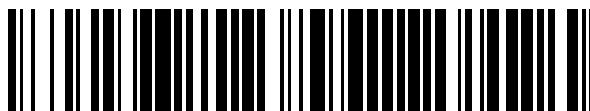


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 847**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07819905 .6**
96 Fecha de presentación: **17.07.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2038430**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.03.2009**

54 Título: **Disfunción del receptor 4 similar a Toll y aplicaciones biológicas de la misma**

30 Prioridad:
18.07.2006 EP 06291164

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.04.2012

73 Titular/es:
**INSTITUT GUSTAVE ROUSSY (IGR)
39, RUE CAMILLE DESMOULINS
94805 VILLEJUIF CÉDEX, FR**

72 Inventor/es:
**APETOH, Lionel;
KROEMER, Guido y
ZITVOGEL, Laurence**

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

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).

ES 2 378 847 T3

DESCRIPCIÓN

Disfunción del receptor 4 similar a Toll y aplicaciones biológicas de la misma.

La presente descripción se refiere en general a los campos de la genética, inmunología y medicina. Los inventores describen más en particular la identificación de un gen humano que se puede usar para predecir o determinar la sensibilidad de un sujeto a un tratamiento del cáncer. Este gen humano se ha identificado además en la presente memoria como un gen de susceptibilidad al cáncer que se puede usar para la prevención y el tratamiento del cáncer, así como para el cribado de fármacos terapéuticamente activos.

La presente descripción se refiere más específicamente a un gen del receptor 4 similar a Toll (TLR4) anormal que codifica una proteína TLR4 mutante, y dicho gen y proteína mutados representan objetivos nuevos para la intervención terapéutica. Un mutante de TLR4 particular comprende preferiblemente una única mutación de la asparagina de la posición 299.

La descripción se refiere además a una expresión o actividad anormal de la proteína TLR4.

También se describen métodos para determinar la predisposición hacia un cáncer en un sujeto y/o para prevenir o tratar el cáncer.

TÉCNICA ANTECEDENTE

Las respuestas inmunitarias innatas a patógenos las organizan principalmente los monocitos, macrófagos, granulocitos y células dendríticas, que actúan como una primera línea de defensa contra los microorganismos invasores [1]. La distinción entre lo que es propio y lo que es ajeno se basa en proteínas del hospedador que poseen la capacidad de reconocer patrones moleculares presentes en los organismos exógenos [2] [3]. Una familia importante de proteínas son los receptores similares a Toll (TLR), también denominados receptores de reconocimiento de patrones (PRR).

TLR4 reconoce lipopolisacáridos (LPS) de bacterias gramnegativas, por medio de un dominio extracelular caracterizado por repeticiones ricas en leucina [4], [5], [6]. Tras su unión a la proteína de unión a LPS (LBP), el LPS se transporta a un complejo receptor que implica CD14, TLR4 y una molécula adaptadora MD2. La transducción de señales se inicia mediante la interacción del dominio TIR (Toll/receptor de IL-1) de TLR4 con MyD88 (proteína de respuesta principal de diferenciación mieloide 88) [7]. Se ha dilucidado una ruta independiente de MyD88 para TLR4, que implica proteínas tales como la proteína adaptadora que contiene un dominio Toll-IL1R que induce IFN beta (TRIF), moléculas adaptadoras relacionadas con TRIF, quinasa 1 de unión a TANK (TANK: NFkB quinasa asociada al receptor de TNF) e Ikb quinasa ε, que conduce después a la inducción de IFN de tipo 1 por medio del factor 3 regulador de interferón (IRF3) [8], [9], [10], [11].

Los polimorfismos genéticos, en su mayoría polimorfismos de nucleótido simple (SNP), son variantes comunes en una población que se hallan con una frecuencia de más del 1%. Pueden alterar la secuencia de aminoácidos (SNP no sinónimo), afectar al promotor o dar una secuencia sinónima. Se han identificado dos SNP en la región del promotor de CD14 y uno de ellos, Cys159Thr, está relacionado con la incidencia y la mortalidad del choque séptico [12].

De manera más importante, se han investigado en gran medida los SNP en el dominio extracelular de TLR4. Dos SNP que co-segregan en el gen que codifica TLR4 que exhiben frecuencias alélicas mayores del 2% son Asp299Gly y Thr399Ile [13]. Estas mutaciones se hallaron en alrededor del 10% (0-19%) de los individuos blancos de control en la mayoría de los estudios. La importancia funcional del SNP Asp299Gly se ha investigado en la hiposensibilidad a LPS inhalado y en asmáticos alérgicos [13], sobre la incidencia y el curso del choque séptico y en diversas enfermedades infecciosas o en la patogénesis de la aterosclerosis. Los datos crecientes pero controvertidos apuntan a un papel de dicho SNP de TLR4 en la susceptibilidad alterada o en el curso de estas enfermedades inflamatorias o infecciosas (que incluyen reacciones a aloinjertos, diabetes, estenosis coronaria) (revisado en [14]). Es necesario un alelo mutado para la disfunción [13]. De 91 personas con choque séptico durante una infección por bacterias gramnegativas, 4 exhibieron el SNP Asp299Gly (pero no el Thr399Ile), mientras se detectaron 0 SNP en el grupo de control [15]. La colonización de mujeres gestantes con *Gardnerella* spp y otros comensales gramnegativos se incrementó 10 veces en mujeres que portaban el alelo mutado de TLR4 Thr399Ile [16]. Se descubrió una correlación clara entre la bronquiolitis aguda por virus sincitial respiratorio (RSV) en niños y ambos SNP de TLR4, a la vez que no se descubrió ninguna correlación con SNP de CD14 [17].

El bloqueo de TLR4 puede tener un efecto beneficioso sobre la aterosclerosis en ratones, y dos estudios descubrieron un efecto protector de las variantes de TLR4 en episodios coronarios agudos [18], [19], [20]. Los SNP infrecuentes de TLR4 también podrían ser importantes en algunos casos, tales como meningococcemia en la que Asp299Gly/Thr399Ile no fueron significativos (región extracelular y dominio C-terminal de la región TIR, [21], [22]).

Los ensayos funcionales mediante el uso de PBMC completos o monocitos dirigidos a detectar TLR4 disfuncional

pueden no ser relevantes [23], [24], [25].

La asociación de los SNP con la susceptibilidad a enfermedades infecciosas, así, solamente se puede considerar preliminar, ya que los estudios que informan de correlaciones positivas se llevaron a cabo con poblaciones pequeñas. El hallazgo de que la presencia de SNP no influye en la activación de los monocitos de sangre completa por sus ligandos es una prueba adicional contra la hipótesis de un papel potencial para estos SNP en la susceptibilidad a enfermedades infecciosas.

Recientemente se ha considerado un papel para el polimorfismo de TLR4 y el cáncer, debido a que la inflamación crónica puede exponer a un riesgo superior de tumorigénesis. Se descubrió que un SNP de TLR4 en la posición 11381 en Suecia era más frecuente (24,1% frente al 19,7%, $p=0,02$) entre personas con cáncer de próstata [26]. Un estudio más reciente también concluyó que los polimorfismos heredados del gen inmunitario innato de TLR4 están asociados al riesgo de cáncer de próstata [27]. La homocigosidad para los alelos variantes de ocho SNPs se asoció a un riesgo significativamente más bajo estadísticamente de cáncer de próstata (TLR4_1893, TLR4_2032, TLR4_2437, TLR4_7764, TLR4_11912, TLR4_16649, TLR4_17050, y TLR4_17923), pero el polimorfismo de TLR4_15844 correspondiente a 11381G/C no estuvo asociado al cáncer de próstata (GG frente a CG/CC: OR, 1,01; intervalo de confianza del 95%, 0,79-1,29). Se observaron seis haplotipos comunes (frecuencia acumulativa, 81%); el ensayo global de la asociación entre los haplotipos y el cáncer de próstata fue estadísticamente significativo [$\chi^2(2) = 14,8$ en 6 grados de libertad; $P = 0,02$]. Dos haplotipos comunes estuvieron estadísticamente asociados de manera significativa a un riesgo alterado de cáncer de próstata.

La primera demostración de un papel modulador para TLR4 en la inflamación pulmonar crónica y la tumorigénesis ha sido presentada por Bauer AK et al. [28]. Para determinar el papel de TLR4 en la inflamación pulmonar crónica, compararon la permeabilidad pulmonar, la infiltración de leucocitos, y el factor nuclear kappa B (NFkappaB) y la unión al ADN de la proteína activadora 1 (AP-1) en cepas de ratones endogámicas tratadas con hidroxitolueno butilado (BHT) con TLR4 funcional (OuJ y BALB) y TLR4 mutado [HeJ y BALB(Lps-d)]. También midieron la formación de tumores primarios en estos ratones tras una única inyección de carcinógeno (3-metilcolantreno) seguido de tratamiento con BHT. Los ratones con TLR4 funcional tuvieron una permeabilidad pulmonar, inflamación de leucocitos, y formación de tumores primarios reducidas (BALB(Lps-d), media = 22,3 tumores/ratón, frente a BALB, media = 13,9 tumores/ratón, diferencia = 8,4 tumores/ratón, intervalo de confianza del 95% = 4,6 a 12,1 tumores/ratón; $P = 0,025$) en comparación con los ratones con TLR4 mutado. La actividad de unión al ADN de NFkappaB fue superior en los ratones OuJ que en los ratones HeJ; sin embargo, la actividad de AP-1 estuvo elevada en los ratones HeJ.

Más recientemente, Okamoto et al. [29], describió una correlación entre la ausencia de expresión de TLR-4 en pacientes con cáncer de cabeza y cuello y una respuesta disminuida a un tratamiento terapéutico particular que comprendía la administración de OK-PSA o OK-432, opcionalmente junto con UFT (tegafur:uracilo, 1:4), y opcionalmente junto con radioterapia. Este documento, sin embargo, no describe ni sugiere un método según la presente invención para determinar la sensibilidad de un sujeto a un tratamiento del cáncer que consiste en un tratamiento quimioterápico del cáncer.

El combate eficaz del cáncer se basa en compuestos farmacéuticos que seleccionan como objetivo directamente las células tumorales o que potencian las defensas del hospedador contra dichas células. Aunque se proponen varias terapias anticancerosas, entre las cuales se encuentra la quimioterapia [las antraciclinas, tales como doxiciplina (DOX), oxaliplatino (en la presente memoria denominado PLAT) y cis-platino (en la presente memoria denominado PLAT) se consideran los agentes citotóxicos más eficaces del armamento oncológico] y la radioterapia [rayos X (RX)], los beneficios de dichos tratamientos todavía tienden a ser insuficientes. Debido a que las antraciclinas, oxaliplatino, cis-platino y los rayos X representan la base de hasta un 70% de las terapias anticancerosas, la detección de las disfunciones responsables de una respuesta reducida a dichos tratamientos parece ser crítica para el tratamiento de los pacientes.

SUMARIO

En la presente memoria se describe un método para determinar la sensibilidad de un sujeto a un tratamiento del cáncer, en particular a un tratamiento quimioterápico. El método comprende detectar la presencia de un ácido nucleico de TLR4 mutado o una expresión o actividad anormal de la proteína TLR4 en una muestra del sujeto, y la presencia de dicho ácido nucleico de TLR4 mutado o la expresión o actividad anormal de TLR4 es indicativa de una resistencia a dicho tratamiento.

También se describen mutaciones particulares en el gen de TLR4 y los productos de expresión. Estas mutaciones son utilizables en un método para determinar la sensibilidad de un sujeto a un tratamiento del cáncer. Ciertos alelos del gen de TLR4 también están relacionados con la susceptibilidad al cáncer, y representan objetivos para la intervención terapéutica.

También se describe en la presente memoria un método para determinar una predisposición a un cáncer o una

probabilidad incrementada de tener un cáncer en un sujeto, y el método comprende detectar la presencia de un ácido nucleico de TLR4 mutado o una expresión o actividad anormal de la proteína TLR4 en una muestra del sujeto. Un método particular comprende la detección de la presencia de una secuencia de TLR4 mutada que comprende una mutación puntual, preferiblemente un polimorfismo de nucleótido simple (SNP), que conduce a la sustitución de asparagina por glicina en la posición 299 o de treonina por isoleucina en la posición 399, en una muestra del sujeto.

También se describe un método para el cribado de compuestos útiles para prevenir o tratar el cáncer, en particular en un sujeto que tiene un ácido nucleico de TLR4 mutado o una expresión o actividad anormal de la proteína TLR4. Dicho método comprende determinar la capacidad de un compuesto de ensayo de modular la expresión o actividad de TLR4 o la relocalización en la membrana plasmática de las células tumorales de los ligandos de TLR4, tales como HMGB1 (caja 1 de peso molecular elevado HMGB1/anfoterina).

La presente solicitud describe además el uso de un compuesto capaz de restablecer una expresión de TLR4 funcional para preparar una composición farmacéutica para tratar o prevenir un cáncer en un sujeto que tiene un ácido nucleico de TLR4 mutado o una expresión o actividad anormal de la proteína TLR4.

La presente solicitud describe además un compuesto capaz de restablecer una expresión de TLR4 funcional y una composición farmacéutica que comprende tal compuesto para prevenir o tratar un cáncer en un sujeto que tiene un ácido nucleico de TLR4 mutado o una expresión o actividad anormal de la proteína TLR4.

Los solicitantes describen además el uso de un ligando de TLR3 y/o TLR9 para preparar una composición farmacéutica para tratar o prevenir un cáncer en un sujeto que tiene un ácido nucleico de TLR4 mutado o una expresión o actividad anormal de la proteína TLR4. Tales ligandos permiten evitar la ruta de señalización de TLR4 y conducen a la activación de NF- κ B.

También se describe en la presente memoria un ligando de TLR3 y/o TLR9 capaz de restablecer una expresión de TLR4 funcional y una composición farmacéutica que comprende tal ligando de TLR3 y/o TLR9 para prevenir o tratar un cáncer en un sujeto que tiene un ácido nucleico de TLR4 mutado o una expresión o actividad anormal de la proteína TLR4.

Los solicitantes describen además el uso de un compuesto lisosomotrópico alcalinizante para preparar una composición farmacéutica para tratar o prevenir un cáncer en un sujeto que tiene un ácido nucleico de TLR4 mutado o una expresión o actividad anormal de la proteína TLR4.

También se describe en la presente memoria un compuesto lisosomotrópico alcalinizante y una composición farmacéutica que comprende tal compuesto para prevenir o tratar un cáncer en un sujeto que tiene un ácido nucleico de TLR4 mutado o una expresión o actividad anormal de la proteína TLR4.

También se describen en la presente memoria métodos para tratar o prevenir un cáncer en un sujeto a través de la activación de la expresión o actividad de TLR4.

Más en particular, en la presente memoria se proporcionan métodos para tratar a un sujeto que porta alelos mutados del gen de TLR4, cuyos métodos incluyen emplear una terapia combinada. Los sujetos se pueden tratar así, por ejemplo, por medio de terapia génica, terapia de sustitución proteica o por medio de la administración de moléculas miméticas y/o activadores de la proteína TLR4, tales como HMGB1. Al menos uno de dichos métodos se pueden combinar además con la quimioterapia y/o con la radioterapia.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1: Inmunogenicidad de la apoptosis.

A. Fármacos que inducen la muerte celular apoptótica *in vitro*. Se incubaron diversos fármacos (aprobados o no por la FDA) con células tumorales CT26. Se llevaron a cabo análisis mediante citometría de flujo de las CT26 a las 24 hrs después de marcar con DAPI y anexina V. Los porcentajes de las células doblemente positivas son las barras negras, y de anexina V+/DAPI- son las barras blancas.

B. Vacunas profilácticas compuestas de células apoptóticas inducidas por fármacos en ratones de tipo natural. 3×10^6 células CT26 tratadas durante 24 hrs con diversos fármacos *in vitro* se inocularon en el flanco izquierdo de BALB/c TN en el día 0. Los controles se trataron con PBS. En el día 7, se inyectaron 5×10^5 CT26 vivas en el flanco derecho, y se monitorizó el crecimiento tumoral dos veces a la semana mediante el uso de un calibre. Se indican los porcentajes de ratones exentos de tumores. Cada experimento incluyó 5-10 ratones/grupo, y se llevó a cabo al menos dos veces proporcionando resultados similares. Se llevaron a cabo análisis estadísticos mediante el uso del método exacto de Fisher y ANOVA. * indica resultados significativos a $p < 0,05$.

Figura 2: TLR4 es crítico en la inmunogenicidad de las vacunas profilácticas basadas en DOX.

A. Cinética del crecimiento tumoral de CT26 (colon) natural en ratones TLR4^{-/-} respecto de ratones TLR4^{+/+}.

B. La apoptosis inducida mediante DOX de CT26 no protegió a los ratones TLR4^{-/-} contra la exposición a CT26. Condiciones experimentales idénticas a las de 1B., pero llevadas a cabo en ratones TLR4^{-/-} en vez de BALB/c TN.

5 C. Se inocula directamente DOX en tumores establecidos en ratones TN o TLR4^{-/-}. El efecto antitumoral directo se monitoriza midiendo los tamaños de los tumores bisemanalmente.

Cada experimento incluyó 5-10 ratones/grupo, y se llevó a cabo al menos dos veces proporcionando resultados similares. Se llevaron a cabo análisis estadísticos mediante el uso del método exacto de Fisher y ANOVA. * indica resultados significativos a $p < 0,05$.

10 **Figura 3: TLR4 está implicado en la remisión tumoral inducida por oxaliplatino.**

El osteosarcoma Glasgow (GOS) se inoculó en el día 0 en ratones C57BL/6 TN (A.) o ratones suizos atímicos (B.) o ratones C57BL10ScNJ (C.). Se administró oxaliplatino (o PBS) en el día 5 de manera sistémica y se monitorizó el crecimiento de los tumores. Cada experimento incluyó 5 ratones/grupo, y se llevó a cabo al menos dos veces proporcionando resultados similares. Se llevaron a cabo análisis estadísticos mediante el uso de la prueba t de Student. * indica resultados significativos a $p < 0,05$.

15 **Figura 4: Los rayos X controlan la progresión tumoral al menos en parte por medio de TLR4.**

El tumor mamario TS/A se inoculó en ratones IC BALB/c, BALB/c atímicos o BALB/c TLR4^{-/-} (A.) y se irradió a 10 Gy en una sola dosis cuando alcanzó un tamaño de 30-50 mm² (alrededor del día 9-12) (B.). (C.) Se inocularon inhibidores basados en ODN de TLR7/9 i.p. antes y después de la radioterapia. Se monitorizó el tamaño de los tumores dos veces a la semana. Cada experimento incluyó 5 ratones/grupo, y se llevó a cabo al menos tres veces proporcionando resultados similares. Se llevaron a cabo análisis estadísticos mediante el uso del método exacto de Fisher. * indica resultados significativos a $p < 0,05$.

20 **Figura 5: MyD88 está implicado en la inmunogenicidad mediada por oxali-platino.**

Condiciones idénticas a las de 3A, pero se implantó GOS en ratones TRIF^{-/-} (A) o MyD88^{-/-} BL/6 (B). Se monitorizó el tamaño de los tumores dos veces a la semana. Cada experimento incluyó 5 ratones/grupo, y se llevó a cabo al menos tres veces proporcionando resultados similares. Se llevaron a cabo análisis estadísticos mediante el uso del método exacto de Fisher. * indica resultados significativos a $p < 0,05$.

25 **Figura 6: Los ratones TLR4^{-/-} recuperan una sensibilidad completa a los rayos X en presencia de ligandos de TLR3.**

Igual que en 4., pero se administró una terapia concomitante con 50 µg de poli I:C i.p. en los días +1, +4 y +7 tras la radioterapia en animales que albergaban TS/A (A) que recibían también radioterapia (B).

Se monitorizó el tamaño de los tumores dos veces a la semana. Cada experimento incluyó 5 ratones/grupo, y se llevó a cabo al menos tres veces proporcionando resultados similares. Se llevaron a cabo análisis estadísticos mediante el uso del método exacto de Fisher. * indica resultados significativos a $p < 0,05$.

30 **Figura 7: Los ratones TLR4^{-/-} recuperan una sensibilidad completa a los rayos X en presencia de ligandos de TLR9.**

Igual que en 6., pero en vez de poli I:C, los animales recibieron 50 µg de ODN CpG 5'-TCCATGACGTTCCCTGACGTT-3' (SEQ ID N°:8).

35 **Figura 8: La fagocitosis y la maduración no se ven dificultadas en las CD TLR4^{-/-}.**

40 A. EL4OVA apoptóticas marcadas con CytoTracker Red 1 µM (CMTMR; Invitrogen) se incubaron a 1:1 con CD-MO (de ratones TLR4^{+/+} o TLR4^{-/-}) en una etapa inmadura durante 4 hrs a 37 °C o 4 °C. Los análisis mediante citometría de flujo seleccionando las células CD11c+ permitieron la determinación del % de células dendríticas positivas para PE. Se muestra un experimento representativo.

