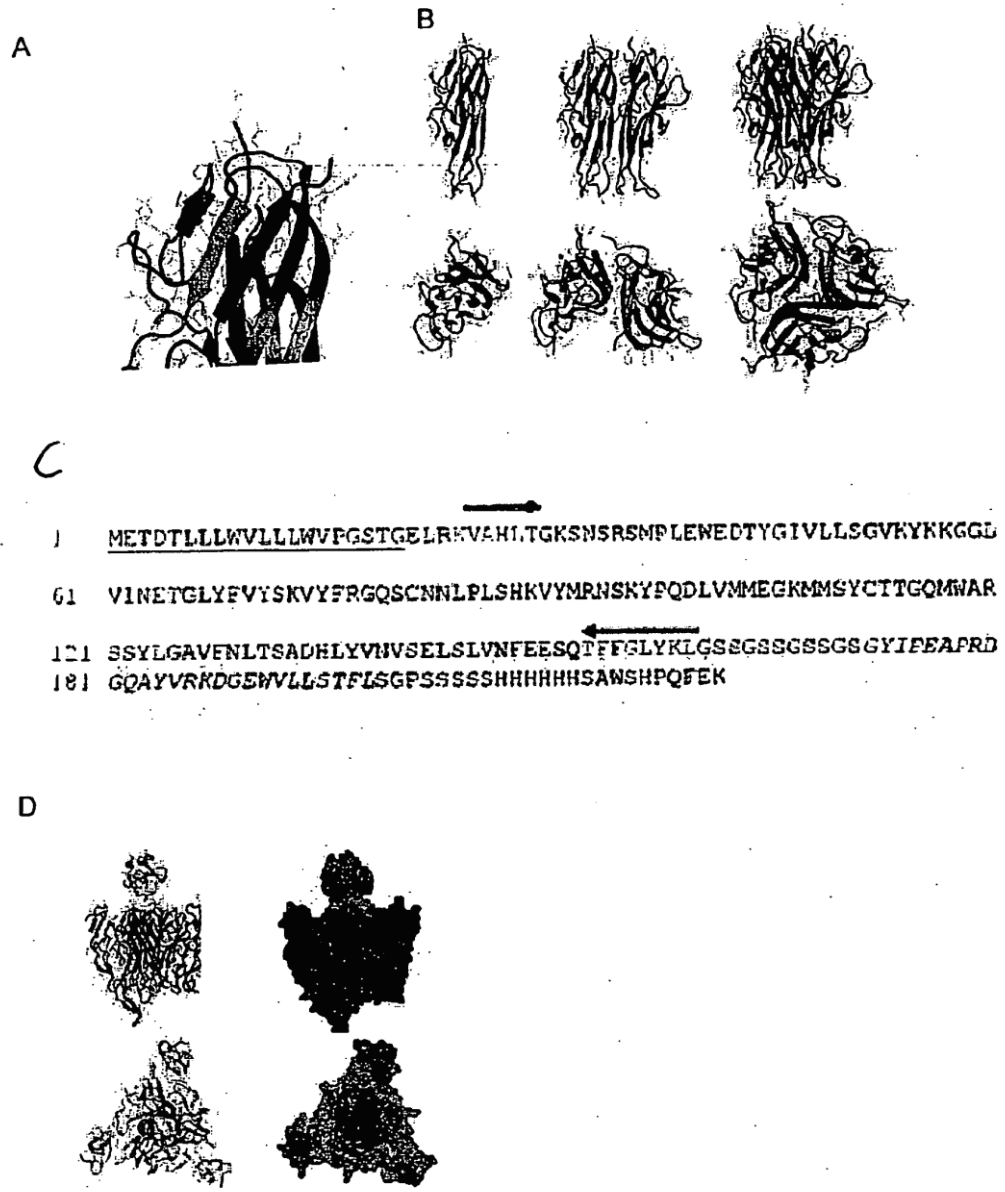
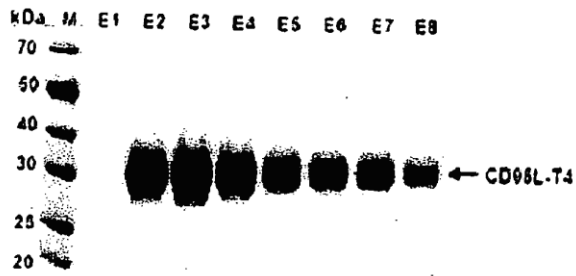