45 B. Igual que en A., pero EL4OVA no se marcaron con CMTMR y las células CD11c+ se examinaron en busca de la expresión superficial de I-A^B y CD86. Se muestra un experimento representativo en los paneles superior (TLR4^{+/+}) e inferior (TLR4^{-/-}).

Figura 9: Las CD TLR4^{-/-} exhiben capacidades defectuosas para activar el clon B3Z y presentar de manera cruzada antígenos tumorales asociados a células

A. El clon B3Z, que es un CTL específico de OVA, se ha incubado con CD de médula ósea singénica H2b para ratones C57BL/10 o C57BL10ScNJ (CD-MO) pulsadas con EL4-OVA (irradiadas o no) o con EL4 sin transfectar. B3Z secreta IL-2, que se puede medir mediante ELISA en los sobrenadantes. Se ha llevado a cabo la dosificación de IL-2 en experimentos a diferentes proporciones entre CD-MO y células EL4OVA irradiadas.

- 5 B. Se inyectaron EL4-OVA, irradiadas o no, en la planta de la pata en el día 0 en un hospedador Balb/c TLR4^{-/-} o TLR4^{+/+}. Se recogieron gangliocitos y se expusieron a proteína OVA durante 4 días, y se recogieron los sobrenadantes para las medidas de IFN γ en el día 3. En el día 3, se añadió timidina tritiada a estos pocillos, y se monitorizó la proliferación en cpm.

Figura 10: HMGB1 es un ligando crítico para el desencadenamiento de TLR4 durante la inducción de estrés mediante antraciclinas y rayos X.

A. El clon B3Z, que es un CTL específico de OVA, se ha incubado con CD de médula ósea singénica H2b (CD-MO) pulsadas con EL4-OVA (irradiada o no) o con EL4 sin transfectar. B3Z secreta IL-2, que se puede medir mediante ELISA en los sobrenadantes. Se ha llevado a cabo la dosificación de IL-2 en experimentos a diferentes proporciones entre células irradiadas CD-MO y EL4OVA en presencia de moléculas TLR4Fc bloqueantes o Abs de control de isotipo.

B. Igual, pero en presencia de anticuerpos (Abs) anti-HMGB1 o Abs de control de isotipo.

Figura 11: Genotipado de mujeres con cáncer de mama con respecto a Asp299Gly de TLR4.

A. *Susceptibilidad genética al cáncer de mama.* Las pacientes ingresaron en una unidad de urgencia durante 2 años, y se monitorizó la comorbilidad (cáncer, p.ej.). Se registraron 640 casos de pacientes que tenían un cáncer en su historial presente o pasado en este estudio. Se clasificaron según su subtipo histológico. Se llevó a cabo una PCR en un único tubo basada en la degradación por exonucleasas de oligonucleótidos específicos de alelo doblemente marcados con ADN genómico de sangre de las pacientes. Se representa el porcentaje de heterocigosidad (un alelo mutado de Asp299Gly de TLR4) para cada cohorte de n individuos. La frecuencia de Asp299Gly es significativamente mayor en las pacientes que presentan un cáncer de mama esporádico.

B. Resistencia primaria a antraciclina y rayos X en mujeres con cáncer de mama (BC). 12 mujeres con BC que tenían un genotipo Asp299Gly de TLR4 se hicieron coincidir con 24 mujeres con BC con un genotipo TN por edad, índice pronóstico de Nottingham y terapia adyuvante (antraciclina y rayos X). Se representa la supervivencia sin progresión (en 5 años), y es significativamente más larga en las mujeres que tenían un genotipo TN (Log Rank).

Figura 12: TLR4 controla la presentación de antígenos por las CD que captan corpúsculos apoptóticos *in vitro*.

TLR4 y MyD88 son necesarios para la presentación de antígenos por las CD cargadas con células tumorales irradiadas a las células T restringidas a la clase I del MHC (H-2^b). Las CD del genotipo indicado (origen C57BL/6, H-2^b I-A^b) se sometieron a un pulso con el péptido SIINFEKL, células EG7 vivas o irradiadas (proporción de EG7 respecto de CD 1:1) y se incubaron con el hibridoma B3Z específico de SIINFEKL durante 48 h, seguido de cuantificación de IL-2 en el sobrenadante (véase § 12 de la sección experimental).

Figura 13: Fagocitosis normal por CD deficientes de TLR4 y maduración normal de CD deficientes de TLR4.

A. La fagocitosis de las células tumorales moribundas es independiente de TLR4.

Índice de fagocitosis de CT26 tratadas con DXR (panel izquierdo) y células EL4 irradiadas (panel derecho) por CD TN singénicas o TLR4^{-/-} o Trif^{-/-} o MyD88^{-/-}. En placas de 12 pocillos, se marcaron células tumorales con Celltracker Green (Calbiochem) y se cultivaron con CD durante 2 horas en una proporción 1:1. Al final de la incubación, se recogieron las células adherentes con Versene, se mezclaron con las células no adherentes, se lavaron y se tiñeron con anticuerpo CD11c-APC. Se determinó la fagocitosis mediante análisis FACS de las células doblemente positivas. Los índices fagocíticos se refieren a la proporción entre los valores obtenidos a 4 °C y los valores obtenidos a 37 °C de la co-incubación entre CD y células tumorales.

B. La maduración de células dendríticas de ratón por células tumorales moribundas es independiente de TLR4. Se cultivaron CD-MO murinas de C57BL/6 24 horas con células EG7 irradiadas vivas (a una proporción 1:1) o LPS. Después de 24 horas, se recogieron los sobrenadantes del cocultivo y se llevó a cabo la detección de TNF α , IL-12p40 e IL-6 de ratón mediante ELISA.

LPS, que es un ligando de TLR-4, se usa como control positivo.

Figura 14: La deficiencia de TLR4 en las células dendríticas afecta al procesamiento de los antígenos derivados de células tumorales.

A. (panel superior) Las CD-MO de ratón TN o TLR4^{-/-} se cargaron con células TS/A-OVA irradiadas. En los momentos indicados, se detectaron las células CD11c⁺ que expresaban K^b-SIINFEKL mediante el uso de anticuerpos anti-CD11c y anti-K^b-SIINFEKL. Las CD sin pulsar se usaron para ajustar el umbral positivo para el anticuerpo K^b-SIINFEKL. La expresión de K^b en ambos tipos de CDs se verificó determinando el MFI de las CDs marcadas con el anticuerpo anti-K^b.

(panel inferior). Mismas condiciones que en el panel superior, con 0,5 µM de cloroquina o 10 µg/ml de anticuerpo Anti-HMGB1. * p<0,01. CO= control.

B. Las CD-MO de ratón TN o TLR4^{-/-} se cargaron con 1 mg/ml de proteína OVA (que puede asimilarse a un antígeno soluble) o células EG7 irradiadas (que pueden asimilarse a un corpúsculo apoptótico), en ausencia o presencia de las concentraciones indicadas de cloroquina o bafilomicina A1. Seis horas más tarde, se lavaron las CD-MO y se incubaron con el hibridoma B3Z durante 48 h (como en la Fig. 12), y dicho hibridoma reaccionó a la presentación de un antígeno por las CD. Se obtuvieron resultados similares (medias de los triplicados ±EEM, n=3) en dos experimentos. * p<0,01.

C. Se tiñeron CD-MO de ratón TN o TLR4^{-/-} con LysoTracker Red y se cargaron con células EG7 marcadas con CFSE irradiadas. Los fagosomas sin fusionar que contenían células objetivo marcadas con CFSE se observaron de color verde, mientras los fusionados con endosomas/lisosomas se observaron en color amarillo debido a la coexistencia de los dos fluorocromos. La determinación del porcentaje de fagosomas fusionados en CD que captaron los objetivos se llevó a cabo después mediante microscopía de fluorescencia en momentos diferentes.

La fusión de endosomas/lisosomas se acelera en CD-MO de ratón TLR4^{-/-}.

Figura 15: TLR4 y su ligando HMGB1 son necesarios para la eficacia de la vacunación contra células tumorales.

A. *Impacto de TLR4 en la vacunación con células tumorales moribundas.* Los ratones se inmunizaron con PBS o células tumorales moribundas (CT26, EL4 o MCA205) tratadas con oxaliplatino-doxorrubicina o irradiación X. Siete días más tarde, se inocularon a los ratones (10 por grupo) células tumorales singénicas vivas, y se monitorizó el crecimiento tumoral.

B. *La inhibición de la señalización de TLR4 reduce la eficacia de la vacunación con células tumorales moribundas.* Mismas condiciones que en A. mediante el uso de ratones a los que se les inyectaron previamente (día -7 y día -3) 100 µg de un péptido inhibitorio de TLR4 (péptido de control = CO).

C. *Impacto de HMGB1 sobre la vacunación con células tumorales moribundas.* El experimento se llevó a cabo como en A. y B. con CT26, EL4 y MCA205. Para la vacunación anti-tumoral, las células se transfectaron con un control o siARN que eliminaba HMGB1 antes del tratamiento quimioterápico o radioterápico. * p<0,05.

Figura 16: TLR4 dicta la eficacia de la quimioterapia y radioterapia anti-tumoral en ratones.

A.-D. *Impacto de TLR4, MyD88, TRIF y células T sobre la eficacia de la terapia anti-tumoral convencional.* Se establecieron tumores de timoma EL4, cáncer de colon CT26, cáncer de mama TS/A, y osteosarcoma GOS en ratones con los genotipos indicados. Al llegar al tamaño tumoral indicado, los ratones se dejaron sin tratar o se trataron mediante quimioterapia sistémica o radioterapia localizada.

Los ratones de tipo natural o TLR4^{-/-} que portaban tumores EL4 se trataron con oxaliplatino y/o cloroquina (50 µg i.p. una vez al día). En la Fig. 16D. se obtiene una corrección de la respuesta quimioterápica defectuosa de ratones TLR4^{-/-} mediante el uso de cloroquina.

Los resultados (media de triplicados ±EEM, 5 ratones por grupo) obtenidos en A.-D. son representativos de tres experimentos independientes. * p<0,05.

Figura 17: TLR4 dicta la eficacia de la quimioterapia anti-tumoral en seres humanos.

A. *Unión de HMGB1 defectuosa conferida por la mutación Asp299Gly de TLR4.* Se transfectaron células HeLa con vector vacío, TLR4 de tipo natural o mutante. Después, las células se incubaron en presencia de rHMGB1 durante una hora y se inmunoprecipitaron.

B. *Respuesta a LPS defectuosa conferida por la mutación Asp299Gly de TLR4.* Se cultivaron CD derivadas de monocitos humanos (generadas en GM-CSF+IFNα durante 3 días) que portaban el alelo de TLR4 normal Asp299Asp o el alelo Asp299Gly mutado con 2x10⁵ células T alogénicas en las proporciones indicadas en ausencia

o presencia de las dosis indicadas de rHMGB1 o LPS. Se determinó la proliferación de células T después de 4 días mediante la incorporación de ^3H .

C. *Capacidad defectuosa de las CDs humanas que albergan la mutación Asp299Gly de TLR4 para presentar de manera cruzada antígenos tumorales.* Se trataron células tumorales de melanoma Mel96 negativas para HLA-A2 y positivas para MART1 con oxaliplatino durante 24 horas, y después se cargaron en células dendríticas derivadas de monocitos humanos (CD-DM), tratadas o no con 0,5 μM de cloroquina durante el cocultivo. Después de la adición de anticuerpo de control o anticuerpo anti-HMGB1 (10 $\mu\text{g/ml}$) y el clon LT12 (específico del péptido MART) se llevó a cabo la detección de células productoras de IFN gamma mediante el uso de ELISPOT. La presencia de IFN gamma se debe correlacionar con la activación del clon LT-12, que a su vez está correlacionada con la presentación de antígenos de CD.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La invención se basa en la observación de que los agentes citotóxicos usados en el tratamiento de pacientes de cáncer involucran al sistema inmunitario, y más específicamente la ruta de señalización de TLR4. Por lo tanto, la detección de las disfunciones de TLR4 innatas o adquiridas se describe en la presente memoria como una manera adecuada de definir el tratamiento más adecuado a usar en un sujeto que padece un cáncer, es decir, un tratamiento que permite el restablecimiento o el aumento de la sensibilidad de dicho sujeto a la terapia. Las rutas de TLR sustitutas pueden estar involucradas en tal tratamiento (como se describe adicionalmente más adelante).

En los modelos preclínicos descritos en la presente memoria, los datos de los inventores indican que los tumores tienen tendencia a exhibir una cinética de crecimiento más rápida en su progresión natural en los ratones TLR4^{-/-} comparado con los ratones TLR4^{+/+}, en particular en el cáncer de colon (véase, por ejemplo, la Figura 2A).

Los inventores demuestran en la presente memoria que la progresión tumoral mediada a través de TLR4 disfuncional es independiente de procesos proinflamatorios exógenos intrínsecos a sus condiciones experimentales. De hecho, cuando se inyectaron células CT26 en ratones sin añadir ningún compuesto procarcinógeno o proinflamatorio, la cinética del crecimiento de las células tumorales aumentó significativamente en los hospedadores de TLR4 deficiente en comparación con los animales de la misma camada inmunocompetentes (Figura 2A).

Desafiando la visión actual por la que los compuestos citotóxicos actúan solamente por medio de efectos autónomos celulares, los inventores compararon el efecto antitumoral mediado por una antraciclina, por cis-platino, por oxaliplatino o por rayos X (RX) y otros agentes pro-apoptóticos (taxanos, mitomicina-C) en animales de la misma camada inmunocompetentes frente a inmunodeprimidos [que carecían de células T o receptores similares a toll (TLR)]. Descubrieron que la administración de doxiciclina (DOX), PLAT o RX en ratones que albergaban tumores estimuló selectivamente la supervivencia a largo plazo de una manera dependiente de células T a través de TLR-4 (pero no de TLR-7, 9). En contraste, taxano o mitomicina C dificultaron el crecimiento tumoral independientemente de las células inmunitarias o receptores (véase la parte experimental). Los inventores demostraron que los agentes citotóxicos inducían o incrementaban la expresión de los ligandos de TLR4, tales como HMGB1, por la célula tumoral, lo que hacía que las células tumorales sometidas a estrés fueran accesibles para los fagocitos, tales como CD. Los inventores pudieron demostrar que las células dendríticas (CD) TLR4^{-/-} tenían inalterada su capacidad de experimentar un programa de maduración o de secretar citocinas inflamatorias tras la interacción con la muerte celular apoptótica. TLR4 fue, sin embargo, crítico en el procesamiento y la presentación de los antígenos, más que en el desencadenamiento de una cascada proinflamatoria.

DEFINICIONES

Para facilitar la revisión de las diversas realizaciones, se proporcionan las descripciones siguientes de los términos:

El término "cáncer", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier tipo de neoplasia maligna (primaria o metástasis).

Los cánceres típicos son los cánceres sensibles a rayos X, antraciclina, cis-platino y/o oxali-platino, tales como cáncer de mama, estómago, sarcoma, ovárico, endometrio, vejiga, cuello del útero, recto, colon, pulmón, cáncer ORL, tumores pediátricos (neuroblastoma, glioblastoma multiforme), linfoma, leucemia, mieloma, seminoma, Hodgkin y hemopatías malignas.

La expresión "sensibilidad a un tratamiento" se refiere al nivel de respuesta de un sujeto a un tratamiento, que incluye, pero sin limitación, la capacidad de metabolizar un compuesto terapéutico, la capacidad de convertir un fármaco en un fármaco activo, la farmacocinética (absorción, distribución, eliminación) y la farmacodinámica (relacionada con el receptor) de un fármaco en un individuo. El tratamiento puede ser quimioterapia, que incluye, por ejemplo, la administración de una antraciclina, tal como doxiciclina (DOX), oxali-platino o cis-platino, y/o el tratamiento puede ser radioterapia mediante el uso de rayos gamma o X (RX), por ejemplo.

Las expresiones "predisposición a un cáncer", "susceptible a desarrollar un cáncer", "en riesgo de desarrollar un

cáncer" o "que tiene una probabilidad incrementada de tener un cáncer", tal como se usan en la presente memoria, significan que un sujeto tiene un riesgo incrementado de desarrollar un cáncer en comparación con la población media.

5 La muestra a analizar contiene ácidos nucleicos y/o polipéptidos. Los ejemplos de tales muestras incluyen fluidos, tejidos, muestras de células, órganos, biopsias, etc.

La naturaleza de la muestra recogida no se correlaciona necesariamente con un tipo particular de cáncer. El tejido recogido puede ser, de hecho, un tejido canceroso (preferiblemente congelado, en vez de incrustado en parafina) o un tejido sano (por ejemplo sangre, piel, estroma).

El tejido se puede recoger de un tejido canceroso seleccionado.

10 La muestra también se puede obtener, por ejemplo, de un tejido seleccionado de sangre, plasma y médula ósea, independientemente del estado anormal o patológico opcional de dicho tejido.

Preferiblemente, la muestra comprende células que se sabe que expresan TLR4, preferiblemente células seleccionadas de monocitos autólogos, células dendríticas y células mononucleares.

15 En un ejemplo particular, si el ensayo se lleva a cabo para determinar si un sujeto es susceptible al desarrollo de un cáncer de mama o un cáncer de colon, se puede proporcionar una muestra de sangre, estroma o piel o tejido tumoral.

La invención se puede usar en diversos sujetos, por ejemplo animales, en particular mamíferos, preferiblemente humanos, que incluyen adultos, niños y en la etapa prenatal, aun más preferiblemente en un sujeto que tiene un ácido nucleico de TLR4 mutado o una expresión o actividad anormal de la proteína TLR4.

20 El término "sujeto" se refiere a un paciente que padece un cáncer, o a un sujeto que puede desarrollar un cáncer. El paciente, en particular el paciente de cáncer, puede ser además un paciente que se someterá a un trasplante alogénico de médula ósea.

25 El término "anormal" está asociado en la presente memoria a una desviación de las características normales. Las características normales se pueden hallar en un control, un patrón para una población, etc. Por ejemplo, cuando el estado anormal es un estado patológico tal como un cáncer, algunas fuentes adecuadas de características normales podrían incluir un individuo que no padece el cáncer, un patrón de una población de individuos que se cree que no padecen el cáncer, etc.

30 De forma similar, "anormal" se puede referir a una afección que está asociada a una enfermedad. La expresión "asociado a" incluye un riesgo incrementado de desarrollar la enfermedad, así como la enfermedad propiamente dicha. Por ejemplo, se puede describir que una cierta anomalía (tal como una anomalía en un ácido nucleico de TLR4 o de la expresión de la proteína TLR4) está asociada a la tendencia a desarrollar un cáncer.

35 Un ácido nucleico anormal, tal como un ácido nucleico de TLR4 anormal, es uno que es diferente de alguna manera respecto de un ácido nucleico normal (tipo natural). Tal anomalía incluye, pero no se limita necesariamente a, una mutación en el ácido nucleico [tal como una mutación puntual (p.ej., un polimorfismo de nucleótido simple, también denominado SNP) o delección o duplicación corta de unos pocos a varios nucleótidos], en comparación con un control o patrón. Se entenderá que estos tipos de anomalías pueden co-existir en el mismo ácido nucleico o en la misma célula o muestra. Además, se entiende que una anomalía en un ácido nucleico puede provocar una anomalía en la expresión de la proteína correspondiente. La ausencia de expresión de la proteína correspondiente es un ejemplo particular de tal anomalía.

40 Una proteína TLR4 anormal es, por tanto, una proteína cuya secuencia, configuración, o maduración es diferente de la proteína de tipo natural normal. Preferiblemente, la proteína anormal no es funcional, o sólo parcialmente funcional.

45 La expresión o actividad proteica anormal, tal como la expresión anormal de la proteína TLR4, se refiere a una expresión o actividad de una proteína que es de alguna manera diferente a la expresión o actividad de la proteína en una situación normal (tipo natural) tal como se explica adicionalmente más adelante, cuando se compara con un control o patrón. El término incluye preferiblemente la expresión de una proteína TLR4 anormal, pero también abarca la expresión anormal de una proteína TLR4 normal, debido, por ejemplo, a una transcripción anormal del mRNA que codifica una proteína TLR4 normal (tal transcripción anormal puede ser una transcripción disminuida en comparación con un nivel o cantidad de control o patrón, inducida, por ejemplo, por un tratamiento del cáncer o por el propio cáncer).

50 De forma similar, el nivel de actividad de la proteína TLR4 puede reflejar una expresión anormal de una proteína TLR4 normal, o la expresión de una proteína TLR4 anormal.

Los controles o patrones adecuados para la comparación de una muestra, para la determinación de una anomalía, incluyen muestras que se cree que son normales, así como valores de laboratorio, incluso los establecidos posiblemente de una manera arbitraria, teniendo en cuenta que tales valores pueden variar de laboratorio a laboratorio.

- 5 Los patrones y valores de laboratorio se pueden establecer basándose en un valor conocido o determinado en una población, y se pueden suministrar con un formato de gráfico o tabla que permite la comparación sencilla de los valores medidos determinados experimentalmente.