Figura 19 (continuación)

E



F

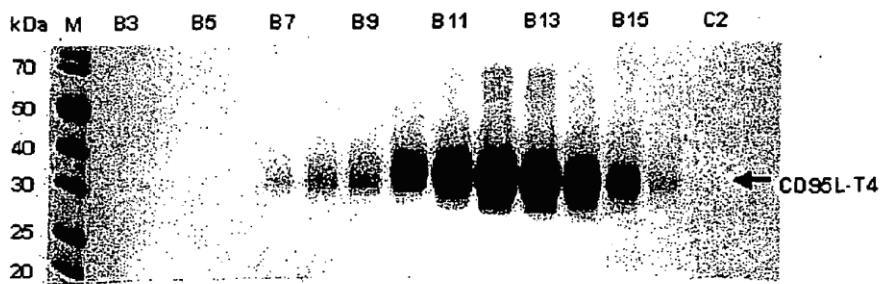
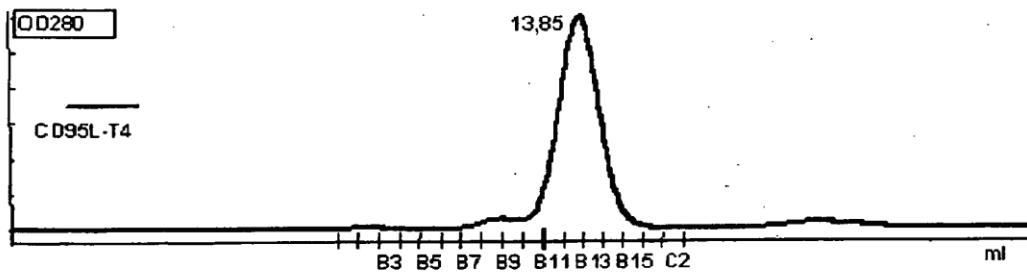


Figura 19 (continuación)

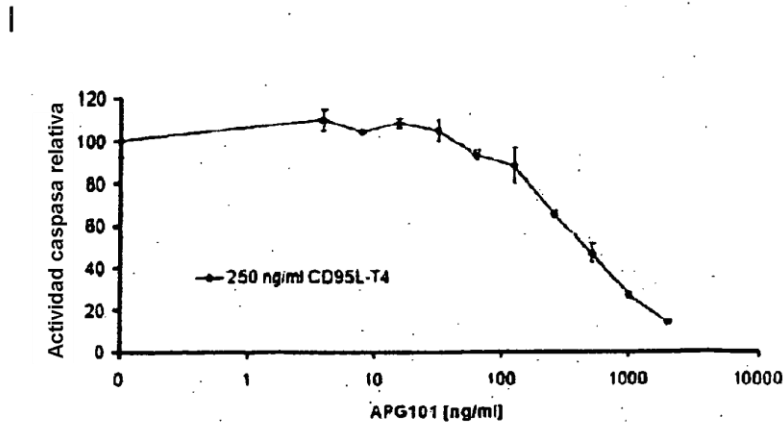
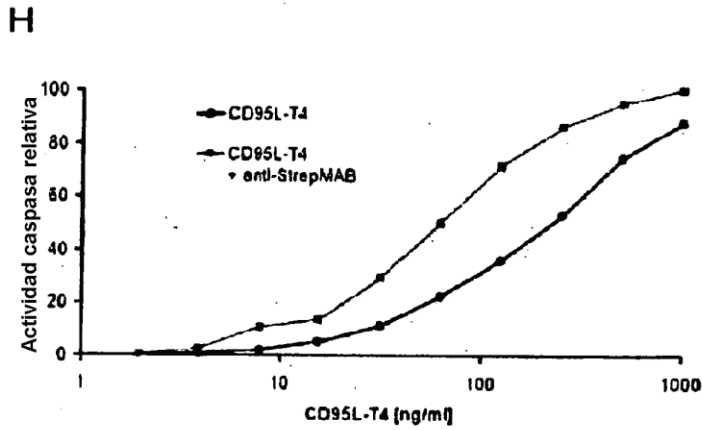
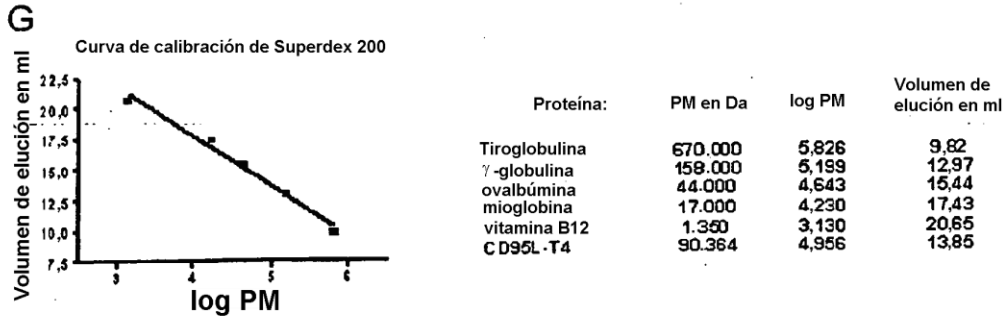




Figura 20

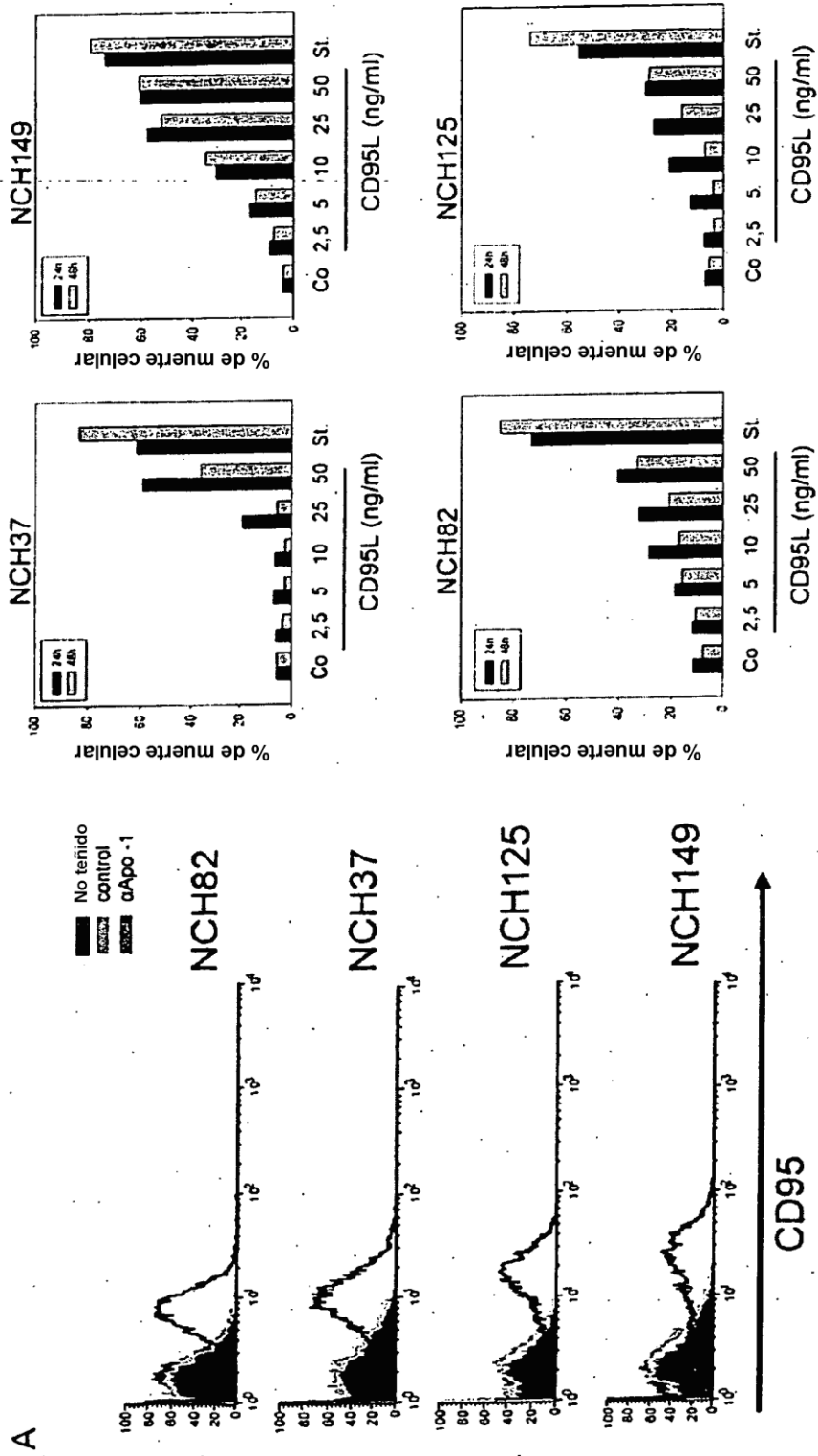


Figura 20 (continuación)