El término proteína TLR4 anormal incluye, pero no se limita necesariamente a: (1) una mutación en la proteína de manera que uno o más de los residuos de aminoácidos es diferente; (2) una delección o adición corta de uno o unos
10 cuantos residuos de aminoácidos respecto de la secuencia de la proteína; (3) una delección o adición más larga de residuos de aminoácidos, de manera que se elimina o se añade un dominio o sub-dominio completo de la proteína; (4) la expresión de una cantidad disminuida de la proteína funcional, en comparación con una cantidad de control o patrón; (5) la alteración de la localización celular o la selección del objetivo de la proteína; (6) la alteración de la expresión regulada en el tiempo de la proteína (de forma que la proteína se expresa cuando normalmente no se expresaría, o de manera alternativa no se expresa cuando normalmente se expresaría); y (7) la alteración de la
15 expresión localizada (p.ej., específica de órgano o de tejido) de la proteína (de forma que la proteína no se expresa donde normalmente se expresaría, o se expresa donde normalmente no se expresaría), cada uno comparado con un control o patrón.

El término "actividad de la proteína TLR4" abarca cualquier unión directa de TLR4 a uno de sus ligandos naturales, cualquier unión indirecta mediada o favorecida por TLR4, así como los efectos de dichas uniones directas o indirectas, en particular en los efectores posteriores de la ruta de TLR4 (MyD88, por ejemplo).

Tal como se usa en la presente solicitud, la expresión "gen de TLR4" designa el gen del receptor 4 similar a Toll en el cromosoma humano 9q32-q33, así como las variantes, análogos y fragmentos del mismo, que incluye los alelos del mismo (p.ej., mutaciones de la línea germinal) que están relacionados con la susceptibilidad al cáncer. El gen de
25 TLR4 se puede referir también a CD284, TOLL, hToll (otras denominaciones: homólogo de Drosophila de toll)

Los ácidos nucleicos recombinantes se pueden preparar mediante técnicas convencionales, que incluyen la síntesis química, ingeniería genética, técnicas enzimáticas, o una combinación de las mismas. Las secuencias del gen de TLR4 adecuadas se pueden hallar en bancos de genes, tales como el NCBI [véase la SEQ ID N°: 1 (NM 138554); GenID: 7099]. La secuencia polipeptídica correspondiente se halla con la referencia NP 612564 en el banco de
30 genes del NCBI.

La expresión "gen de TLR4" incluye cualquier variante, fragmento o análogo de SEQ ID N°s: 1 o de cualquier secuencia codificante tal como se identificó anteriormente.

Un ejemplo específico de un polipéptido TLR4 comprende todo o parte de SEQ ID N°: 2 (Ref. del NCBI: NP 612564; Ref. de swissprot: O00206)

35 Se puede hacer referencia a los polimorfismos, por ejemplo, mediante la posición de los nucleótidos en la que existe la variación (896A/G, por ejemplo), mediante el cambio de secuencia de aminoácidos provocado por la variación de nucleótidos (D299G, por ejemplo), o mediante un cambio en otra característica de la molécula de ácido nucleico que está asociada a la variación (p.ej., una alteración de una estructura secundaria tal como un bucle en horquilla, o una alteración de la afinidad de unión del ácido nucleico por las moléculas asociadas, tales como polimerasas, RNasas, etc.). A modo de ejemplo, se puede hacer referencia al polimorfismo descrito en la presente memoria en la región del gen de TLR4 mediante su locación en el gen de TLR4 [p.ej., basándose en la posición numérica del residuo variante D299G o Asp299Gly (informe de agrupación de SNP de referencia: *rs4986790*) o T399I (informe de agrupación de SNP de referencia: *rs4986791*)], basándose en la posición numérica del aminoácido variante D299G en el polipéptido TLR4, mediante el efecto que tiene en la estructura secundaria del mRNA de TLR4 o mediante el efecto
45 que tiene en la estructura terciaria del polipéptido TLR4 (p.ej., una alteración de la afinidad de unión del polipéptido por ligandos tales como HMGB1 o hsp).

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Mediante el uso de las observaciones anteriormente mencionadas, los inventores proporcionan en la presente memoria métodos de diagnóstico basados en los análisis del locus del gen de TLR4 en un sujeto. En el contexto de
50 la presente descripción, el término "diagnóstico" incluye la detección, dosificación, comparación, etc., en diversas etapas, que incluyen las etapas tempranas, pre-sintomáticas, y las etapas tardías en un sujeto como se definió anteriormente. El diagnóstico incluye en general el pronóstico, la determinación de una predisposición o riesgo de desarrollo, la caracterización de un sujeto, la definición del tratamiento más adecuado, etc.

Un método de diagnóstico particular descrito en la presente memoria es un método para determinar la sensibilidad

- de un sujeto a un tratamiento del cáncer, y dicho método comprende detectar la presencia de un ácido nucleico de TLR4 mutado o una expresión o actividad anormal de la proteína TLR4 en una muestra del sujeto. La presencia de dicho ácido nucleico de TLR4 mutado o expresión o actividad anormal de la proteína TLR4 es indicativa, de hecho, de una resistencia, es decir, una respuesta negativa o escasa del sujeto a dicho tratamiento. Una respuesta negativa se puede definir como la ausencia de una respuesta eficaz. Esto significa que el tratamiento no parece ser eficaz para prevenir o tratar un cáncer. En otras palabras, el propio cáncer parece resistente a dicho tratamiento. Una respuesta escasa es una respuesta significativamente inferior a la respuesta observada en los pacientes que portan un TLR4 de tipo natural o que expresan una proteína TLR4 normal.
- Opcionalmente, dicho método comprende una etapa previa de proporcionar una muestra, como se definió previamente, de un sujeto.
- Según la presente invención, el tratamiento hacia el cual se puede medir la sensibilidad de un sujeto se selecciona preferiblemente de al menos uno de quimioterapia, que incluye por ejemplo la administración de una antraciclina, tal como DOX (doxorubicina, Idarrubicina, 4 Epirubicina, mitoxantrona), oxali-platino, cis-platino (PLAT), y rayos X (RX).
- Los métodos de diagnóstico, que analizan y predicen la sensibilidad a un tratamiento tal como se menciono anteriormente, se pueden usar para determinar si un sujeto debería ser tratado con un fármaco de tratamiento particular. Por ejemplo, si el método indica una probabilidad de que un sujeto responda positivamente a una antraciclina, PLAT y/o RX, dicho(s) tratamiento(s) se puede(n) administrar al individuo. A la inversa, si el método indica que un individuo probablemente responderá negativamente a dicho tratamiento, se puede prescribir un curso de tratamiento alternativo.
- Los inventores también proporcionan en la presente memoria métodos de diagnóstico para determinar una predisposición a un cáncer o una probabilidad incrementada de tener un cáncer en un sujeto, y el método comprende detectar la presencia de un ácido nucleico de TLR4 mutado o una expresión o actividad anormal de la proteína TLR4 en una muestra del sujeto.
- La mutación de TLR4 se puede determinar en la secuencia genómica de TLR4 o en el ARN.
- La mutación detectada puede ser una mutación innata o adquirida.
- La mutación en el locus del gen de TLR4 puede ser cualquier forma de mutación(es), delección(es), reordenamiento(s) y/o inserciones en la región codificante y/o no codificante del locus, sola o en combinación(es) diversa(s). Las mutaciones incluyen de manera más específica mutaciones puntuales. Las delecciones pueden abarcar cualquier región de uno, dos o más residuos en una porción codificante o no codificante del locus del gen, tal como de un residuo hasta el gen o locus completo. Las delecciones típicas afectan a regiones menores, tales como dominios (intrones) o secuencias o fragmentos repetidos de menos de alrededor de 20 pares de bases consecutivos, aunque también se pueden dar delecciones mayores. Las inserciones pueden abarcar la adición de uno o varios residuos en una porción codificante o no codificante del locus del gen. Las inserciones pueden comprender en general una adición de entre 1 y 20 pares de bases en el locus del gen. El reordenamiento incluye la inversión de secuencias. La mutación del locus del gen de TLR4 puede dar como resultado la creación de codones de parada, mutaciones del marco de lectura, sustituciones de aminoácidos, corte y empalme o procesamiento del ARN particular, inestabilidad del producto, producción de polipéptidos truncados, etc. La alteración puede dar como resultado la producción de un polipéptido TLR4 con una función, estabilidad, selección del objetivo o estructura alteradas. La alteración puede provocar también una reducción de la expresión de la proteína o, de manera alternativa, un incremento de dicha producción.
- En una realización particular del método según la presente invención, la alteración del gen de TLR4 se selecciona de una mutación, una delección y una inserción puntuales en el gen de TLR4 o el producto de expresión correspondiente, más preferiblemente una mutación puntual, aún más preferiblemente un polimorfismo de nucleótido simple (SNP).
- La presente invención describe en particular un ácido nucleico de TLR4 mutado que comprende una mutación puntual, preferiblemente la secuencia de tipo natural de TLR4 (preferiblemente de TLR4 humano) que comprende una mutación puntual, preferiblemente un polimorfismo de nucleótido simple (SNP) que conduce a la sustitución de asparagina por glicina en la posición 299.
- Un método particular según la presente invención comprende por tanto detectar la presencia de una secuencia de TLR4 mutada que comprende una mutación puntual, preferiblemente un polimorfismo de nucleótido simple (SNP) que conduce a la sustitución de asparagina por glicina en la posición 299 o a la sustitución de treonina por isoleucina en la posición 399 en una muestra del sujeto.

Un ejemplo particular de una secuencia de ácido nucleico humano de TLR4 mutado comprende una secuencia de

TLR4 que comprende el Polimorfismo D299G (informe de agrupación de SNP de referencia: rs4986790) o una secuencia de TLR4 que comprende el Polimorfismo T399I (informe de agrupación de SNP de referencia: rs4986791).

5 Los métodos descritos en la presente memoria pueden comprender además una etapa cuyo objetivo es determinar si el sujeto es homocigoto o heterocigoto para el polimorfismo.

En los métodos de esta invención, se puede determinar cualquier mutación o alteración en el gen de TLR4 en combinación con otros marcadores, tales como otras mutaciones o alteraciones en cualquier otro gen o proteína.

10 La presencia de un TLR4 mutado en la muestra se puede detectar a través del genotipado de la muestra. La detección se puede llevar a cabo secuenciando todo o parte del gen de TLR4, mediante el uso de hibridación y/o amplificación selectiva de todo o parte del gen de TLR4. Más preferiblemente, se lleva a cabo una amplificación específica del gen de TLR4 antes de la etapa de identificación de la mutación.

En una realización particular descrita en la presente memoria, se detecta la presencia de un ácido nucleico de TLR4 mutado mediante el uso de digestión de restricción, secuenciación, hibridación selectiva y/o amplificación selectiva.

15 Una realización específica comprende la detección de la presencia de al menos un SNP en la secuencia del gen de TLR4 de un sujeto.

20 En otra realización, el método comprende detectar la presencia de una expresión anormal de ARN de TLR4. La expresión anormal de ARN incluye la presencia de una secuencia de ARN mutada, la presencia de un corte y empalme o procesamiento de ARN anormal, la presencia de una cantidad anormal de ARN, etc. Esto se puede detectar mediante diversos métodos conocidos en la técnica, que incluyen la digestión de restricción, la secuenciación de todo o parte del ARN de TLR4 o la hibridación selectiva o amplificación selectiva de todo o parte de dicho ARN, por ejemplo.

25 En una realización adicional, el método comprende detectar la presencia de una expresión anormal de polipéptido o proteína TLR4. La expresión anormal de la proteína o polipéptido TLR4 incluye la presencia de una secuencia polipeptídica mutada, la presencia de una cantidad anormal de polipéptido TLR4, la presencia de una distribución tisular anormal, etc. Esto se puede detectar mediante diversos métodos conocidos en la técnica, que incluyen la secuenciación y/o unión a ligandos específicos (tales como anticuerpos), por ejemplo.

30 Se pueden usar otros métodos adecuados para detectar o cuantificar la expresión o la secuencia anormal de un gen o ARN de TLR4. Estos incluyen los oligonucleótidos específicos de alelos (ASO), la amplificación específica de alelos, transferencia de Southern (para ADNs), transferencia de Northern (para ARNs), análisis de la conformación monocatenaria (SSCA), PFGE, hibridación in situ fluorescente (FISH), migración en geles, electroforesis en gel desnaturizante fijado, análisis heterodúplex, protección de RNasas, escisión química de emparejamientos incorrectos, ELISA, radio-inmunoensayos (RIA) y ensayos inmuno-enzimáticos (IEMA).

35 Como se explicó previamente, en una realización particular, el método comprende detectar o determinar la presencia de un ácido nucleico de TLR4 anormal en una muestra del sujeto. Esto se puede llevar a cabo como se explicó previamente mediante el uso de digestión de restricción, secuenciación, hibridación selectiva y/o amplificación selectiva de los ácidos nucleicos presentes en dicha muestra.

La digestión de restricción se puede llevar a cabo mediante el uso de métodos y enzimas muy conocidas en la técnica.

40 La secuenciación se puede llevar a cabo mediante el uso de métodos muy conocidos en la técnica, mediante el uso de secuenciadores automáticos. La secuenciación se puede llevar a cabo con el gen de TLR4 completo o, más preferiblemente, en dominios específicos del mismo, en general aquellos que se sabe o se sospecha que portan mutaciones perjudiciales u otras alteraciones.

Se proporcionan ejemplos de cebadores específicos que amplifican la región que comprende el polimorfismo Asp299Gly (A896G) en la presente memoria:

45 TLR4_Directo 5' GATTAGCATACTTAGACTACTACCTCCATG 3' (SEQ ID N°:4),

TLR4_Inverso 5' TGTGGGAAACGTTCCAAATTTACA 3' (SEQ ID N°:5).

Estas secuencias se pueden usar para amplificar un fragmento de 86 pb.

Otro ejemplo de un grupo de cebadores (que se pueden usar para amplificar un fragmento de 101 pb) se proporciona en la parte experimental de la presente solicitud.

50 Otra mutación implicada en la unión al ligando es Thr399Ile.

También se proporcionan ejemplos de cebadores específicos que amplifican la región que comprende el polimorfismo Thr399Ile (C1196T) en la presente memoria:

TLR4_directo 5'-TGAGTTTCAAAGGTTGCTGTTCTC-3' (SEQ ID N°: 6),

TLR4_inverso 5'-AGGAATACTGAAAACCTCACTCATTTGTT-3' (SEQ ID N°:7).

5 Estas secuencias se pueden usar para amplificar un fragmento de 178 pb.

Los ASO de Thr399Ile son 5'-[6-FAM]-TTAGGCTGGTTGTCC-[MGB][NFQ]-3' (SEQ ID N°: 8) y 5'-[VIC™]-TTAGGCTGATTGTCC-[MGB][NFQ]-3' (SEQ ID N°: 9), respectivamente.

La amplificación se basa en la formación de híbridos específicos entre secuencias de ácidos nucleicos complementarios que sirven para iniciar la reproducción del ácido nucleico.

10 La amplificación se puede llevar a cabo según los diversos métodos conocidos en la técnica, tales como mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación por desplazamiento de cadenas (SDA), amplificación basada en la secuencia del ácido nucleico (NASBA) y polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP).

15 Estas técnicas se pueden llevar a cabo mediante el uso de reactivos y protocolos disponibles comercialmente. Las técnicas preferidas usan PCR o PCR-SSCP específicas de alelo. La amplificación requiere normalmente el uso de cebadores específicos del ácido nucleico para iniciar la reacción.

Los cebadores de ácidos nucleicos útiles para amplificar las secuencias del gen o locus de TLR4 son capaces de hibridar específicamente con una porción del locus del gen de TLR4 que flanquea una región objetivo de dicho locus, y dicha región objetivo está mutada en ciertos sujetos que tienen un cáncer o que tienen riesgo de desarrollar un

20 cáncer.

Los cebadores que se pueden usar para amplificar la región objetivo de TLR4 se pueden diseñar basándose en la secuencia genómica o de ARN de TLR4 y, en particular, en la secuencia de SEQ ID N°: 1 (NM 138554; GeneID: 7099).

25 Otro objetivo particular descrito en la presente memoria consiste en un cebador de ácido nucleico útil para amplificar secuencias del gen o locus de TLR4 que incluyen las regiones circundantes. Tales cebadores preferiblemente son complementarios, e hibridan específicamente, a las secuencias de ácido nucleico en los locus del gen de TLR4. Los cebadores particulares son capaces de hibridar específicamente con una porción de los locus del gen de TLR4 que flanquean una región objetivo de dicho locus, y dicha región objetivo está alterada en ciertos sujetos que tienen un cáncer, una predisposición a un cáncer o una probabilidad incrementada de tener un cáncer.

30 Se describe además un cebador de ácido nucleico en la presente memoria, y dicho cebador es complementario e hibrida específicamente a una porción de una secuencia codificante de TLR4 (p.ej., gen o ARN) mutada en ciertos sujetos que tienen un cáncer, una predisposición a un cáncer o una probabilidad incrementada de tener un cáncer. A este respecto, los cebadores particulares son específicos para las secuencias mutadas de un gen o ARN de TLR4. Mediante el uso de tales cebadores, la detección de un producto de amplificación indica la presencia de una

35 mutación en el locus del gen de TLR4. En contraste, la ausencia de producto de amplificación indica que la mutación específica no está presente en la muestra.

Un cebador de ácido nucleico típico utilizable en los métodos descritos en la presente memoria es un cebador que es complementario y que hibrida específicamente a una secuencia de TLR4 mutada que comprende una mutación puntual, en general una secuencia de TLR4 de tipo natural que comprende una mutación puntual, preferiblemente un

40 polimorfismo de nucleótido simple (SNP) que conduce a la sustitución de asparagina por glicina en la posición 299 o a la sustitución de treonina por isoleucina en la posición 399.

Los cebadores particulares utilizables para el polimorfismo Asp299Gly en los métodos descritos en la presente memoria comprenden toda o una parte característica de una secuencia seleccionada, por ejemplo, de TLR4_Directo 5' GATTAGCATACCTTAGACTACTACCTCCATG 3' (SEQ ID N°: 10), TLR4_Inverso 5' TGTGGGAAACGTTCCAAATT

45 TACA 3' (SEQ ID N°: 11) o de directo 5'-CCATTGAAGAATTCCGATTAGCATA-3' (SEQ ID N°: 12) e inverso 5'-CACTCACCAGGGAAAATGAAGAA-3' (SEQ ID N°: 13).

Los cebadores particulares utilizables para el polimorfismo Thr399Ile en los métodos descritos en la presente memoria comprenden toda o una parte característica de una secuencia seleccionada, por ejemplo, de TLR4_directo 5'-TGAGTTTCAAAGGTTGCTGTTCTC-3' (SEQ ID N°: 14), TLR4_inverso 5'- AGGAATACTGAAAACCTCACTCAT

50 TGTT-3' (SEQ ID N°: 15).

Los métodos de detección mediante hibridación se basan en la formación de híbridos específicos entre secuencias

de ácidos nucleicos complementarias que sirven para detectar la(s) mutación(es) en la secuencia de ácido nucleico.

Una técnica de detección particular implica el uso de una sonda de ácido nucleico específica para el gen o ARN de TLR4 de tipo natural o mutado, seguido por la detección de la presencia de un híbrido. La sonda puede estar en suspensión o inmovilizada en un sustrato o soporte (como en las técnicas de matrices de ácidos nucleicos). La sonda está marcada en general para facilitar la detección de los híbridos.

Los métodos típicos de detección de la hibridación comprenden las etapas siguientes de poner en contacto la muestra del sujeto con una sonda de ácido nucleico específica para un ácido nucleico de TLR4 mutado (preferiblemente el locus del gen), y determinar la formación de un híbrido. En una realización especialmente preferida, el método comprende poner en contacto simultáneamente la muestra con un grupo de sondas que son específicas, respectivamente, para el locus del gen de TLR4 de tipo natural y para las diversas formas mutadas del mismo. En esta realización, es posible detectar directamente la presencia de diversas formas de mutaciones en los locus del gen de TLR4 en la muestra. Además, las diversas muestras de diversos sujetos se pueden tratar en paralelo.

Un método particular descrito en la presente memoria comprende las etapas de determinar la sensibilidad de un sujeto a un tratamiento de un cáncer, en particular a un tratamiento quimioterápico, que comprende (a) obtener del sujeto una muestra de ensayo de ADN que comprende una secuencia de TLR4, (b) poner en contacto la muestra de ensayo con al menos una sonda de ácido nucleico, en el que dicho ácido nucleico es complementario e hibrida específicamente con una secuencia de TLR4 mutada para formar una muestra de hibridación, (c) mantener la muestra de hibridación en condiciones suficientes para que se dé la hibridación específica de la secuencia de TLR4 con la sonda de ácido nucleico, y (d) detectar si hay hibridación específica de la secuencia de TLR4 con la sonda de ácido nucleico. La hibridación específica de la secuencia de TLR4 con la sonda de ácido nucleico identifica, de hecho, el cáncer como resistente a dicho tratamiento en el sujeto.