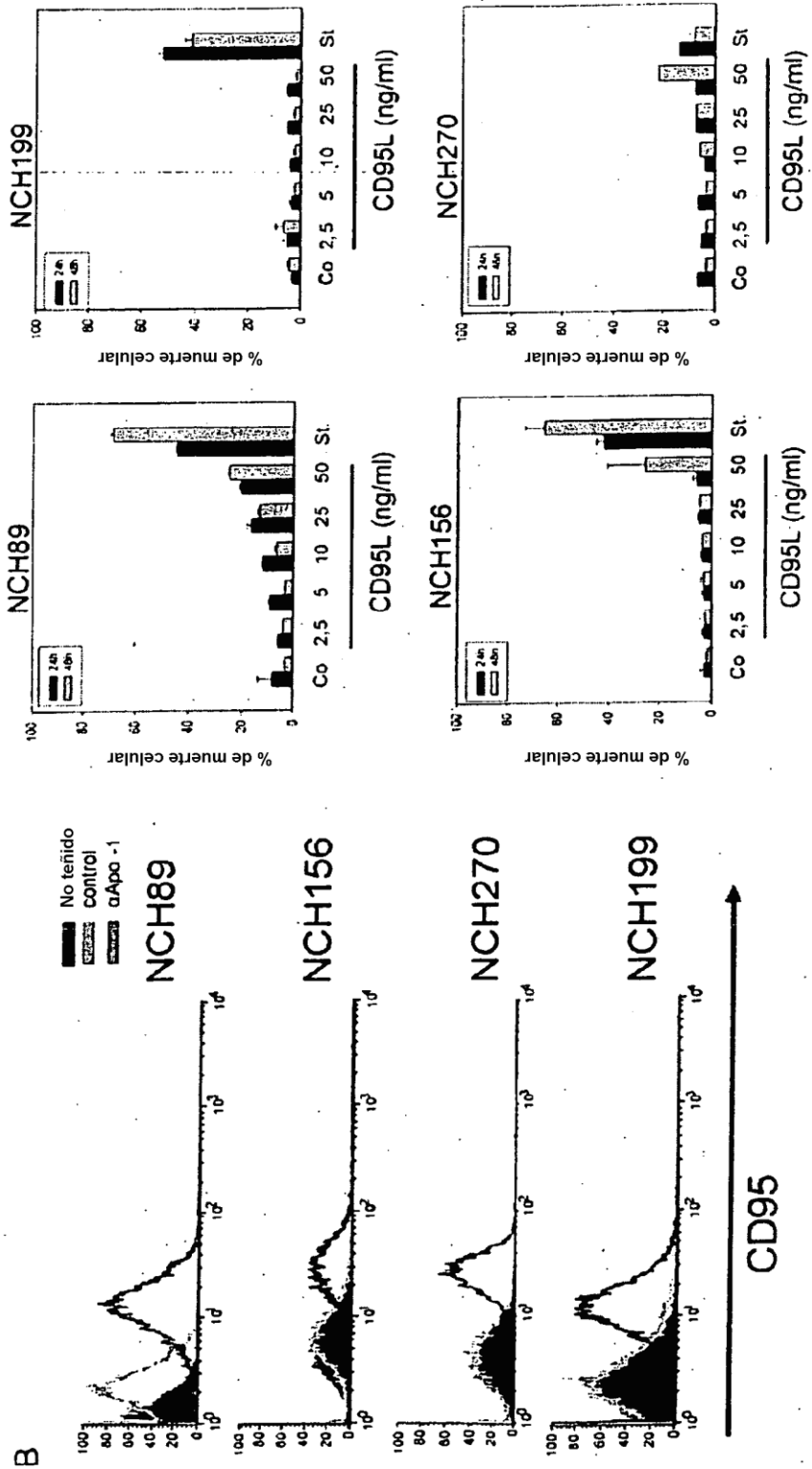


Figura 20 (continuación)