Preferiblemente, la secuencia de TLR4 mutada está asociada a la resistencia a un tratamiento. Dicho tratamiento se selecciona preferiblemente de una quimioterapia, por ejemplo que incluye la administración de una antraciclina, tal como DOX, y/o oxali-platino o cis-platino (PLAT), y una radioterapia, que incluye preferiblemente rayos X (RX). El tratamiento puede comprender además una quimioterapia combinada con una radioterapia.

También se describe en la presente memoria un método para detectar o determinar una predisposición a un cáncer o una probabilidad incrementada de tener un cáncer en un sujeto. Dicho método comprende las etapas siguientes de (a) obtener del sujeto una muestra de ensayo de ADN que comprende una secuencia de TLR4, (b) poner en contacto la muestra de ensayo con al menos una sonda de ácido nucleico, en el que dicho ácido nucleico es complementario a, e hibrida específicamente con, una secuencia de TLR4 mutada para formar una muestra de hibridación, (c) mantener la muestra de hibridación en condiciones suficientes para la hibridación específica de la secuencia de TLR4 con la sonda de ácido nucleico, y (d) detectar si hay una hibridación específica de la secuencia de TLR4 con la sonda de ácido nucleico. La hibridación específica de la secuencia de TLR4 con la sonda de ácido nucleico indica, de hecho, una predisposición al cáncer o una probabilidad incrementada de tener un cáncer en el sujeto.

Las condiciones de hibridación rigurosas típicas incluyen temperaturas superiores a 30 °C, preferiblemente superiores a 35 °C, más preferiblemente mayores de 42 °C, y/o una salinidad menor de alrededor de 500 mM, preferiblemente menor de 200 mM. Las condiciones de hibridación pueden ser ajustadas por una persona experta modificando la temperatura, salinidad y/o la concentración de otros reactivos tales como SDS, SSC, etc.

Para el fin de la presente descripción, las "condiciones rigurosas" abarcan las condiciones bajo las cuales la hibridación se dará solamente si hay menos de un 25% de emparejamientos incorrectos entre la molécula de hibridación y la secuencia objetivo.

En una realización preferida, la secuencia de TLR4 mutada comprende una mutación puntual, preferiblemente una mutación puntual seleccionada de un polimorfismo de nucleótido simple (SNP) que conduce a una sustitución de asparagina por glicina en la posición 299 y un polimorfismo de nucleótido simple (SNP) que conduce a una sustitución de treonina por isoleucina en la posición 399.

Una sonda se refiere en la presente memoria a una secuencia polinucleotídica que es complementaria a, y capaz de hibridación específica con, (una porción seleccionada como objetivo de) un gen o ARN de TLR4, y que es adecuada para detectar polimorfismos de polinucleótidos asociados a los alelos de TLR4, en particular con un polimorfismo que conduce a la sustitución de asparagina por glicina en la posición 299 o a la sustitución de treonina por isoleucina en la posición 399, lo cual predispone o está asociado al cáncer. Las sondas son preferiblemente perfectamente complementarias al gen de TLR4, ARN, o porción seleccionada como objetivo del mismo. Las sondas comprenden en general ácidos nucleicos monocatenarios de entre 25 a 100 nucleótidos de longitud, preferiblemente de entre 20 y 50 nucleótidos de longitud. Se debería entender que también se pueden usar sondas más largas. Una sonda preferida es una molécula de ácido nucleico monocatenaria de entre 25 a 30 nucleótidos de longitud, que puede

hibridar específicamente con una región de un ácido nucleico de TLR4 (por ejemplo gen o ARN) que porta una alteración.

En la presente memoria se describen sondas de ácido nucleico específicas para una secuencia de TLR4 anormal (p.ej., mutada) (gen o ARN en particular), es decir, una sonda de ácido nucleico que hibrida de manera específica con dicha secuencia de TLR4 anormal y que básicamente no hibrida con una secuencia de TLR4 normal (referencia). La especificidad indica que la hibridación a la secuencia objetivo genera una señal específica que se puede distinguir de la señal generada a través de la hibridación inespecífica. Se prefieren las secuencias perfectamente complementarias para diseñar sondas. Se debería entender, sin embargo, que se pueden tolerar ciertos emparejamientos incorrectos, con tal de que la señal específica se pueda distinguir de la hibridación inespecífica.

La secuencia de la sonda se puede preparar fácilmente basándose en cualquier secuencia del gen o ARN de TLR4 que porte una mutación, en particular una mutación puntual tal como un SNP, asociada a la sensibilidad de un sujeto a un tratamiento del cáncer, a la presencia de un cáncer, a una predisposición hacia un cáncer o a una probabilidad incrementada de tener un cáncer.

También es adecuado generar sondas y cebadores basados en fragmentos o porciones de estas moléculas de ácidos nucleicos, por ejemplo regiones que abarcan el polimorfismo identificado en el nucleótido 896 (A896G) y en el nucleótido 1196 (C1196T) en la secuencia de TLR4.

Una secuencia de TLR4 mutada típica utilizable de hecho en los métodos, descrita en la presente memoria, comprende la secuencia de tipo natural de TLR4 y una mutación puntual, preferiblemente un polimorfismo de nucleótido simple (SNP) que conduce a la sustitución de asparagina por glicina en la posición 299 o a la sustitución de treonina por isoleucina en la posición 399.

Una sonda particular descrita en la presente memoria comprende todo o una parte característica de una secuencia de TLR4 que comprende el Polimorfismo D299G (informe de agrupación de SNP de referencia: rs4986790) o todo o una parte característica de una secuencia de TLR4 que comprende el Polimorfismo T399I (informe de agrupación de SNP de referencia: rs4986791).

Se pueden llevar a cabo sustituciones de nucleótidos, así como modificaciones químicas de la sonda. Tales modificaciones químicas se pueden realizar para incrementar la estabilidad de los híbridos (p.ej., grupos intercalantes) o para marcar la sonda. Los ejemplos típicos de marcadores incluyen, sin limitación, isótopos radiactivos, sustratos de enzimas, cofactores, ligandos, agentes quimioluminiscentes o fluorescentes, haptenos, y enzimas. Se discuten métodos para el marcaje y consejos para la elección de los marcadores adecuados para diversos fines, p.ej., en Sambrook et al. (en Molecular Cloning. A Laboratory Manual, CSHL, Nueva York, 1989) y Ausubel et al. (en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York, 1998).

Los inventores describen en la presente memoria el uso de una sonda o cebadores de ácido nucleico como se describieron anteriormente en un método para determinar la sensibilidad de un sujeto a un tratamiento del cáncer, en particular a un tratamiento quimioterápico, o en un método para detectar o determinar una predisposición a un cáncer o una probabilidad incrementada de tener un cáncer en un sujeto.

Los métodos descritos en la presente memoria para determinar la sensibilidad de un sujeto a un tratamiento del cáncer, en particular a un tratamiento quimioterápico, o para determinar una predisposición a un cáncer en un sujeto se pueden llevar a cabo además, como se indicó anteriormente, detectando una proteína TLR4 anormal o expresión anormal de proteína TLR4, que pueden ser innatas o adquiridas.

Los métodos preferidos comprenden las etapas de poner en contacto la muestra con un ligando identificado para la unión a una proteína TLR4 (un TLR4 normal, es decir, un TLR4 de tipo natural, o un TLR4 anormal) y determinar si se da o no la unión entre el TLR4 del sujeto y dicho ligando de TLR4, por ejemplo determinando la formación de un complejo entre dicho TLR4 del sujeto y dicho ligando de TLR4.

Un ligando es un agente que se une específicamente a un objetivo definido.

El término "específicamente" significa que menos del 10%, preferiblemente menos del 5% del agente se une a un objetivo diferente de dicho objetivo definido. Así, un ligando específico de la proteína TLR4 se une sustancialmente solamente a la proteína TLR4. Se pueden usar diferentes tipos de ligandos, tales como anticuerpos específicos y otros agentes (y fragmentos funcionales de los mismos) que se unen sustancialmente solamente a la proteína TLR4.

Un ligando preferido descrito en la presente memoria es un ligando identificado para unirse específicamente a una proteína o polipéptido TLR4 anormal.

Se pueden producir anticuerpos anti-proteína TLR4 mediante el uso de procedimientos habituales descritos en varios textos, que incluyen Harlow y Lane (Antibodies, A Laboratory Manual, CSHL, Nueva York, 1988). La

determinación de que un ligando particular se une sustancialmente solamente a la proteína TLR4 se puede realizar fácilmente usando o adaptando procedimientos rutinarios. Un ensayo *in vitro* adecuado utiliza el procedimiento de transferencia de Western (descrito en muchos textos habituales, lo que incluye Harlow y Lane (Antibodies, A Laboratory Manual, CSHL, Nueva York, 1988)). Se puede usar la transferencia de Western para determinar si un agente de unión a la proteína TLR4 dado, tal como un anticuerpo monoclonal anti-proteína TLR4, se une sustancialmente solamente a la proteína TLR4.

Un anticuerpo en la presente memoria designa un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, así como fragmentos o derivados de los mismos que tienen sustancialmente la misma especificidad hacia el antígeno.

Los fragmentos más cortos de anticuerpos también pueden servir como agentes de unión específica. Por ejemplo, los FAbs, Fvs, y Fvs de cadena simple (SCFvs) que se unen a TLR4 serían ligandos de unión específica a TLR4.

Estos fragmentos de anticuerpos se definen como sigue: (1) FAb, cuyo fragmento contiene un fragmento de unión al antígeno monovalente de una molécula de anticuerpo producido mediante la digestión del anticuerpo completo con la enzima papaína para proporcionar una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada; (2) FAb', el fragmento de una molécula de anticuerpo obtenido tratando un anticuerpo completo con pepsina, seguido de reducción, para proporcionar una cadena ligera intacta y una porción de la cadena pesada; se obtienen dos fragmentos FAb' por molécula de anticuerpo; (3) (FAb')₂, el fragmento del anticuerpo obtenido tratando un anticuerpo completo con la enzima pepsina sin reducción posterior; (4) F(Ab')₂, un dímero de dos fragmentos FAb' unidos por dos puentes disulfuro; (5) Fv, un fragmento modificado mediante ingeniería genética que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada expresadas en forma de dos cadenas; y (6) un anticuerpo de cadena simple ("SCA"), una molécula modificada mediante ingeniería genética que contiene la región variable de la cadena ligera, la región variable de la cadena pesada, unidas mediante un ligador polipeptídico adecuado en forma de una molécula de cadena simple fusionada genéticamente. Los métodos para producir estos fragmentos son rutinarios.

Un anticuerpo particular presentado en la presente memoria es específico para una proteína o polipéptido TLR4 anormal, en general un polipéptido TLR4 mutado, tal como se definió previamente y como se ejemplifica en la presente memoria. Preferiblemente, el anticuerpo comprende todo o una parte característica de una secuencia seleccionada del dominio extracelular de TLR4. El dominio extracelular de TLR4 se representa en SEQ ID N°: 3.

Otro anticuerpo particular utilizable en la presente invención es específico de un polipéptido TLR4 de tipo natural.

Así, en una realización específica, la muestra se pone en contacto con un anticuerpo específico para una proteína o polipéptido TLR4 anormal, y se determina la formación de un complejo inmunitario. Se pueden usar diversos métodos para detectar un complejo inmunitario, tales como ELISA, radio-inmunoensayos (RIA) y ensayos inmunoenzimáticos (IEMA).

Otros ligandos identificados para la unión a TLR4 se pueden seleccionar, por ejemplo, de (i) un ligando de TLR4 inducido en células tumorales mediante una antraciclina, mediante cis-platino, oxali-platino o mediante rayos X, (ii) una célula apoptótica por DOX o PLAT o rayos X y (iii) el lipopolisacárido (LPS) de bacterias gramnegativas.

El ligando inducido en las células tumorales mediante una antraciclina, mediante oxali-platino, mediante cis-platino o mediante rayos X se puede detectar en la superficie de una célula tumoral mediante el uso, en particular, de una sonda seleccionada de un TLR4Fc (fragmento Fc de anticuerpo anti-TLR4), una TLR4Ig (inmunoglobulina anti-TLR4) y un anticuerpo anti-HMGB1. La sonda preferiblemente está marcada. Este ensayo incluye preferiblemente células dendríticas alogénicas para aumentar la secreción de dicho ligando de TLR4.

En la presente memoria se describe un método para detectar la carencia de inmunogenicidad de las células tumorales a través de la ruta de TLR4, y dicho método comprende poner en contacto células tumorales autólogas que se han tratado con una antraciclina, cis-platino, oxali-platino o rayos X y que expresan un ligando de TLR4, un TLR4Fc (fragmento Fc de anticuerpo anti-TLR4), o una TLR4Ig (inmunoglobulina anti-TLR4), y la ausencia de unión de dicho TLR4Fc o TLR4Ig se correlaciona con la carencia de inmunogenicidad de la célula tumoral.

Se pueden aplicar métodos muy conocidos para el experto de la técnica, tales como un ensayo de unión ELISA o transferencia de Western (WB) en los métodos descritos anteriormente.

Aunque se puede dar una unión inespecífica, la unión al polipéptido TLR4 objetivo se da con una afinidad superior, y se puede distinguir de manera fiable de la unión inespecífica.

La puesta en contacto entre los ácidos nucleicos o polipéptidos de la muestra y el ligando o la sonda descrita previamente se puede llevar a cabo en cualquier dispositivo adecuado, tal como una placa, tubo, pocillo, vidrio, etc. En las realizaciones específicas, la puesta en contacto se lleva a cabo en una matriz de ácidos nucleicos o en una matriz de sondas o ligandos específicos, tal como una sonda de ácido nucleico presente en una matriz de nucleótidos.

- Los ejemplos de ligandos conocidos son HMGB1, GMP, LPS, hialuronano, fibrinógeno, fibronectina, hsp 60 o hsp 70, que se pueden usar en una composición farmacéutica como se describió en la presente memoria. Son especialmente útiles para tratar o prevenir un cáncer en un sujeto que tiene un ácido nucleico de TLR4 normal o no mutado o una expresión o actividad normal de la proteína TLR4, pero sin la inducción de ligandos de TLR4 tras el tratamiento con antraciclinas, cis- platino, oxali-platino o rayos X.
- También se describe en la presente memoria un método que comprende la determinación de la actividad de TLR4 anormal detectando una presentación cruzada anormal de células tumorales alogénicas, en particular células de melanoma, sometiendo a células dendríticas autólogas (CD), a un clon de linfocitos T citotóxicos (CTL).
- El tumor o célula cancerosa alogénica puede ser, por ejemplo, una célula tumoral tratada con antraciclina, cis-platino, oxali-platino o rayos X. En un ejemplo particular, la célula tumoral alogénica es un corpúsculo apoptótico.
- El ligando, como la sonda previamente descrita, puede estar en suspensión o inmovilizado en un sustrato o soporte.
- El sustrato puede ser un sustrato sólido o semi-sólido tal como cualquier soporte que comprende vidrio, plástico, nilon, papel, metal, polímeros y similares. El sustrato puede ser de diversas formas y tamaños, tal como un portaobjetos, una membrana, una microesfera, una columna, un gel, etc.
- La puesta en contacto se puede realizar en cualquier condición adecuada para que se forme un complejo entre el reactivo (ligando o sonda) y los ácidos nucleicos o polipéptidos de la muestra.
- La muestra se puede poner en contacto así de manera simultánea, o en paralelo, o secuencialmente, con los diversos ligandos o sondas específicas para formas diferentes de un ácido nucleico o polipéptido TLR4, tales como una forma de tipo natural y diversas formas anormales de la misma.
- TLR4 se expresa principalmente en las células mieloides *in vivo* [por ejemplo, monocitos, células dendríticas (CD)]. La señalización de TLR4 es crucial para desencadenar la secreción de citocinas proinflamatorias (IL-1b, IL-6, TNF α e IL-12, por ejemplo) y acelerar la maduración de las CD.
- En la presente solicitud, la expresión o actividad anormal de TLR4 también se puede correlacionar así con la ausencia o presencia de una secreción de, o con una alteración en el nivel celular de un compuesto seleccionado, por ejemplo, de IL-6, TNF α , IL-1b, IL-2 o IL-12p40, Rantes, IP-10 y MIP1a. Tal nivel celular de IL-6, TNF α , IL-1b, IL-2 o IL-12p40 se puede medir en los métodos descritos en la presente memoria por los inventores. Tal medida se puede comparar además con un nivel normal. El nivel medido se compara preferiblemente con un nivel de referencia medido a partir de un cultivo que comprende (i) monocitos y/o células dendríticas (CD) y (ii) un ligando de TLR4, preferiblemente HMGB1.
- La expresión o actividad de TLR4 anormal se puede correlacionar también con una transcripción anormal de TLR4 normal. La transcripción anormal puede ser una expresión incrementada en comparación con una cantidad o nivel de control o patrón. También puede ser una expresión disminuida en comparación con una cantidad o nivel de control o patrón, por ejemplo inducida mediante un tratamiento del cáncer o por el propio cáncer.
- La presente descripción proporciona un método que comprende determinar la expresión de la proteína TLR4 anormal midiendo el nivel celular de mRNA que codifica un TLR4 normal, en el que un nivel disminuido comparado con un nivel de control o patrón se correlaciona con una expresión anormal de la proteína TLR4. El nivel de mRNA se puede medir, *ex vivo* o *in vitro*, en monocitos o células dendríticas aisladas del paciente.
- Tal método puede incluir una etapa que comprende el uso de RT-PCR (transcripción inversa - reacción en cadena de la polimerasa).
- Una expresión o actividad anormal de TLR4 se puede detectar además midiendo el nivel celular de IFN γ (derivado de las células NK) en un cocultivo que comprende células dendríticas (CD) y células citotóxicas naturales (NK). Las CD son células autólogas del sujeto a analizar. Las células NK pueden ser autólogas o alogénicas. El cocultivo se puede llevar a cabo, en paralelo, en presencia de al menos un ligando de TLR4, y en ausencia de cualquier ligando de TLR4.
- El nivel medido de IFN γ de interés se compara además con un nivel de referencia. Los inventores descubrieron, de hecho, que un nivel anormal de IFN γ (valor disminuido en comparación con patrones conocidos) o la ausencia de IFN γ se correlaciona con una expresión anormal de TLR4.
- Las interleucinas y la secreción de IFN γ se pueden determinar mediante métodos muy conocidos en la técnica, tales como ELISA o tinción de citocinas intracelulares en citometría de flujo.
- La expresión o actividad anormal de TLR4 se puede detectar también midiendo el pH endosómico de fagocitos que exhiben o no la mutación de TLR4. Dicho pH se puede comparar además con un pH normal. Un pH anormal se

correlaciona con una expresión anormal de TLR4. Un pH inferior a 7, preferiblemente inferior a 6, 5 ó 4, se correlaciona con una actividad anormal de TLR4.

Sin desear limitarse a ninguna teoría particular, los inventores creen que los mecanismos mediante los cuales TLR4 podría afectar a la sensibilidad a antraciclina/oxali-platino/cis-platino/RX implican probablemente a los precursores de médula ósea, concretamente las células dendríticas (CD). De hecho, las CD de médula ósea TLR4-/- sometidas a un pulso con células tumorales apoptóticas inducidas con DOX no pueden sensibilizar a las células T sin exposición previa en ratones TLR4-/-, mientras sus homólogos de CD TLR4+/+ sí pueden hacerlo. Sin embargo, las deficiencias en la sensibilización de las células T provocadas por la disfunción de TLR4 no afectan a los procesos de captación o maduración, sino al transporte y degradación de antígenos dentro de los compartimentos endosómicos de las CD. Por lo tanto, TLR4 controla la eficacia de la apoptosis inmunógena desencadenada por la quimio- o radio-terapia en hospedadores que albergan un cáncer.

Los inventores describen así en la presente memoria un método que comprende determinar la actividad anormal de TLR4 detectando una presentación cruzada anormal de células tumorales alogénicas, sometiendo a las células dendríticas (CD) autólogas a un clon de linfocitos citotóxicos (CTL) o a un clon de células T CD4+, preferiblemente respectivamente de manera dependiente de la clase I o clase II del MHC.

En un ejemplo particular, las CD que expresan HLA-A*02 se pueden someter a un pulso, por ejemplo, con una línea celular tumoral de melanoma alogénica inducida mediante rayos X (HLA-A2 negativa) que contiene antígenos MelanA/Mart1. Tales CD se podrían incubar con un clon de CTL específico de Mart1 restringido por HLA-A2 que producirá IFN γ si se da la presentación cruzada *in vitro*. Mientras en los individuos de tipo natural para TLR4, se dará la presentación cruzada y el IFN γ se medirá en EIA, en CD con TLR4 Asp299Gly o TLR4 Thr399Ile, la presentación cruzada no se dará a ninguna dosis de material apoptótico pulsado en CD.