C

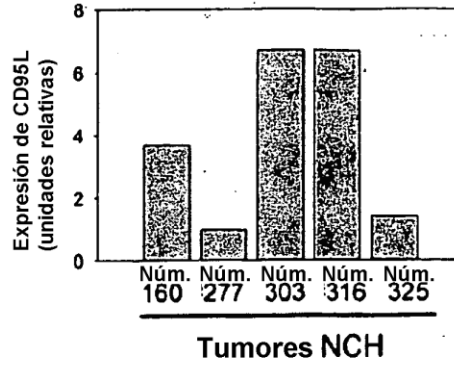
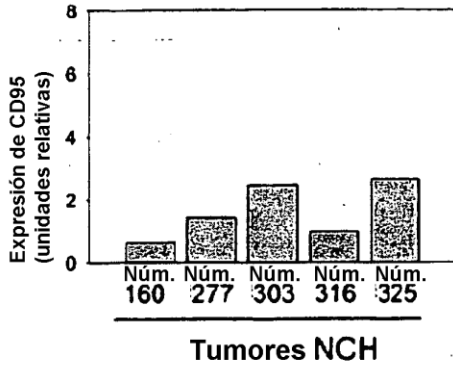


Figura 21

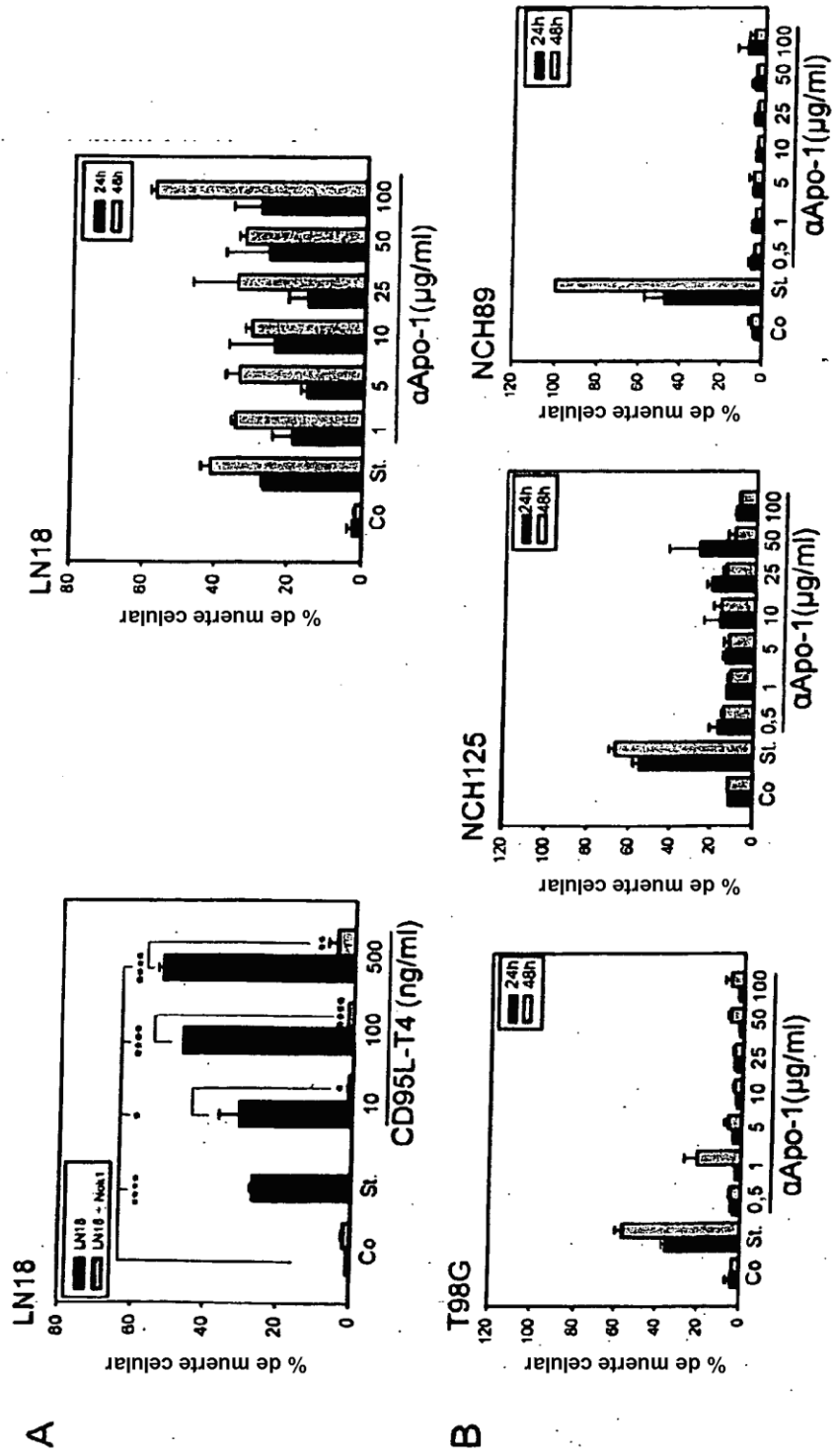


Figura 21 (continuación)

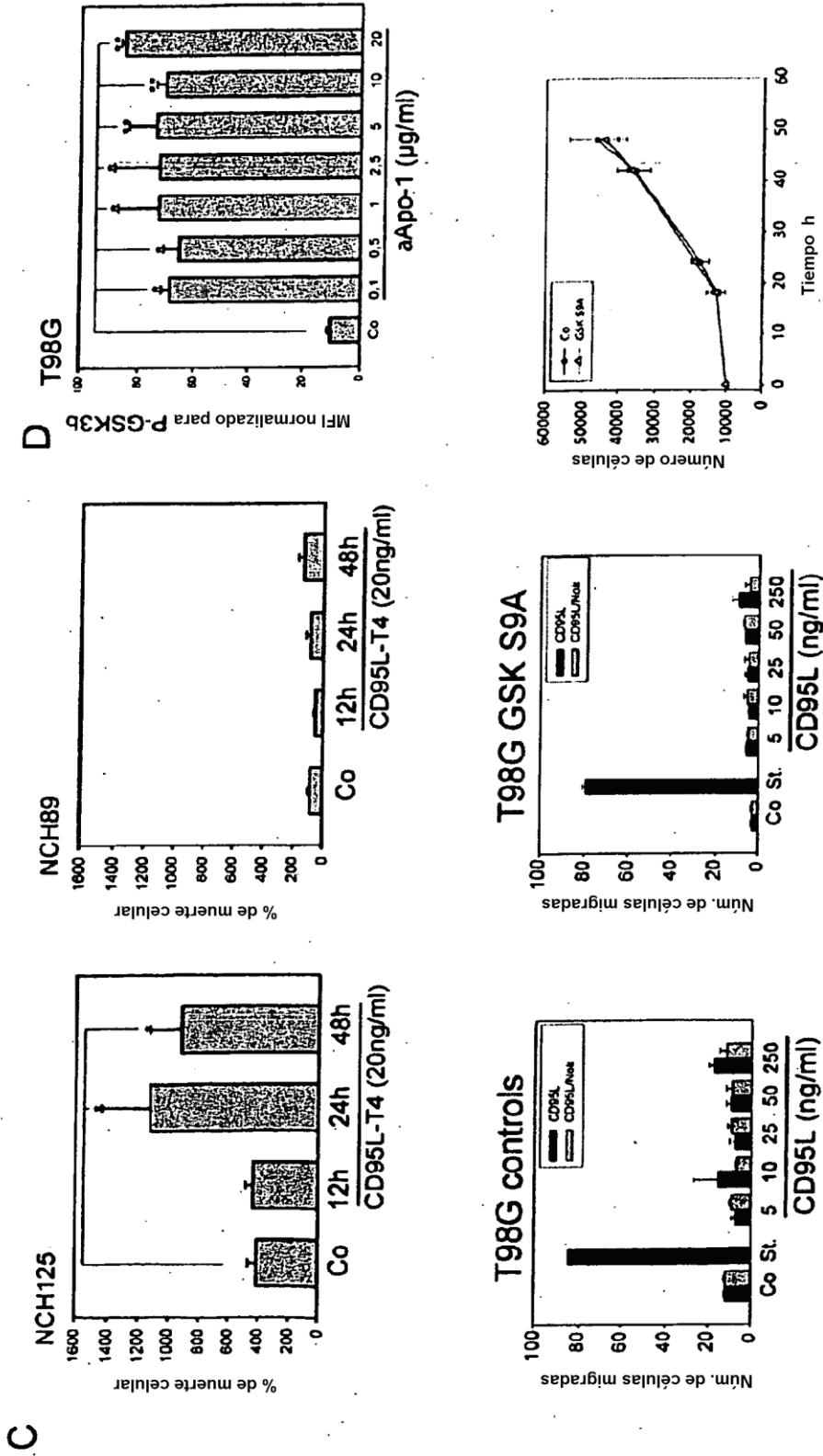


Figura 21 (continuación)