Los inventores describen además un método que comprende determinar la actividad anormal de TLR4 detectando la fusión entre endosomas tardíos y lisosomas.

Este método se dirige a detectar, en microscopía confocal o microscopía electrónica, la cinética de la fusión de compartimentos endosómicos (que comprenden fagocitos, células tumorales apoptóticas por rayos X captadas, preferiblemente células tumorales marcadas) con lisosomas (por ejemplo, marcados con Ab anti-LAMP en FITC). La fusión permitirá una cuantificación precisa de compartimentos positivos dobles dentro de una célula, por ejemplo, a los 15 min, 30 min, 1 hora y 3 horas. En CD TLR4-/-, la colocación de compartimentos que contienen corpúsculos muertos con lisosomas se acelera significativamente.

Los métodos descritos en la presente solicitud se llevan a cabo así, como se indicó previamente, preferiblemente en una muestra que comprende células que expresan TLR4 en condiciones normales, preferiblemente seleccionadas de monocitos autólogos, células dendríticas y células mononucleares.

Los inventores describen además en la presente memoria un método de diagnóstico que comprende la determinación del estado mutacional de TLR4 de un sujeto que experimentará un trasplante de médula ósea.

También se proporciona en la presente memoria un equipo para el uso en un método para determinar la sensibilidad de un sujeto a un tratamiento de un cáncer, en particular a un tratamiento quimioterápico del cáncer, tal como se definió previamente, o para el uso en un método para determinar la predisposición a un cáncer en un sujeto. Este equipo comprende una sonda de ácido nucleico, como se describió previamente, que hibrida específicamente con una secuencia de TLR4 anormal, preferiblemente mutada, como se describió previamente, que identifica el cáncer como resistente a dicho tratamiento en el sujeto, o que está asociado a una predisposición incrementada al cáncer o una probabilidad incrementada de tener un cáncer.

El equipo puede comprender además un cebador y/o un ligando, tal como un anticuerpo, como se describió previamente. El equipo puede comprender además reactivos y/o un protocolo para llevar a cabo una hibridación, amplificación o una reacción inmunitaria antígeno-anticuerpo.

Los métodos descritos en la presente memoria se pueden llevar a cabo *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*. Preferiblemente se llevan a cabo *in vitro* o *ex vivo*.

MÉTODOS DE CRIBADO

La presente solicitud también describe métodos nuevos para cribar compuestos, preferiblemente candidatos a fármaco o compuestos principales, para prevenir o tratar un cáncer en un sujeto que tiene un ácido nucleico de TLR4 mutado o una expresión o actividad anormal de la proteína TLR4, que comprende determinar la capacidad de un compuesto de ensayo de modular la expresión o actividad de TLR4.

Los compuestos de ensayo preferidos cribados mediante el uso de un método como se describió previamente son capaces de restablecer o aumentar la expresión funcional de un TLR4 mutado o anormal.

Los métodos de cribado descritos en la presente memoria usan preferiblemente ácido nucleico o polipéptido TLR4 así como moléculas que evitan la ruta de señalización de TLR4 y conducen a la activación de NF-κB, como objetivos nuevos. Los métodos incluyen ensayos de unión y/o ensayos funcionales, y se pueden llevar a cabo *in vitro*, en sistemas celulares, en animales, etc.

- 5 Los inventores describen en particular un método para seleccionar un compuesto biológicamente activo, más en particular un compuesto activo en la prevención o el tratamiento del cáncer, y dicho método comprende poner en contacto *in vitro* un compuesto de ensayo con un producto seleccionado de un ácido nucleico de TLR4 (gen o ARN, por ejemplo), un polipéptido TLR4, una molécula que evita la ruta de señalización de TLR4 y que conduce a la activación de NF-κB, y un fragmento de los mismos, y determinar la capacidad de dicho compuesto de ensayo de unirse a dicho producto.

- 10 El método puede comprender poner en contacto una célula hospedadora recombinante que expresa un polipéptido TLR4 o una molécula que evita la ruta de señalización de TLR4 y que conduce a la activación de NF-κB, con un compuesto de ensayo, y determinar la capacidad de dicho compuesto de ensayo de unirse respectivamente a dicho polipéptido TLR4 o dicha molécula que evita la ruta de señalización de TLR4 y modular su actividad. Dicho polipéptido TLR4 o fragmento del mismo es un polipéptido TLR4 anormal, preferiblemente mutado, o fragmento del mismo responsable del estado anormal de TLR4 o que comprende la(s) mutación(es).

La unión a dicho ácido nucleico, polipéptido o molécula proporciona una indicación sobre la capacidad del compuesto de ensayo de modular la actividad de dicho objetivo, y así tener efecto sobre una ruta que conduce a un cáncer en un sujeto.

- 20 La determinación de la unión se puede llevar a cabo mediante diversos métodos conocidos para el experto en la técnica, algunos de los cuales se describieron previamente en la presente memoria, tales como marcando el compuesto de ensayo, mediante competición con un control o ligando de referencia marcado que se sabe o que se ha identificado que se une a una proteína o polipéptido TLR4 particular (tipo natural o TLR4 anormal), etc.

- 25 Un objetivo adicional descrito en la presente memoria consiste en un método para seleccionar compuestos biológicamente activos, más en particular compuestos activos en la prevención o el tratamiento del cáncer en un sujeto que tiene un ácido nucleico de TLR4 mutado o una expresión o actividad anormal de la proteína TLR4, y dicho método comprende poner en contacto *in vitro* un compuesto de ensayo con un gen de TLR4 como se describe en la presente memoria y determinar la capacidad de dicho compuesto de ensayo de modular la expresión de dicho gen de TLR4.

- 30 Se proporciona otro método para seleccionar tal compuesto biológicamente activo, en el que dicho método comprende las etapas de poner en contacto *in vitro* un compuesto de ensayo con un polipéptido TLR4 o una molécula que evita la ruta de señalización de TLR4 y que conduce a la activación de NF-κB, y determinar la capacidad de dicho compuesto de ensayo de modular la actividad de dicho polipéptido TLR4 o de dicha molécula que evita la ruta de señalización de TLR4, respectivamente.

- 35 Un gen de TLR4 particular, polipéptido o fragmento del mismo utilizable en un método como se describe ahora es un gen de TLR4 mutado, polipéptido o fragmento del mismo como se describió previamente en la presente solicitud, que comprende preferiblemente una mutación que conduce a la sustitución de asparagina por glicina en la posición 299 del polipéptido TLR4 y/o una mutación que conduce a la sustitución de treonina por isoleucina en la posición 399 del polipéptido TLR4.

- 40 Una molécula particular que evita la ruta de señalización de TLR4 y que conduce a la activación de NF-κB utilizable en un método como se ha descrito ahora se puede seleccionar de ligandos de TLR3 y/o TLR9, tales como ARN bicatenario (por ejemplo Poli A:U y Poli I:C) y/o oligonucleótidos enriquecidos en C y G hipometilados (oligonucleótidos CpG).

- 45 Otro objetivo particular descrito en la presente memoria consiste en un método para seleccionar compuestos activos en la prevención o el tratamiento del cáncer en un sujeto que tiene un ácido nucleico de TLR4 mutado o una expresión o actividad anormal de proteína TLR4, y dicho método comprende poner en contacto *in vitro* un compuesto de ensayo con un polipéptido implicado en la regulación de la actividad de TLR4, preferiblemente un polipéptido MyD88 o TRIF, aún más preferiblemente un polipéptido MyD88, o un fragmento que contiene el sitio de unión del mismo, y determinar la capacidad de dicho compuesto de ensayo de unirse a dicho polipéptido o fragmento del mismo.

En un objetivo particular adicional, el método comprende poner en contacto una célula hospedadora recombinante que expresa un polipéptido implicado en la regulación de la actividad de TLR4, preferiblemente un polipéptido MyD88 o TRIF, aún más preferiblemente un polipéptido MyD88, con un compuesto de ensayo, y determinar la capacidad de dicho compuesto de ensayo de unirse a dicho polipéptido y modular la actividad de dicho polipéptido.

- Un método adicional descrito en la presente memoria comprende las etapas de seleccionar compuestos biológicamente activos, más en particular compuestos activos en la prevención o el tratamiento del cáncer en un sujeto que tiene un ácido nucleico de TLR4 mutado o una expresión o actividad anormal de la proteína TLR4, y dicho método comprende poner en contacto *in vitro* un compuesto de ensayo con un gen implicado en la regulación de la actividad de TLR4, preferiblemente un gen que codifica MyD88 o TRIF, aún más preferiblemente un gen que codifica MyD88, y determinar la capacidad de dicho compuesto de ensayo de modular la expresión de dicho gen.
- En un objetivo particular de los métodos de cribado, la modulación es una activación. En otro objetivo particular de los métodos de cribado, la modulación es una inhibición.
- El método descrito en la presente memoria es adecuado para cribar muchos compuestos. Estos compuestos pueden ser de origen, naturaleza y composición diversos. Un compuesto de ensayo puede ser cualquier sustancia orgánica o inorgánica, tal como un lípido, péptido, polipéptido, ácido nucleico, molécula pequeña, etc., aislado o en mezcla con otras sustancias. Los compuestos pueden ser todo o parte de una biblioteca combinatoria de productos, por ejemplo.
- Se puede cribar el ligando inducido en células tumorales mediante una antraciclina, mediante PLAT o mediante rayos X en un cultivo de células tumorales mediante el uso de una sonda seleccionada en particular de un TLR4Fc, un TLR4lg y un anticuerpo anti-HMGB1. La sonda preferiblemente está marcada.
- También se describe un método para cribar un compuesto útil para tratar un cáncer en un sujeto que tiene un ácido nucleico de TLR4 mutado o una expresión o actividad anormal de proteína TLR4. Este método comprende determinar la capacidad de un compuesto de ensayo de inducir o incrementar *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo* la expresión o actividad de un ligando de TLR4.
- Se ha demostrado que los ligandos de TLR4 estimulan la expresión de TLR4. Los inventores han demostrado además que los ligandos de TLR4 son capaces de incrementar la sensibilidad de un sujeto a la quimioterapia o radioterapia, en particular a la quimioterapia.
- Tales compuestos se pueden detectar mediante el uso de microscopía confocal. De hecho, los inventores han demostrado que los ligandos de TLR4 endógenos se translocan del núcleo a la membrana plasmática de la célula tumoral en 1 a 30 minutos tras la administración de quimioterapia o de radioterapia.
- Los ligandos preferidos, identificados en la presente memoria, que se pueden usar para estimular la expresión de TLR4 y/o para incrementar la sensibilidad de un sujeto a la quimioterapia y/o radioterapia son HMGB1 y LPS.
- Los métodos de cribado anteriores se pueden llevar a cabo en cualquier dispositivo adecuado, tal como placas, por ejemplo placas multi-pocillo, tubos, placas de cultivo, matraces, etc. Se pueden ensayar varios compuestos de ensayo en paralelo.
- Las sustancias obtenidas mediante el método de cribado descrito se pueden usar para preparar composiciones farmacéuticas para el tratamiento o la prevención del cáncer, en particular en un sujeto que tiene un ácido nucleico de TLR4 mutado o una expresión o actividad anormal de la proteína TLR4.
- Las sustancias obtenidas mediante el método de cribado descrito se pueden usar también para preparar composiciones farmacéuticas para aumentar la sensibilidad de un sujeto, en particular de un sujeto que tiene un ácido nucleico de TLR4 mutado o una expresión o actividad anormal de la proteína TLR4, a la quimioterapia y/o radioterapia (mediante el uso de rayos X, por ejemplo), en particular de un sujeto que se someterá a trasplante de médula ósea, más en particular trasplante alogénico de médula ósea.
- En particular, en la presente memoria se proporciona el uso de un compuesto biológicamente activo, conocido o aislado con un método de cribado como se describió previamente, capaz de restablecer o aumentar, es decir, incrementar o favorecer, la expresión de TLR4 funcional para preparar una composición farmacéutica para tratar o prevenir un cáncer en un sujeto. El sujeto es preferiblemente uno que tiene un ácido nucleico de TLR4 mutado o una expresión o actividad anormal de la proteína TLR4, tal como se explicó anteriormente.
- La presente descripción abarca cualquier compuesto conocido y cualquier compuesto identificado mediante el uso de un método de cribado como se describe en la presente memoria capaz de restablecer una expresión de TLR4 funcional, y cualquier composición farmacéutica que comprende tal compuesto, para prevenir o tratar un cáncer en un sujeto, en particular en un sujeto que tiene un ácido nucleico de TLR4 mutado o una expresión o actividad anormal de la proteína TLR4.
- Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria pueden comprender además de manera ventajosa al menos un compuesto seleccionado de antraciclina, tal como DOX, oxali-platino y/o cis-platino (PLAT), en forma de una preparación combinada, para el uso simultáneo, separado o secuencial, en la prevención o el tratamiento de dicho cáncer.

Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria, en particular las composiciones farmacéuticas que no comprenden un producto quimioterápico, se pueden administrar antes de cualquier tratamiento que comprende la administración de quimioterapia o radioterapia, en individuos con TLR4 mutado. La administración de la(s) composición(es) farmacéutica(s) se puede llevar a cabo en una administración simple o en administraciones repetidas, antes y/o durante cualquier tratamiento posterior, por ejemplo un día antes del tratamiento posterior y cada 3 semanas durante dicho tratamiento.

En otro ejemplo, la administración de la(s) composición(es) farmacéutica(s) también se puede llevar a cabo cada día durante un periodo de tratamiento quimioterápico y varios días después del final de dicho tratamiento quimioterápico, en general 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 (una semana), 8, 9 ó 10 días después del final de dicho tratamiento quimioterápico.

Los inventores describen así en la presente memoria una composición farmacéutica que comprende un polipéptido TLR4 funcional (p.ej., de tipo natural), un ácido nucleico que codifica un polipéptido TLR4 funcional, un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido TLR4 funcional o una célula hospedadora recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido TLR4 funcional.

La composición puede comprender además o en su lugar al menos un producto tal como se describe, preferiblemente seleccionado de un compuesto biológicamente activo capaz de restablecer o aumentar la expresión de TLR4, conocido o seleccionado con un método como se describió previamente.

Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria comprenden además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

También se describe en la presente memoria el uso de un compuesto biológicamente activo que evita la ruta de señalización de TLR4 y que conduce a la activación de NF- κ B para preparar una composición farmacéutica para tratar o prevenir un cáncer en un sujeto, en particular en un sujeto que tiene un ácido nucleico de TLR4 mutado o una expresión o actividad anormal de la proteína TLR4.

También se describe en la presente memoria un compuesto biológicamente activo que evita la ruta de señalización de TLR4 y conduce a la activación de NF- κ B, y una composición farmacéutica que comprende tal compuesto, para prevenir o tratar un cáncer en un sujeto, en particular en un sujeto que tiene un ácido nucleico de TLR4 mutado o una expresión o actividad anormal de la proteína TLR4.

Un compuesto biológicamente activo preferido que evita la ruta de señalización de TLR4 y conduce a la activación de NF- κ B es un ligando de TLR3 o TLR9.

Los ligandos de TLR3 se pueden seleccionar de Poli A:U y poli I:C, por ejemplo.

Los ligandos de TLR9 se pueden seleccionar de oligonucleótidos enriquecidos en G e hipometilados (oligonucleótidos CpG - CpG A, B o C).

También se proporciona en la presente memoria el uso de un compuesto lisosomotrópico alcalinizante para preparar una composición farmacéutica para tratar o prevenir un cáncer en un sujeto, en particular en un sujeto que tiene un ácido nucleico de TLR4 mutado o una expresión o actividad anormal de la proteína TLR4.

También se describe en la presente memoria un compuesto lisosomotrópico alcalinizante, y una composición farmacéutica que comprende tal compuesto, para prevenir o tratar un cáncer en un sujeto, en particular en un sujeto que tiene un ácido nucleico de TLR4 mutado o una expresión o actividad anormal de la proteína TLR4.

El compuesto lisosomotrópico alcalinizante puede ser cualquier compuesto seleccionado de un compuesto que interfiere con la ATPasa vacuolar, cloroquina, quinina y cualquier combinación de los mismos. Los ejemplos de compuestos que interfieren con la ATPasa vacuolar son bafilomicina, apicularen, archazolid y concanamicina.

La médula ósea de un sujeto que tiene una expresión o actividad normal de la proteína TLR4 se puede usar adicionalmente para prevenir o tratar un cáncer en un sujeto, en particular en un sujeto que tiene un ácido nucleico de TLR4 mutado o una expresión o actividad anormal de la proteína TLR4, en particular en un sujeto como se definió previamente que se someterá a un trasplante de médula ósea.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto como se describió anteriormente pueden comprender además una antraciclina, oxali-platino y/o cis-platino (PLAT), en forma de una preparación combinada, para el uso simultáneo, separado o secuencial en la prevención o el tratamiento de dicho cáncer.

Así, también se proporciona en la presente memoria una composición farmacéutica que comprende (i) un compuesto biológicamente activo que evita la ruta de señalización de TLR4 y que conduce a la activación de NF- κ B, preferiblemente un ligando de TLR3 y/o TLR9, y/o un compuesto lisosomotrópico alcalinizante como se describió previamente, y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dicha composición farmacéutica puede comprender

además al menos un producto seleccionado de una antraciclina, oxali-platino y cis-platino. Tal composición se puede usar para prevenir o tratar un cáncer en un sujeto, en particular en un sujeto que tiene un ácido nucleico de TLR4 mutado o una expresión o actividad anormal de la proteína TLR4.

5 Las composiciones farmacéuticas anteriormente descritas se pueden administrar antes, por ejemplo un día antes, y/o en espera de quimioterapia o radioterapia. Se administran preferiblemente en espera y/o después de la quimioterapia o radioterapia.

10 La administración de las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente memoria se puede llevar a cabo mediante cualquier método conocido para los expertos en la técnica, preferiblemente por vía oral o mediante inyección (preferiblemente por medio de la vía sistémica). Los expertos en la técnica pueden adaptar las dosis administradas.

En general, en cuanto a los tratamientos, las dosis de administración pueden ser, por ejemplo:

- para 4-Epirubicina (antraciclina): 100 mg/m² cada 3 semanas;
- para Oxaliplatino: alrededor de 600-1000 mg/m² cada 3 semanas;
- 15 - para compuestos de ácidos nucleicos, las dosis pueden oscilar, por ejemplo, para *Poli A:U* de 30-50 mg/semana, durante 6 semanas.

En el contexto de un tratamiento profiláctico, las composiciones farmacéuticas se administran preferiblemente cada 3 semanas.

20 Se entiende que se pueden llevar a cabo tratamientos repetidos, posiblemente en combinación con otros agentes activos, terapia o cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable (p.ej., tampones, soluciones salinas isotónicas, en presencia de estabilizantes, etc.).

25 Un método para tratar o prevenir un cáncer en un sujeto, en particular en un sujeto que tiene un ácido nucleico de TLR4 mutado o una expresión o actividad anormal de la proteína TLR4, por medio de la activación de la expresión o actividad de TLR4. El sujeto puede ser un paciente que se someterá a un trasplante alogénico de médula ósea mediante el uso de la médula ósea de un sujeto donante que tiene una expresión o actividad normal de la proteína TLR4.

30 Más en particular, en la presente memoria se proporcionan métodos para tratar a un sujeto que porta alelos mutados del gen de TLR4 o que expresa una proteína TLR4 anormal, que incluyen la terapia combinada. Los sujetos se pueden tratar así, por ejemplo, por medio de terapia génica, terapia de sustitución proteica o por medio de la administración de moléculas miméticas y/o activadores de la proteína TLR4. Al menos uno de dichos métodos se pueden combinar además con la quimioterapia o con la radioterapia.

También se describe en la presente memoria un método para tratar el cáncer en un sujeto por medio de la activación de la expresión o actividad de TLR4 mediante el uso de un producto como se describió previamente en la presente memoria.

35 Los métodos de diagnóstico, como se describió en la presente memoria, dirigidos a determinar la sensibilidad de un sujeto a un tratamiento del cáncer o a detectar deficiencias de TLR4 innata o adquiridas en pacientes de cáncer o que tienen riesgo de desarrollar un cáncer, se pueden aplicar a un sujeto seleccionable para tal tratamiento, en particular a un sujeto que se someterá a un tratamiento del cáncer, en particular a un tratamiento quimioterápico, y/o un trasplante alogénico de médula ósea. Con respecto al sujeto que se someterá a un trasplante alogénico de médula ósea, es preferible seleccionar un sujeto donante de médula ósea adecuado. Un sujeto donante de médula ósea adecuado es un sujeto que tiene una expresión o actividad normal de la proteína TLR4, como se definió en la presente memoria.

Otras características y ventajas de la invención se proporcionan en la sección experimental siguiente (con referencia a las figuras 1 a 17), que se debería considerar ilustrativa y no limitante del alcance de la presente solicitud.

SECCIÓN EXPERIMENTAL

45 Los inventores abordaron primero el papel de la inmunidad basada en células en la eficacia de una diversidad de agentes pro-apoptóticos utilizados habitualmente como armamento oncológico para tratar el cáncer. En primer lugar, descubrieron que algunos compuestos, es decir, DOX, PLAT y RX mediaban en una eficacia antitumoral más potente en ratones inmunocompetentes en comparación con los animales de la misma camada Nu/Nu atímicos desprovistos de T células.

50 En segundo lugar, debido a que la inmunidad innata dicta el resultado de las respuestas inmunitarias mediadas por

células T cognadas, los inventores cribaron los receptores innatos implicados en los efectos antitumorales inducidos mediante quimio- o radio-terapia, y descubrieron que TLR4 estaba implicado selectivamente. Posteriormente en la señalización de TLR4, TRIF y MyD88 son rutas críticas que conducen a diferentes resultados inflamatorios. Las terapias citotóxicas inducen la muerte celular inmunógena por medio de MyD88, y no de TRIF.

- 5 En tercer lugar, los inventores descubrieron que los ratones deficientes de TLR4 recuperaban una susceptibilidad completa a la muerte celular inducida por radioterapia (RX) y una supervivencia a largo plazo cuando RX se combinaba con ligandos de TLR3 o TLR9.

En cuarto lugar, los inventores pusieron de relieve los mecanismos por los cuales TLR4 es crucial para la supervivencia tras la quimioterapia y/o terapia con rayos X:

- 10 - la presentación cruzada de antígenos exógenos (cuerpos muertos apoptóticos) no se puede dar de manera adecuada, y no se pueden generar células T específicas antitumorales;
- el transporte intracelular de los antígenos exógenos es diferente en CD de tipo natural (TN) y en CD TLR4^{-/-}. En CD TLR4^{-/-}, se observa una aceleración de la degradación lisosómica de los antígenos exógenos.

- 15 En quinto lugar, los inventores descubrieron que HMGB1 está implicado en la presentación cruzada de corpúsculos apoptóticos por CD TLR4⁺ a CTL *in vitro*.

Los inventores demostraron además que la supervivencia sin progresión (en 5 años) es significativamente más larga en hembras que albergan un genotipo TN frente a las hembras que albergan un alelo de TLR4 Asp299Gly mutado (véase la Figura 11, análisis Log Rank).

- 20 En último lugar, los inventores descubrieron que los pacientes de cáncer de mama esporádico o pacientes de cáncer de colon también exhiben una frecuencia mayor del alelo Asp299Gly mutado (>25%) en comparación con los controles (<10%).

1. Materiales y métodos

Cepas de ratones.

- 25 Se obtuvieron ratones Balb/c (H-2^d), C57BL/6 (H-2^b) y Balb/c atímicos del Centre d'élevage Janvier (Le Genest St Isle, Francia) y de Charles River Laboratories (L'Arbresle, Francia). Se obtuvieron ratones C57BL/6 de Taconic Animal Laboratory (Ejby, Dinamarca). Se criaron ratones suizos atímicos (nu/nu) en la propia instalación de animales de los inventores (Villejuif, Francia). Los ratones Balb/c TLR4^{-/-} (proporcionados por Gregoire Lauvau), así como los ratones MyD88^{-/-} y Trif^{-/-} con un origen C57BL/6 (proporcionados por Bernhard Ryffel) se criaron en la instalación de animales exenta de patógenos de los inventores. Finalmente, se adquirieron ratones C57BL/10 y C57BL/10ScNJ de Jackson Laboratory. Los animales se usaron a una edad entre 6 y 20 semanas. Todos los animales se mantuvieron según las directrices del Comité Ético de Experimentación Animal (Val de Marne, Francia).

Líneas celulares tumorales

- 35 CT26 y TS/A son, respectivamente, líneas de células de cáncer de colon y mama singénicas para ratones BALB/c. B16F10 es una línea de células cancerosas de melanoma singénicas para ratones C57BL/6. Las células se cultivaron a 37 °C en un 5% de CO₂ en medio RPMI 1640 complementado con un 10% de FCS, penicilina, estreptomycin, piruvato 1 mM y Hepes 10 mM.

- 40 Se inocularon 3 x 10⁶ células tratadas CT26 de manera subcutánea en 200 µl de PBS en ratones BALB/c hembra de 6 semanas (Charles River Laboratories) en el flanco inferior, a la vez que se inocularon 5 x 10⁵ células de control sin tratar en el flanco contralateral. De forma similar, se inocularon 1 x 10⁵ células TS/A en el flanco derecho de los ratones.

Ensayos de muerte celular.

- 45 Las células se tripsinizaron y se sometieron a un análisis citofluorométrico con un FACSVantage después de teñirlas con DAPI 2,5 µM durante 10 min (Invitrogen) para la determinación de la viabilidad celular, y se conjugó anexina V con isotiocianato de fluoresceína (Bender Medsystems) para la determinación de la exposición de fosfatidilserina [30].

Aloinjertos tumorales.

- 50 Los tumores de osteosarcoma Glasgow (GOS) y adenocarcinoma pancreático (P03) fueron amablemente proporcionados por F. Levi (Paul Brousse Hospital, Villejuif). Los tumores se mantuvieron en ratones nu/nu de más de 6 semanas de edad y se pasaron cada 2 ó 4 semanas, respectivamente, en forma de implantes subcutáneos (s.c.) como describió previamente Granda et al [31].

Reactivos.

Se adquirió Lipopolisacárido (LPS) Ultrapure de Invivogen y se usó a una concentración final de 1 µg/ml en cultivo. Se obtuvo Poliinosina-ácido policitídílico (poli(I:C)) de Ampligen. Para los experimentos *in vivo*, se diluyó Poli(I:C) en solución salina y se inyectaron 50 µg i.p. en ratones sometidos a tratamiento con RX en el día +1, día +4 y día +7 tras la radioterapia. De forma similar, se administró CpG (50 µg) 5'-TCCATGACGTTCTGACGTT-3' (SEQ ID N°: 16) proporcionado por el Dr. A. Carpentier (Departamento de Neurología, Groupe Hospitalier Pitié Salpêtrière, París, Francia) en el día 1 tras la radioterapia.

Péptidos de TLR4 inhibitorios.

Los péptidos TLR4 663-686 con una secuencia Tat NH2-terminal fueron los siguientes: péptido TLR4, RKKRRQRRRGKKYSRGESYDAFVI-YSSQNEDWV (SEQ ID N°: 17); péptido mutante de TLR4, RKKRRQRRRGEEYSEG-ESIYDAFVIYSSQNEDWV (SEQ ID N°: 18).

Para los experimentos *in vivo*, se administraron 100 µg de péptidos i.p. a los ratones en el día 0, día +3 y día +6 tras la inmunización con células apoptóticas CT26.

ODN que interfiere con TLR7/9.

EL inhibidor basado en oligonucleótido (ODN) de la señalización TLR7/9 y el ODN de control fueron proporcionados amablemente por F. Barrat (Dynavax, Berkeley, CA, EE.UU.). Las secuencias del ODN inhibitorio de TLR7/9 (IRS 954) y el ODN de control (ODN532) son 5'-TGCTCCTGGAGGGGTTGT-3' (SEQ ID N°: 19) y 5'-TCCTGCAGGTTAAGT-3' (SEQ ID N°: 20), respectivamente. Para los experimentos *in vivo*, los ODNs se diluyeron en solución salina. Para alcanzar una inhibición eficaz de la señalización TLR7/9, se administraron 50 µg de ODNs i.p. a ratones sometidos a tratamiento de RX en el día -4, día -1 y día +2. Los ratones de control también recibieron ODNs con el mismo calendario. Para determinar la eficacia de los ODN inhibitorios, se inyectó a los ratones Balb/c s.c. solución salina o 25 µg de CpG inmunoestimulador. Dos horas tras la inyección, se recogió sangre de los ratones y se determinaron mediante ELISA las concentraciones de TNFα y de IL-12p40 en los sueros de los ratones.

Preparación de vacunas de células tumorales apoptóticas (DOX o RX)

Se cultivaron células CT26 en medio de cultivo complementado con 20 µM de doxorrubina durante 4-24 h. De manera alternativa, se trataron células B16OVA con idarrubicina 1 µM durante 24 h (Aventis) para inducir la muerte celular.

Protocolos de quimio- o radio-terapia para favorecer la remisión tumoral in vivo

Se inyectaron a ratones Balb/c 10⁵ células TS/A en el flanco derecho. Después los ratones se asignaron aleatoriamente a grupos de tratamiento de 3-6 ratones cada uno. Se monitorizó el crecimiento tumoral mediante el uso de un calibre. Cuando el tamaño del tumor alcanzó 30-50 mm², se iniciaron los tratamientos. Los ratones se anestesiaron brevemente mediante el uso de isofurano y se colocaron cuidadosamente en dispositivos de inmovilización de plástico para asegurar la inmovilización. Se protegió todo el cuerpo mediante un blindaje de plomo, excepto en el área del tumor a irradiar. Se administró una dosis total de rayos X de 10 Gy en una única dosis.

Se implantó a los ratones C57BL/6 con un injerto tumoral de GOS o P03 en la piel. El tratamiento comenzó cuando el tumor se hizo palpable (como se describió en [31]). Los ratones que albergaban un tumor GOS palpable se trataron con oxaliplatino (5 mg/kg i.p.) en el día 5. De forma similar, a los ratones que albergaban un tumor P03 palpable (normalmente entre el día 9 y el día 13) se les inyectó i.p. docetaxel (60 mg/kg).

Ensayos funcionales en células dendríticas de ratón. Fagocitosis. Maduración. Secreción de citocinas. Activación de células T.

Se generaron células dendríticas derivadas de médula ósea (CD-MO) mediante el uso de FLT3I como se describió previamente [30]. Los experimentos de maduración y fagocitosis se llevaron a cabo como se describió previamente [30]. Brevemente, se coincubaron células dendríticas con células CT26 apoptóticas o necróticas teñidas previamente con CytoTracker Red (CMTMR; Invitrogen) en una proporción de 1:1 ó 5:1 durante 2 a 4 h para los experimentos de fagocitosis o 24 h para los experimentos de maduración. Las células se analizaron después mediante FACS con anticuerpos conjugados a FITC (Becton Dickinson) específicos para las moléculas CD11c, clase II del MHC, CD40, CD80 y CD86.

También se determinó la maduración de las células dendríticas y la secreción de citocinas en esplenocitos CD11c⁺ recién aislados purificados mediante el uso de microesferas inmunomagnéticas (Miltenyi Biotec) y coincubados durante 24 h con células CT26 o TS/A vivas o apoptóticas en proporciones de 1:1 y 5:1. Los sobrenadantes se recogieron después y se determinó la secreción de IL-1b, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p70 e IFNγ mediante ELISA (Equipo OptEIA ELISA; BD Biosciences).

Para los experimentos de sensibilización, se prepararon células dendríticas derivadas de médula ósea (CD-MO) según el protocolo de Lutz et al. [32] con algunas modificaciones. Las CD-MO se cultivaron en medio de Iscoves (Sigma) complementado con Penicilina (100 U/ml Gibco), Estreptomicina (100 µg/ml Gibco), L-glutamina (Gibco), 2-mercaptoetanol (50 µM, Sigma), 10% de FCS (Gibco) inactivado térmicamente y filtrado, y 30% de sobrenadante J558. Las CD-MO se usaron entre el día 10 y el día 12 cuando la proporción de células dendríticas (tanto CD11c+ como Clase II+) en el cultivo fue superior al 80%. Las CD-MO se recuperaron cuidadosamente y se cocultivaron con células tumorales apoptóticas (CT26 DX o B16OVA Ida) en una proporción 10:1. Después de una incubación de cuatro horas, las CD-MO cargadas de corpúsculos apoptóticos se lavaron dos veces en tampón fosfato salino (PBS) y se inyectaron $3 \cdot 10^5$ células dendríticas cargadas en la planta de la pata de ratones Balb/c o C57BL/6. De manera alternativa, para los experimentos de sensibilización negativa, se inyectaron $3 \cdot 10^5$ células tumorales sin células dendríticas.

En el día 5, se recogieron gangliocitos de los nódulos linfáticos de drenaje, se sembraron en placas Maxisorp (Nunc) de 96 pocillos a 10^5 células/pocillo, y se sometieron a unión cruzada a TCR con mAb anti-CD3e (10 µg/ml) y dosis bajas de IL-2 (100 U/ml). Los sobrenadantes se recogieron 24 horas más tarde, y se determinó la secreción de citocinas mediante ELISA.

Muestras de ADN

El material genómico se obtuvo de una cohorte de 153 mujeres que tenían cáncer de mama, admitidas en el Gustave Roussy Institute entre 1990 y 2006. Se aisló el ADN genómico (gADN) a partir de leucocitos sanguíneos mediante el uso de equipos disponibles comercialmente (Qiagen). De manera alternativa, se aisló el ADN a partir de tejidos incrustados en parafina. Se desparafinaron cortes de 20 µm de tejidos no tumorales con xileno y se rehidrataron con etanol. Las muestras se hirvieron después a 95 °C durante 5 minutos para recuperar el ADN, que se almacenó finalmente a 4 °C antes de la amplificación.

Cebadores y oligonucleótidos específicos de alelo (ASOs)

Los cebadores de PCR fueron contruidos por (Applied Biosystems) para amplificar un fragmento de 101 pb que contenía el sitio de la mutación Asp299Gly de TLR4. Se usaron los siguientes cebadores para el polimorfismo Asp299Gly: directo 5'-CCATTGAAGAATTCCGATTAGCATA-3' (SEQ ID N°: 21) e inverso 5'-CACTCACCAGGGAA AATGAAGAA-3' (SEQ ID N°: 22). Se diseñaron ASOs doblemente marcados (Applied Biosystems) para el alelo Asp299 de tipo natural y la variante alélica 299Gly con las secuencias directas: 5'-[VICTM]-CCTCGATGATATTATT-[MGB][NFQ]-S' (SEQ ID N°: 23) y 5'-[6-FAM]-CTCGATGATATTATTG-[MGB][NFQ]-3' (SEQ ID N°: 24), respectivamente. (Las bases en cursiva indican el sitio polimórfico para cada ASO).

Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y análisis de los datos

Se amplificó un volumen estándar de 2 µl de gADN (5 ng) por reacción añadiendo 5 µl de 2X Universal Taqman Master Mix (Applied Biosystems), 0,25 µl de cebadores de PCR 40X y sondas Taqman MGB y 2,75 µl de dH₂O. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en placas de fluorescencia de 96 pocillos (ABgene). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 min, 45 ciclos de desnaturalización durante 15 s a 92 °C y renaturalización durante 60 s a 60 °C. Las señales de fluorescencia se midieron automáticamente en un detector de secuencias ABI Prism 7700 (Applied Biosystems). Los genotipos se asignaron a cada sujeto, comparando la señal FAM con su señal VICTM correspondiente y calculando la proporción $-\log(\text{FAM}/\text{VIC})$ para cada dato, como describió previamente Van Rijn et al. [33].

2. Compuestos citotóxicos que inducen respuestas inmunitarias antitumorales

Recientemente se ha informado de que la apoptosis inducida por antraciclina estimula la inmunogenicidad de las células tumorales de una manera dependiente de caspasa [30]. Por lo tanto, los inventores llevaron a cabo un cribado de varios compuestos aprobados por la FDA usados habitualmente en los protocolos actuales de quimioterapia que son capaces de i) inducir la apoptosis de células tumorales *in vitro* (lo que incluye los rayos X) (Figura 1A) y ii) inducir respuestas inmunitarias de células T protectoras contra células tumorales vivas *in vivo*. El diseño experimental fue el siguiente. Se sometió a células tumorales CT26 de cáncer de colon a una incubación de 4-18 hr con compuestos citotóxicos, se lavaron y se inocularon sc en ratones singénicos BALB/c en el flanco abdominal. Quince días más tarde, se expuso a los ratones a 10 veces la dosis tumorigénica mínima de células tumorales CT26 en el flanco contralateral, y se monitorizó la cinética del crecimiento tumoral. Los inventores descubrieron que la muerte celular inducida por oxaliplatino (PLAT) (no mostrado), doxorubicina (o Idarrubicina, DOX, Figura 1B) e irradiación (no mostrado) pudo impedir el crecimiento de tumores en animales de la misma camada inmunocompetentes, pero no atímicos. En contraste, los taxanos, mitomicina-C, aunque mediaban en la muerte celular apoptótica, fueron tan eficaces en ratones inmunocompetentes como en ratones atímicos (no mostrado). En una lista extensa de diversos fármacos que inducen la muerte celular, solamente las antraciclina, la irradiación y el oxaliplatino (no mostrado) pudieron mediar en la inmunogenicidad (Figura 1B).

3. La apoptosis inducida por antraciclina es inmunógena de una manera dependiente de TLR4

Como postularon Janeway y col., las respuestas inmunitarias cognadas están dictadas por la inmunidad innata. Debido a que TLR4, 7-8 y 9 son componentes críticos de la inmunidad innata hacia antígenos exógenos, los inventores determinaron el papel de estos receptores en la inmunidad antitumoral inducida por las células apoptóticas. En ratones con pérdida de la función de TLR4 (TLR4^{-/-}), la vacunación anteriormente mencionada (CT26 tratadas con antraciclina) no protegió al hospedador hacia la exposición a CT26 vivas (Figura 2B). Se obtuvieron resultados similares en ratones BALB/c de tipo natural a los que se les inyectó un péptido competitivo que se unía a TLR4 (pero no un péptido de control mutado) (no mostrado).

Es notable que la DOX coadministrada con vacunas no inmunógenas (tales como células tumorales apoptóticas inducidas con mitomicina-C) no induce la inmunidad de células T, excluyendo la presencia de ligandos de TLR4 en las preparaciones de DOX (no mostrado). En la Figura 2C, los inventores demuestran que la inoculación directa de DOX en tumores establecidos inducen la remisión tumoral en hospedadores TLR4^{+/+}, pero no en los animales de la misma camada TLR4^{-/-}.

4. Los compuestos basados en platino mantienen controlados los tumores por medio de TLR4

Para definir adicionalmente el papel del sistema inmunitario en la sensibilidad a la quimioterapia en hospedadores que albergan tumores, los inventores determinaron los efectos antitumorales inducidos mediante oxaliplatino (PLAT) sistémico contra un injerto establecido de un osteosarcoma Glasgow en ratones C57BL/6 inmunocompetentes (Figura 3A), ratones suizos Nu/Nu (atímicos, Figura 3B) y ratones C57BL10ScNJ (que portaban un TLR4 mutado, Figura 3C). PLAT pudo controlar significativamente la progresión tumoral en ratones inmunocompetentes, pero no en ratones negros atímicos C57BL/6 Nu/Nu (no mostrado) o en ratones mutados para TLR4. Este experimento descarta un papel potencial de contaminación con LPS del inóculo tumoral, ya que se utilizan fragmentos tumorales injertados.

5. Los rayos X controlan el crecimiento tumoral de una manera dependiente de TLR4

La apoptosis inducida mediante rayos X es capaz de proteger a los ratones de la exposición tumoral en situaciones profilácticas (Figura 1A). Los inventores determinaron si los rayos X podrían controlar el crecimiento de tumores de mama TS/A en crecimiento de 30-50 mm² en ratones inmunocompetentes (IC) respecto de sus homólogos BALB/c atímicos. Primero, el crecimiento natural de TS/A no fue significativamente diferente en ratones TN respecto de los atímicos respecto de BALB/c TLR4^{-/-} (Figura 4A). Sin embargo, una vez más, la actividad antitumoral estimulada por los rayos X fue más potente en los ratones IC que en los ratones atímicos o en los animales de la misma camada deficientes de TLR4 (Figura 4B). Es importante hacer énfasis en que TLR7 y TLR9 no están implicados en las respuestas inmunitarias antitumorales mediadas por los rayos X (Figura 4C). Los inhibidores basados en oligonucleótidos (ODN) de TLR7 y TLR9 fueron desarrollados por Dynavax Technologies Corporation, Berkeley [34]. La especificidad de estos inhibidores se confirmó mediante la inhibición de la producción de IFN α por las PDCs en respuesta a virus de ADN o ARN [34]. En manos de los inventores, tal ODN pudo disminuir significativamente los niveles séricos de TNF α e IL-12p40 tras la inoculación de CpG *in vivo* (no mostrado).

6. MyD88, pero no TRIF, está implicado en la inmunogenicidad mediada por PLAT

Debido a que TLR4 puede señalar a través de TRIF o MyD88, los inventores determinaron cuál de estas rutas es crítica para la inmunogenicidad de la muerte celular inducida por PLAT en ratones C57BL/6 que albergaban injertos de osteosarcoma establecidos. Aunque PLAT mantuvo su eficacia antitumoral en los animales TRIF^{-/-} (Figura 5A), PLAT no pudo inducir un retraso tumoral significativo en sus homólogos MyD88^{-/-} (Figura 5B).