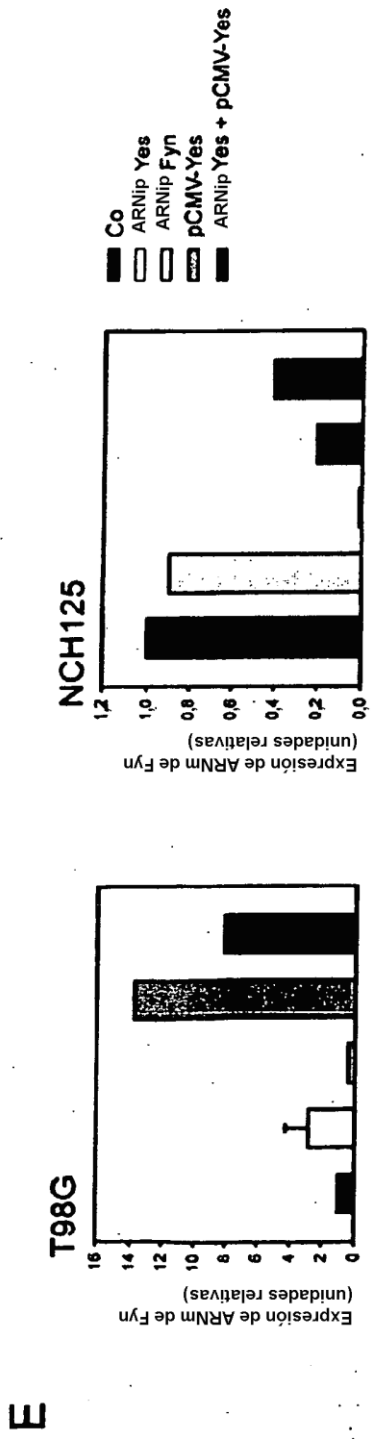


Figura 22

Tabla 1. Resumen de datos clínicos de pacientes con tumores

Núm.	Sexo	Edad durante la cirugía (años)	Diagnosís	Tiempo de Supervivencia (semanas)
NCH37	varón	52	Gliosarcoma OMS IV	40
NCH82	varón	56	GBM	16
NCH89	hembra	41	GBM	29
NCH125	varón	43	GBM	57
NCH149	varón	54	GBM	71
NCH156	varón	54	GBM	69
NCH160	varón	58	GBM	54
NCH199	varón	38	GBM secundario	28
NCH270	varón	72	GBM	32
NCH277	hembra	78	GBM	173
NCH316	hembra	72	GBM	94
NCH323	varón	25	Astrocitoma OMS II	vivo
NCH325	varón	31	GBM	vivo
NCH342	varón	44	GBM	80
NCH351	varón	37	GBM	60
NCH354	hembra	38	GBM	96
NCH356	varón	67	GBM	86
NCH357	varón	29	GBM	64
NCH378	hembra	71	GBM	40
NCH408	varón	35	Oligodendroglioma oms III	vivo
NCH417	varón	69	GBM	-
NCH419	hembra	61	OMS III-IV	vivo

Núm.	Detección del tumor	Diagnosís	Tiempo post-irradiación (s)	Edad durante la cirugía (años)	Tiempo supervivencia Post-recaída (s)
19	original	GBM			
408	recurrente		20	51	38
115	original	GBM			
655	recurrente		20	56	56
253	original	GBM			
90717	recurrente		2	56	91
724	original	GBM			
202	recurrente		4	56	25
554	original	GBM			
910	recurrente		15	59	71
251	original	GBM			
30	recurrente		29	66	58
746	original	GBM			
388	recurrente		32	54	69
809	original	GBM			
715	recurrente		35	64	53
259	original	GBM			
860	recurrente		17	60	64