7. Los ligandos de TLR3 o TLR9 evitan las deficiencias de TLR4 y restauran la sensibilidad a los rayos X

Debido a que TLR3 señala por medio de TRIF, que no está implicado en la transducción de TLR4 en estas condiciones, los inventores realizaron la hipótesis de que la estimulación por medio de TLR3 podría potenciar los efectos antitumorales inducidos por los rayos X a través de mecanismos independientes en los hospedados deficientes de TLR4. De hecho, los inventores observaron que Poli I:C, un ARN bicatenario administrado de manera sistémica durante la radioterapia local, evitó la deficiencia de TLR4 en los animales que albergaban TS/A. Por lo tanto, aunque Poli I:C no impidió significativamente la progresión tumoral natural en los ratones TLR4^{+/+} respecto de los ratones TLR4^{-/-} (Figura 6A), los ratones TLR4^{-/-} se beneficiaron de los rayos X tanto como los ratones TLR4^{+/+} solamente en presencia de Poli I:C (Figura 6B).

Debido a que TLR4 señala a través de MyD88 (lo que conduce a la activación de NF- κ B), cualquier deficiencia de TLR4 impedirá la interacción de la proteína adaptadora MyD88 con los dominios TIR, indispensables para la cascada de señalización que conduce a la inducción de citocinas pro-inflamatorias. Debido a que TLR9 también puede estimular el ensamblaje de MyD88, los inventores investigaron si los ligandos de TLR9 podrían evitar las deficiencias de TLR4 en la respuesta a los rayos X. Como se describió anteriormente para la ligadura de TLR3, la

ligadura de TLR9 no solamente ejerció cierta actividad antitumoral durante la progresión tumoral en los ratones (Figura 7A), sino que también restableció la eficacia de los rayos X en los ratones TLR4^{-/-} (Figura 7B).

8. Mecanismos celulares implicados en la función de TLR4: percepciones

TLR4 se expresa principalmente en las células mieloides *in vivo* (monocitos, CD). La señalización de TLR4 es crítica para desencadenar la secreción de citocinas pro-inflamatorias (IL-1b, IL-6, TNF α e IL-12 cuando MyD88 está implicado) y acelerar la maduración de las CD. Tanto la diferenciación de las CD como la activación permiten la sensibilización y la polarización de las células T sin exposición previa. Los inventores determinaron la capacidad diferencial de las CD derivadas de médula ósea (o CD recién aisladas de nódulos linfáticos) de captar y madurar tras la incubación con células tumorales EL4OVA en las que se desencadenó un programa de muerte celular apoptótica con irradiación (después de 24 hrs de estimulación con rayos X). La captación de EL4OVA apoptóticas fue similar en ratones TLR4^{-/-} y TLR4^{+/+} (Figura 8A). La estimulación de la clase II del MHC y CD86, indicadores de la activación de las CD, fue comparable tanto en los ratones TLR4^{-/-} como en los ratones TLR4^{+/+} (Figura 8B, paneles superior e inferior). La secreción de IL-6 y TNF α , cuando fue significativa, fue independiente de TLR4 (no mostrado). No se pudo detectar secreción de IL-2 ni IL-12. A pesar de los signos externos de maduración exhibidos por las CD, la sensibilización de las células T mediada por CD en ratones TLR4^{-/-} se vio afectada. Las CD son probablemente las células presentadoras de antígenos capaces de procesar las células tumorales apoptóticas irradiadas *in vivo*, ya que las células apoptóticas EL4OVA irradiadas pulsadas en CD-MO generadas a partir de ratones TLR4^{-/-} no pueden sensibilizar al clon B3Z (Fig. 9A). Tras la inyección de EL4OVA irradiadas en ratones Balb/c, la sensibilización cruzada fue deficiente en los ratones TLR4^{-/-} (Fig. 9B). Además, los ensayos *in vitro* de presentación cruzada mediante el uso de CD-MO de ratón pulsadas con células apoptóticas inducidas mediante rayos X e incubadas con el clon de CTL específico del antígeno reveló que las CD TLR4^{-/-} no son capaces de activar CTL específicos, mientras las células TLR4^{+/+} lo hacen a menos que se añadan TLR4Fc o anticuerpos anti-HMGB1 al cocultivo (Figuras 10A y 10B).

9. Análisis de polimorfismos de nucleótido simple de TLR4 en la resistencia a la quimioterapia o a la irradiación (recaida local)

Los inventores llevaron a cabo el genotipado de Asp299Gly de TLR4 en mujeres con cáncer de mama admitidas para el diagnóstico o la terapia en IGR entre 1980 y 2000. El ADN se obtuvo de PBL o células B transformadas por el EBV o de tejidos tumorales incrustados en parafina. El genotipado se llevó a cabo mediante una reacción en cadena de la polimerasa en un único tubo con degradación mediante exonucleasa de oligonucleótidos específicos de alelo doblemente marcados (un método comparado previamente con el análisis convencional de los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción y confirmado mediante secuenciación directa [33]). Los inventores estudiaron más de 500 pacientes de cáncer de mama. Alrededor del 10% de dichos pacientes albergaron un único alelo mutante de TLR4 (una proporción comparable a la de los controles históricos de la bibliografía, revisada en [14]).

Después, examinaron la supervivencia sin progresión (PFS) en dos cohortes de mujeres caucásicas que albergaban un cáncer de mama familiar y que coincidían en edad, índice pronóstico de Nottingham y terapia adyuvante (basada en antraciclina, y rayos X en el tumor y pecho ipsilateral): las que exhibían las mutaciones Asp299Gly o Gly299Gly (n=12) y las que exhibían un fenotipo TN para TLR4 (Asp299Asp) (n=24). En el análisis Log Rank (Figura 11A), la PFS fue significativamente superior en los individuos TN a los 5 años (p<0,05). La progresión significa recidiva o metástasis ipsilateral.

10. Análisis de polimorfismos de nucleótido simple de TLR4 en la susceptibilidad al cáncer de mama

Se ha llevado a cabo una toma de muestras prospectiva de ADN periférico entre 2002 y 2006, en la unidad de cuidados intensivos (UCI) del Hôpital COCHIN (Pr Dhainaut) con el objetivo de determinar la morbilidad asociada al polimorfismo de TLR sobre la gravedad y el resultado clínico de la sepsis grave. Se han admitido más de 600 pacientes de cáncer en la UCI de 3000 pacientes, y se ha estudiado el SNP Asp299Gly de TLR4 mediante el uso de un cribado de alto rendimiento en una RT-PCR automatizada (Taqman, Applied biosystems 7900).

La frecuencia de los casos se ha comparado para cada tipo de neoplasia maligna (tumores hematopoyéticos frente a tumores sólidos, y específicamente tumores de colon, próstata, mama, leucemia, linfoma, mieloma, NSCLC, etc.). Estos "casos" se han hecho coincidir con "controles", que son pacientes hospitalizados en la UCI y que coinciden en edad, sexo, y etnia. Las frecuencias de SNP de TLR4 se han comparado en los diferentes grupos y subgrupos, y se han analizado como un criterio independiente de incidencia de choque séptico y como un marcador pronóstico. Los datos de los inventores apuntan al hecho de que el estado mutacional de TLR4 es un factor pronóstico independiente para el desarrollo de un cáncer de mama esporádico (Figura 11B).

11. Uso de Cloroquina o Quinina (fármacos lisosomotrópicos alcalinizantes) o de cualquier compuesto que interfiera con la ATPasa vacuolar (lo que estimula la alcalinización de los lisosomas) para compensar las deficiencias de TLR4 y para restablecer la presentación de antígenos y la respuesta a agentes citotóxicos en

la profilaxis y la terapia del cáncer

Los inventores han demostrado que un TLR4 mutante que reduce la unión de HMGB1 afecta al pronóstico de los pacientes de cáncer de mama tratados con antraciclinas. Un polimorfismo de secuencia en TLR4 (896A/G, Asp299Gly, rs4986790) que afecta al dominio extracelular de TLR4 está asociado a respuestas reducidas a endotoxinas y a una susceptibilidad reducida a enfermedades cardiovasculares en seres humanos [13, 18]. Aunque es materia de debate si la mutación Asp299Gly de TLR4 da como resultado una señalización de LPS deficiente [13, 23, 35], los inventores consideraron la posibilidad de que el polimorfismo Asp299Gly de TLR4 pudiera afectar a la respuesta a HMGB1. La transfección de células HeLa (que contienen TLR4 TN) con alelos TN o mutantes de TLR4 demostró que la expresión del receptor TLR4 mutante debilitó la activación de NF- κ B en respuesta a HMGB1 (no mostrado). Se llevaron a cabo experimentos de inmunoprecipitación después de añadir HMGB1 a células HeLa que se transfectaron con TLR4 humano normal y mutado. La unión de HMGB1 a TLR4 mutante (Asp299Gly) se redujo, en comparación con TLR4 normal (Asp299Asp) (Fig. 17a), aunque ambos transfectantes albergaron cantidades similares de moléculas de TLR4. Esta unión defectuosa de HMGB1 al TLR4 mutado podría explicar la capacidad gravemente reducida de CD derivadas de monocitos (CD-DM) de presentar de manera cruzada los antígenos de melanoma a los CTLs. Las CD-DM de individuos con TLR4 normal (Asp299Asp) y mutante (Asp299Gly) fueron indistinguibles en su capacidad de estimular células T alorreactivas en una reacción que se podría estimular mediante LPS (pero solamente cuando las CD albergasen el alelo de TLR4 normal) y no mediante HMGB1 (Fig. 17b suplementaria). Las CD-DM de individuos normales (Asp299Asp) presentaron de manera cruzada MART1 derivado de células de melanoma moribundas a clones de CTL de una manera dependiente de HMGB1 (Fig. 17c). En contraste, las CD-DM de individuos que albergaban un alelo Asp299Gly de TLR4 fueron presentadores cruzados defectuosos (Fig. 17c). Los inventores demuestran en la presente memoria que este defecto se restablece mediante la adición de cloroquina (Fig. 17c). Por lo tanto, la cloroquina puede compensar la capacidad defectuosa de las células dendríticas de los pacientes de presentar los antígenos tumorales a sus células T.

Este resultado corrobora otros datos obtenidos *in vitro* con células dendríticas de ratón. TLR4 controla el procesamiento/presentación de antígenos de células tumorales moribundas. La deficiencia de TLR4 podría comprometer la respuesta inmunitaria anti-tumoral a nivel de CD afectando a la captación, procesamiento/presentación de antígenos y/o la provisión de señales coestimuladoras. Las CD de TLR4 TN y TLR4^{-/-} fueron igualmente eficaces para captar células de timoma EG7 irradiadas o células de carcinoma de colon CT26 tratadas con doxorrubicina (Fig. 13a). La adquisición de marcadores de maduración (que incluyen la clase II del MHC y las moléculas coestimuladoras CD40, CD80, CD86), y la producción de citocinas inflamatorias (IL-6, IL-12p40, TNF- α) por parte de las CD TLR4^{-/-}, fueron deficientes en respuesta al lipopolisacárido bacteriano (LPS, un ligando conocido de TLR4), aunque estuvieron intactas en respuesta a las células tumorales moribundas (no mostrado y Fig. 13b). Sin embargo, TLR4 influyó en la cinética a la que las CD expresan complejos K^b/SIINFEKL/péptido de la clase I del MHC en la superficie de la membrana plasmática después de cargarlas con células TS/A transfectadas con OVA moribundas (H-2^d). Las CD de TLR4 TN y TLR4^{-/-} expresaron niveles comparables de moléculas K^b a niveles iniciales y obtuvieron complejos K^b/SIINFEKL después de someterlas a pulsos con cantidades saturables de péptidos SIINFEKL libres con una cinética similar (no mostrado). Sin embargo, se detectó una exposición notablemente reducida de complejos K^b/SIINFEKL en CD de TLR4^{-/-}, en comparación con los controles TN, después de cargar células TS/A que expresaban OVA moribundas (Fig. 14a).

Los inventores demuestran en la presente memoria, basándose en estos hallazgos, que TLR4 probablemente afecta al procesamiento/presentación de antígenos.

Se ha informado que TLR4 inhibe la degradación de fagosomas dependiente de lisosomas [36]. Las CD TLR4^{-/-} degradarían células moribundas en el compartimento lisosómico en vez de presentar sus antígenos [37]. En la presente invención, los inventores buscaban restablecer la presentación de antígenos por parte de las CD TLR4^{-/-} inhibiendo la actividad de los lisosomas, con cloroquina (un producto lisosomotrópico alcalino) o con bafilomicina A1 (un inhibidor específico de la ATPasa vacuolar responsable de la acidificación lisosómica). De hecho, la alcalinización de los lisosomas mediante cualquiera de los agentes, preferiblemente usados a concentraciones subtóxicas (concentraciones subtóxicas en el ratón de cloroquina: 10-20 μ M, bafilomicina A1: 20-30 μ M), aumentó la capacidad de las CD TLR4^{-/-} de presentar antígenos de células moribundas, aunque no mejoró la presentación de antígenos de las CD TN (Fig. 14b). Por lo tanto, el tratamiento de las CD TLR4^{-/-} con cloroquina restableció la capacidad de las CD de presentar complejos K^b/SIINKEKL a niveles normales (Fig. 14a, panel inferior). A continuación, los inventores determinaron directamente la cinética de la fusión entre los fagosomas y lisosomas en CD TN respecto de TLR4^{-/-} cargadas con células tumorales moribundas. Se observó una aceleración significativa de la colocalización de la carga fagocítica con los lisosomas en las CD TLR4^{-/-} en comparación con las CD TN (Fig. 14c).

Estos datos confirman que TLR4 regula el procesamiento/presentación de antígenos de las células tumorales por las CD, supuestamente inhibiendo la destrucción lisosómica de los antígenos.

12. La cloroquina y quinina restablecen la sensibilidad a la quimioterapia en animales que carecen de moléculas TLR4.

La inyección de células de cáncer de colon CT26 tratadas con doxorubicina es muy eficaz en la inducción de una respuesta inmunitaria que impide el crecimiento de células CT26 vivas inoculadas una semana más tarde [30]. Se obtuvieron resultados similares con células de sarcoma MCA205 tratadas con doxorubicina que protegían contra MCA205. Aunque esto se aplicó a ratones TN, no se pudo conseguir una vacunación tumoral con células tratadas con antraciclina o oxaliplatino en ratones TLR4^{-/-} (Fig. 15a). Estos datos se pudieron confirmar para células de timoma EL4 tratadas con oxaliplatino o irradiadas, que no protegieron a los hospedadores TLR4^{-/-} contra la exposición tumoral (Fig. 15a). La inhibición farmacológica de TLR4 con un péptido que bloquea la permeabilidad celular [38] que se coinyectó con las células tumorales moribundas también impidió la inmunidad anti-tumoral (Fig. 15b). Además, la eliminación del ligando de TLR4 HMGB1 de las células CT26 tratadas con antraciclina o oxaliplatino mediante el uso de anticuerpos neutralizantes (Fig. 15b) o siARNs específicos de HMGB1 (Fig. 15c) comprometió la eficacia de la vacunación anti-tumoral.

En una situación clínica más relevante, concretamente el tratamiento de tumores establecidos con quimioterapia sistémica o radioterapia local, los inventores descubrieron que la presencia de TLR4 dictó el resultado terapéutico. Los tumores de colon CT26 (Fig. 16a), carcinomas de mama TS/A (Fig. 16b), osteosarcomas GOS heterotrasplantados (Fig. 16c), y timomas EL4 (Fig. 16d), progresaron con una cinética similar en ratones TN inmunocompetentes, TLR4^{-/-}, y atímicos *nu/nu*. La quimioterapia con agentes citotóxicos adecuados o la radioterapia local redujo el crecimiento del tumor y prolongó la supervivencia de los ratones que tenían tumores en los ratones TN inmunocompetentes, aunque fue menos eficaz en los ratones TLR4^{-/-} (Fig. 16a-d) y *nu/nu* (Fig. 16b y no mostrado). De acuerdo con los datos *in vitro* (Fig. 12), los ratones Trif^{-/-} generaron una respuesta quimioterápica similar a la de los ratones TN, mientras los animales MyD88^{-/-} se comportaron como los ratones inmunodeficientes (Fig. 16c). De forma similar, la inhibición de TLR7 y 9 con un oligonucleótido sintético mediante el uso de un régimen que inhibe la producción de IFN α a partir de las CD plasmacitoides en respuesta a los ligandos de TLR7 y 9 [34] *in vivo* no influyó en la eficacia de la radioterapia (no mostrado). Además, la administración sistémica de cloroquina aumentó la eficacia de la quimioterapia en los ratones TLR4^{-/-}, pero no en los ratones TN (Fig. 16d) de acuerdo con los datos presentados en la Fig. 14. Estos resultados apuntan a una contribución hasta ahora desconocida de la inmunidad dependiente de TLR4/MyD88 a los regímenes quimioterápicos que se ha pensado que actúa exclusivamente a través de efectos citotóxicos intrínsecos de las células tumorales. Es importante indicar que tal efecto inmunitario sobre el resultado quimioterápico se detectó únicamente para un grupo limitado de fármacos, tales como las antraciclinas y oxaliplatino, mientras paclitaxel, camptotecina y los agentes alquilantes fueron igualmente eficaces en los ratones inmunocompetentes e inmunodeficientes (no mostrado).

CASO CLÍNICO

Una paciente de cáncer de mama que portaba la mutación Asp299Gly de TLR4 y que se presentó con una única metástasis pulmonar estaba progresando con una terapia que combinaba Navelbina y Xeloda durante 3 meses. El nódulo pulmonar creció desde un tamaño de 10 mm a 22 mm en 3 meses. Después de 3 meses del mismo régimen de quimioterapia combinado con cloroquina oral 200 mg/día durante 14 días (y una semana sin tratamiento, reinicio igual durante 3 ciclos), el nódulo permaneció estable (criterios RECIST).

PROTOCOLO MEDIANTE EL USO DE CLOROQUINA

Terapia de tumores establecidos (terapia adyuvante):

Se ha administrado cloroquina (100 a 300 mg/día) durante una duración que corresponde a la administración de los compuestos citotóxicos (quimioterapia) más 5 días después.

PROTOCOLO MEDIANTE EL USO DE QUININA

En pacientes con TLR4 mutado, se puede administrar quinina de manera intravenosa a 8 mg/kg cada 8 horas (x3/día) durante 3 días, comenzando preferiblemente al día siguiente tras la quimioterapia o radioterapia.

Referencias

1. Medzhitov, R. y CA. Janeway, Jr., *Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition*. Cell, 1997. **91**(3): pág. 295-8.
- 5 2. Medzhitov, R., *Toll-like receptors and innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2001. **1**(2): pág. 135-45.
3. Takeda, K. y S. Akira, *Toll-like receptors in innate immunity*. Int Immunol, 2005. **17**(1): pág. 1-14.
4. Beutler, B., X. Du, y A. Poltorak, *Identification of Toll-like receptor 4 (Tlr4) as the sole conduit for LPS signal transduction: genetic and evolutionary studies*. J Endotoxin Res, 2001. **7**(4): pág. 277-80.
- 10 5. Hoshino, K., et al., *Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product*. J Immunol, 1999. **162**(7): pág. 3749-52.
6. Kobe, B. y J. Deisenhofer, *A structural basis of the interactions between leucine-rich repeats and protein ligands*. Nature, 1995. **374**(6518): pág. 183-6.
7. Kawai, T., et al., *Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin*. Immunity, 1999. **11**(1): pág. 115-22.
8. Hoebe, K., E. Janssen, y B. Beutler, *The interface between innate and adaptive immunity*. Nat Immunol, 2004. **5**(10): pág. 971-4.
- 15 9. Shimazu, R., et al., *MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4*. J Exp Med, 1999. **189**(11): pág. 1777-82.
10. Yamamoto, M., et al., *Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway*. Science, 2003. **301**(5633): pág. 640-3.
- 20 11. Fitzgerald, K.A., et al., *LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF*. J Exp Med, 2003. **198**(7): pág. 1043-55.
12. Schroder, N.W., et al., *Lipoteichoic acid (LTA) of Streptococcus pneumoniae and Staphylococcus aureus activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved*. J Biol Chem, 2003. **278**(18): pág. 15587-94.
- 25 13. Arbour, N.C., et al., *TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans*. Nat Genet, 2000. **25**(2): pág. 187-91.
14. Schroder, N.W. y R.R. Schumann, *Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease*. Lancet Infect Dis, 2005. **5**(3): pág. 156-64.
15. Lorenz, E., et al., *Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock*. Arch Intern Med, 2002. **162**(9): pág. 1028-32.
- 30 16. Genc, M. R., et al., *Relationship between a toll-like receptor-4 gene polymorphism, bacterial vaginosis-related flora and vaginal cytokine responses in pregnant women*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2004. **116**(2): pág. 152-6.
17. Tal, G., et al., *Association between common Toll-like receptor 4 mutations and severe respiratory syncytial virus disease*. J Infect Dis, 2004. **189**(11): pág. 2057-63.
- 35 18. Kiechl, S., et al., *Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis*. N Engl J Med, 2002. **347**(3): pág. 185-92.
19. Ameziane, N., et al., *Association of the Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism with acute coronary events*. Arterioscler Thromb Vase Biol, 2003. **23**(12): pág. e61-4.
20. Balistreri, C.R., et al., *Role of Toll-like receptor 4 in acute myocardial infarction and longevity*. Jama, 2004. **292**(19): pág. 2339-40.
- 40 21. Smirnova, I., et al., *Excess of rare amino acid polymorphisms in the Toll-like receptor 4 in humans*. Genetics, 2001. **158**(4): pág. 1657-64.
22. Smirnova, I., et al., *Assay of locus-specific genetic load implicates rare Toll- like receptor 4 mutations in meningococcal susceptibility*. Proc Natl Acad Sci USA, 2003. **100**(10): pág. 6075-80.

23. Erridge, C., J. Stewart, e I.R. Poxton, *Monocytes heterozygous for the Asp299Gly and Thr399Ile mutations in the Toll-like receptor 4 gene show no deficit in lipopolysaccharide signalling.* J Exp Med, 2003. **197**(12): pág. 1787-91.
24. von Aulock, S., et al., *Heterozygous toll-like receptor 4 polymorphism does not influence lipopolysaccharide-induced cytokine release in human whole blood.* J Infect Dis, 2003. **188**(6): pág. 938-43.
- 5 25. Michel, O., et al., *Systemic responsiveness to lipopolysaccharide and polymorphisms in the toll-like receptor 4 gene in human beings.* J Allergy Clin Immunol, 2003. **112**(5): pág. 923-9.
26. Zheng, S.L., et al., *Sequence variants of toll-like receptor 4 are associated with prostate cancer risk: results from the Cancer Prostate in Sweden Study.* Cancer Res, 2004. **64**(8): pág. 2918-22.
- 10 27. Chen, Y.C., et al., *Sequence variants of Toll-like receptor 4 and susceptibility to prostate cancer.* Cancer Res, 2005. **65**(24): pág. 11771-8.
28. Bauer, A.K., et al., *Toll-like receptor 4 in butylated hydroxytoluene-induced mouse pulmonary inflammation and tumorigenesis.* J Natl Cancer Inst, 2005. **97**(23): pág. 1778-81.
- 15 29. Okamoto, M., et al., *Expression of toll-like receptor 4 on dendritic cells is significant for anticancer effect of dendritic cell-based immunotherapy in combination with an active component of OK-432, a streptococcal preparation.* Cancer Res, 2004. **64**(15): pág. 5461-70.
30. Casares, N., et al., *Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death.* J Exp Med, 2005. **202**(12): pág. 1691-701.
31. Granda, T.G., et al., *Circadian optimisation of irinotecan and oxaliplatin efficacy in mice with Glasgow osteosarcoma.* Br J Cancer, 2002. **86**(6): pág. 999-1005.
- 20 32. Lutz, M.B., et al., *An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow.* J Immunol Methods, 1999. **223**(1): pág. 77-92.
33. Van Rijn, B.B., et al., *Single step high-throughput determination of Toll-like receptor 4 polymorphisms.* J Immunol Methods, 2004. **289**(1-2): pág. 81-7.
- 25 34. Barrat, F.J., et al., *Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus.* J Exp Med, 2005. **202**(8): pág. 1131-9.
35. van der Graaf, C., et al., *Functional consequences of the Asp299Gly Toll-like receptor-4 polymorphism.* Cytokine, 2005. **30**(5): pág. 264-8.
36. Shiratsuchi, A., et al., *Inhibitory effect of Toll-like receptor 4 on fusion between phagosomes and endosomes/lysosomes in macrophages.* J Immunol, 2004. **172**(4): pág. 2039-47.
- 30 37. Delamarre, L., et al., *Enhancing immunogenicity by limiting susceptibility to lysosomal proteolysis.* J Exp Med, 2006. **203**(9): pág. 2049-55.
38. Huang, B., et al., *Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance.* Cancer Res, 2005. **65**(12): pág. 5009-14.

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> INSTITUT GUSTAVE ROUSSY

<120> Disfunción del receptor 4 similar a Toll y aplicaciones biológicas de la misma

<130> B0480

10 <160> 24

<170> PatentIn versión 3.3

15 <210> 1

<211> 5503

<212> DNA

<213> Homo sapiens

20 <220>

<221> CDS

<222> (142)..(2661)

<400> 1

tttgaataca ccaattgctg tggggcggct cgaggaagag aagacaccag tgcctcagaa	60
actgctcggt cagacggtga tagcgagcca cgcattcaca gggccactgc tgctcacaga	120
agcagtgagg atgatgccag g atg atg tct gcc tgc cgc ctg gct ggg act	171
Met Met Ser Ala Ser Arg Leu Ala Gly Thr	
1 5 10	
ctg atc cca gcc atg gcc ttc ctc tcc tgc gtg aga cca gaa agc tgg	219
Leu Ile Pro Ala Met Ala Phe Leu Ser Cys Val Arg Pro Glu Ser Trp	
15 20 25	
gag ccc tgc gtg gag gtg gtt cct aat att act tat caa tgc atg gag	267
Glu Pro Cys Val Glu Val Val Pro Asn Ile Thr Tyr Gln Cys Met Glu	
30 35 40	
ctg aat ttc tac aaa atc ccc gac aac ctc ccc ttc tca acc aag aac	315
Leu Asn Phe Tyr Lys Ile Pro Asp Asn Leu Pro Phe Ser Thr Lys Asn	
45 50 55	
ctg gac ctg agc ttt aat ccc ctg agg cat tta ggc agc tat agc ttc	363
Leu Asp Leu Ser Phe Asn Pro Leu Arg His Leu Gly Ser Tyr Ser Phe	
60 65 70	
ttc agt ttc cca gaa ctg cag gtg ctg gat tta tcc agg tgt gaa atc	411
Phe Ser Phe Pro Glu Leu Gln Val Leu Asp Leu Ser Arg Cys Glu Ile	
75 80 85 90	
cag aca att gaa gat ggg gca tat cag agc cta agc cac ctc tct acc	459
Gln Thr Ile Glu Asp Gly Ala Tyr Gln Ser Leu Ser His Leu Ser Thr	
95 100 105	
tta ata ttg aca gga aac ccc atc cag agt tta gcc ctg gga gcc ttt	507
Leu Ile Leu Thr Gly Asn Pro Ile Gln Ser Leu Ala Leu Gly Ala Phe	
110 115 120	
tct gga cta tca agt tta cag aag ctg gtg gct gtg gag aca aat cta	555
Ser Gly Leu Ser Ser Leu Gln Lys Leu Val Ala Val Glu Thr Asn Leu	
125 130 135	
gca tct cta gag aac ttc ccc att gga cat ctc aaa act ttg aaa gaa	603
Ala Ser Leu Glu Asn Phe Pro Ile Gly His Leu Lys Thr Leu Lys Glu	
140 145 150	
ctt aat gtg gct cac aat ctt atc caa tct ttc aaa tta cct gag tat	651

Leu 155	Asn	Val	Ala	His	Asn 160	Leu	Ile	Gln	Ser	Phe 165	Lys	Leu	Pro	Glu	Tyr 170	
ttt	tct	aat	ctg	acc	aat	cta	gag	cac	ttg	gac	ctt	tcc	agc	aac	aag	699
Phe	Ser	Asn	Leu	Thr 175	Asn	Leu	Glu	His	Leu 180	Asp	Leu	Ser	Ser	Asn 185	Lys	
att	caa	agt	att	tat	tgc	aca	gac	ttg	cgg	ggt	cta	cat	caa	atg	ccc	747
Ile	Gln	Ser	Ile 190	Tyr	Cys	Thr	Asp	Leu 195	Arg	Val	Leu	His	Gln 200	Met	Pro	
cta	ctc	aat	ctc	tct	tta	gac	ctg	tcc	ctg	aac	cct	atg	aac	ttt	atc	795
Leu	Leu	Asn 205	Leu	Ser	Leu	Asp	Leu 210	Ser	Leu	Asn	Pro	Met 215	Asn	Phe	Ile	
caa	cca	ggt	gca	ttt	aaa	gaa	att	agg	ctt	cat	aag	ctg	act	tta	aga	843
Gln	Pro 220	Gly	Ala	Phe	Lys	Glu 225	Ile	Arg	Leu	His	Lys 230	Leu	Thr	Leu	Arg	
aat	aat	ttt	gat	agt	tta	aat	gta	atg	aaa	act	tgt	att	caa	ggt	ctg	891
Asn 235	Asn	Phe	Asp	Ser	Leu 240	Asn	Val	Met	Lys	Thr 245	Cys	Ile	Gln	Gly	Leu 250	
gct	ggt	tta	gaa	gtc	cat	cgt	ttg	gtt	ctg	gga	gaa	ttt	aga	aat	gaa	939
Ala	Gly	Leu	Glu	Val 255	His	Arg	Leu	Val	Leu 260	Gly	Glu	Phe	Arg	Asn 265	Glu	
gga	aac	ttg	gaa	aag	ttt	gac	aaa	tct	gct	cta	gag	ggc	ctg	tgc	aat	987
Gly	Asn	Leu	Glu 270	Lys	Phe	Asp	Lys	Ser 275	Ala	Leu	Glu	Gly	Leu 280	Cys	Asn	
ttg	acc	att	gaa	gaa	ttc	cga	tta	gca	tac	tta	gac	tac	tac	ctc	gat	1035
Leu	Thr	Ile 285	Glu	Glu	Phe	Arg	Leu 290	Ala	Tyr	Leu	Asp	Tyr 295	Tyr	Leu	Asp	
gat	att	att	gac	tta	ttt	aat	tgt	ttg	aca	aat	gtt	tct	tca	ttt	tcc	1083
Asp	Ile 300	Ile	Asp	Leu	Phe	Asn 305	Cys	Leu	Thr	Asn	Val 310	Ser	Ser	Phe	Ser	
ctg	gtg	agt	gtg	act	att	gaa	agg	gta	aaa	gac	ttt	tct	tat	aat	ttc	1131
Leu	Val	Ser	Val	Thr 320	Ile	Glu	Arg	Val	Lys	Asp 325	Phe	Ser	Tyr	Asn 330	Phe	
gga	tgg	caa	cat	tta	gaa	tta	gtt	aac	tgt	aaa	ttt	gga	cag	ttt	ccc	1179
Gly	Trp	Gln	His	Leu 335	Glu	Leu	Val	Asn 340	Cys	Lys	Phe	Gly	Gln	Phe 345	Pro	
aca	ttg	aaa	ctc	aaa	tct	ctc	aaa	agg	ctt	act	ttc	act	tcc	aac	aaa	1227
Thr	Leu	Lys	Leu 350	Lys	Ser	Leu	Lys	Arg 355	Leu	Thr	Phe	Thr	Ser 360	Asn	Lys	
ggt	ggg	aat	gct	ttt	tca	gaa	gtt	gat	cta	cca	agc	ctt	gag	ttt	cta	1275
Gly	Gly	Asn 365	Ala	Phe	Ser	Glu	Val 370	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu 375	Glu	Phe	Leu	
gat	ctc	agt	aga	aat	ggc	ttg	agt	ttc	aaa	ggt	tgc	tgt	tct	caa	agt	1323
Asp	Leu 380	Ser	Arg	Asn	Gly 385	Leu	Ser	Phe	Lys	Gly	Cys 390	Cys	Ser	Gln	Ser	
gat	ttt	ggg	aca	acc	agc	cta	aag	tat	tta	gat	ctg	agc	ttc	aat	ggt	1371
Asp 395	Phe	Gly	Thr	Thr	Ser 400	Leu	Lys	Tyr	Leu	Asp 405	Leu	Ser	Phe	Asn 410	Gly	
gtt	att	acc	atg	agt	tca	aac	ttc	ttg	ggc	tta	gaa	caa	cta	gaa	cat	1419
Val	Ile	Thr	Met 415	Ser	Ser	Asn	Phe	Leu	Gly 420	Leu	Glu	Gln	Leu	Glu 425	His	
ctg	gat	ttc	cag	cat	tcc	aat	ttg	aaa	caa	atg	agt	gag	ttt	tca	gta	1467
Leu	Asp	Phe	Gln	His	Ser	Asn	Leu	Lys	Gln	Met	Ser	Glu	Phe	Ser	Val	

430							435					440					
ttc Phe	cta Leu	tca Ser 445	ctc Leu	aga Arg	aac Asn	ctc Leu	att Ile 450	tac Tyr	ctt Leu	gac Asp	att Ile	tct Ser 455	cat His	act Thr	cac His	1515	
acc Thr	aga Arg 460	gtt Val	gct Ala	ttc Phe	aat Asn	ggc Gly 465	atc Ile	ttc Phe	aat Asn	ggc Gly	ttg Leu 470	tcc Ser	agt Ser	ctc Leu	gaa Glu	1563	
gtc Val 475	ttg Leu	aaa Lys	atg Met	gct Ala	ggc Gly 480	aat Asn	tct Ser	ttc Phe	cag Gln	gaa Glu 485	aac Asn	ttc Phe	ctt Leu	cca Pro	gat Asp 490	1611	
atc Ile	ttc Phe	aca Thr	gag Glu	ctg Leu 495	aga Arg	aac Asn	ttg Leu	acc Thr	ttc Phe 500	ctg Leu	gac Asp	ctc Leu	tct Ser	cag Gln 505	tgt Cys	1659	
caa Gln	ctg Leu	gag Glu	cag Gln 510	ttg Leu	tct Ser	cca Pro	aca Thr	gca Ala 515	ttt Phe	aac Asn	tca Ser	ctc Leu	tcc Ser 520	agt Ser	ctt Leu	1707	
cag Gln	gta Val 525	cta Leu	aat Asn	atg Met	agc Ser	cac His	aac Asn 530	aac Asn	ttc Phe	ttt Phe	tca Ser	ttg Leu 535	gat Asp	acg Thr	ttt Phe	1755	
cct Pro	tat Tyr 540	aag Lys	tgt Cys	ctg Leu	aac Asn	tcc Ser 545	ctc Leu	cag Gln	gtt Val	ctt Leu	gat Asp 550	tac Tyr	agt Ser	ctc Leu	aat Asn	1803	
cac His 555	ata Ile	atg Met	act Thr	tcc Ser	aaa Lys 560	aaa Lys	cag Gln	gaa Glu	cta Leu	cag Gln 565	cat His	ttt Phe	cca Pro	agt Ser	agt Ser 570	1851	
cta Leu	gct Ala	ttc Phe	tta Leu	aat Asn 575	ctt Leu	act Thr	cag Gln	aat Asn	gac Asp 580	ttt Phe	gct Ala	tgt Cys	act Thr	tgt Cys 585	gaa Glu	1899	
cac His	cag Gln	agt Ser	ttc Phe 590	ctg Leu	caa Gln	tgg Trp	atc Ile	aag Lys 595	gac Asp	cag Gln	agg Arg	cag Gln	ctc Leu 600	ttg Leu	gtg Val	1947	
gaa Glu	gtt Val	gaa Glu 605	cga Arg	atg Met	gaa Glu	tgt Cys	gca Ala 610	aca Thr	cct Pro	tca Ser	gat Asp	aag Lys 615	cag Gln	ggc Gly	atg Met	1995	
cct Pro	gtg Val 620	ctg Leu	agt Ser	ttg Leu	aat Asn	atc Ile 625	acc Thr	tgt Cys	cag Gln	atg Met	aat Asn 630	aag Lys	acc Thr	atc Ile	att Ile	2043	
ggg Gly 635	gtg Val	tcg Ser	gtc Val	ctc Leu	agt Ser 640	gtg Val	ctt Leu	gta Val	gta Val	tct Ser 645	gtt Val	gta Val	gca Ala	gtt Val	ctg Leu 650	2091	
gtc Val	tat Tyr	aag Lys	ttc Phe	tat Tyr 655	ttt Phe	cac His	ctg Leu	atg Met	ctt Leu 660	ctt Leu	gct Ala	ggc Gly	tgc Cys	ata Ile 665	aag Lys	2139	
tat Tyr	ggg Gly	aga Arg	ggg Gly 670	gaa Glu	aac Asn	atc Ile	tat Tyr	gat Asp 675	gcc Ala	ttt Phe	gtt Val	atc Ile	tac Tyr 680	tca Ser	agc Ser	2187	
cag Gln	gat Asp	gag Glu 685	gac Asp	tgg Trp	gta Val	agg Arg	aat Asn 690	gag Glu	cta Leu	gta Val	aag Lys	aat Asn 695	tta Leu	gaa Glu	gaa Glu	2235	
ggg Gly	gtg Val 700	cct Pro	cca Pro	ttt Phe	cag Gln	ctc Leu 705	tgc Cys	ctt Leu	cac His	tac Tyr	aga Arg 710	gac Asp	ttt Phe	att Ile	ccc Pro	2283	

ggt gtt gcc att gct gcc aac atc atc cat gaa ggt ttc cat aaa agc Gly Val Ala Ile Ala Ala Asn Ile Ile His Glu Gly Phe His Lys Ser 715 720 725 730	2331
cga aag gtt att gtt gtt gtt tcc cag cac ttc atc cag agc cgc tgg Arg Lys Val Ile Val Val Val Ser Gln His Phe Ile Gln Ser Arg Trp 735 740 745	2379
tgt atc ttt gaa tat gag att gct cag acc tgg cag ttt ctg agc agt Cys Ile Phe Glu Tyr Glu Ile Ala Gln Thr Trp Gln Phe Leu Ser Ser 750 755 760	2427
cgt gct ggt atc atc ttc att gtc ctg cag aag gtt gag aag acc ctg Arg Ala Gly Ile Ile Phe Ile Val Leu Gln Lys Val Glu Lys Thr Leu 765 770 775	2475
ctc agg cag cag gtt gag ctg tac cgc ctt ctg agc agg aac act tac Leu Arg Gln Gln Val Glu Leu Tyr Arg Leu Leu Ser Arg Asn Thr Tyr 780 785 790	2523
ctg gag tgg gag gac agt gtc ctg ggg cgg cac atc ttc tgg aga cga Leu Glu Trp Glu Asp Ser Val Leu Gly Arg His Ile Phe Trp Arg Arg 795 800 805 810	2571
ctc aga aaa gcc ctg ctg gat ggt aaa tca tgg aat cca gaa gga aca Leu Arg Lys Ala Leu Leu Asp Gly Lys Ser Trp Asn Pro Glu Gly Thr 815 820 825	2619
gtg ggt aca gga tgc aat tgg cag gaa gca aca tct atc tga Val Gly Thr Gly Cys Asn Trp Gln Glu Ala Thr Ser Ile 830 835	2661
agaggaaaaa taaaaacctc ctgaggcatt tcttgcccag ctgggtccaa cacttggtca	2721
gttaataagt attaaatgct gccacatgtc aggccttatg ctaagggtga gtaattccat	2781
ggtgcactag atatgcaggg ctgctaattc caaggagctt ccagtgcaga gggaataaat	2841
gctagactaa aatacagagt cttccagggtg ggcattttcaa ccaactcagt caaggaaccc	2901
atgacaaaaga aagtcattttc aactctttacc tcatcaagtt gaataaagac agagaaaaca	2961
gaaagagaca ttgttctttt cctgagtctt ttgaatggaa attgtattat gttatagcca	3021
tcataaaacc attttggttag ttttgactga actgggtggt cactttttcc tttttgattg	3081
aatacaattt aaattctact tgatgactgc agtcgtcaag gggctcctga tgcaagatgc	3141
cccttccatt ttaagtctgt ctctttacag aggttaaagt ctagtggcta attcctaagg	3201
aaacctgatt aacacatgct cacaaccatc ctggtcattc tcgagcatgt tctatttttt	3261
aactaatcac ccctgatata tttttatttt tatatatcca gttttcattt ttttacgtct	3321
tgccataaag ctaatatcat aaataagggt gtttaagacg tgcttcaa atccatatta	3381
accactattt ttcaaggaag tatggaaaag tacactctgt cactttgtca ctcgatgtca	3441
ttccaaagtt attgcctact aagtaatgac tgtcatgaaa gcagcattga aataatttgt	3501
ttaaaggggg cactctttta aacgggaaga aaatttccgc ttcctggtct tatcatggac	3561
aatttgggct agaggcagga aggaagtggg atgacctcag gaggtcacct tttcttgatt	3621
ccagaaacat atgggctgat aaacccgggg tgacctcatg aaatgagttg cagcagaagt	3681
ttattttttt cagaacaagt gatgtttgat ggacctctga atctcttttag ggagacacag	3741

```

atggctggga tccctcccct gtacccttct cactgccagg agaactacgt gtgaaggat 3801
tcaaggcagg gagtatacat tgctgtttcc tgttgggcaa tgctccttga ccacattttg 3861
ggaagagtgg atgttatcat tgagaaaaca atgtgtctgg aattaatggg gttcttataa 3921
agaagggtcc cagaaaagaa tgttcatcca gcctcctcag aaacagaaca ttcaagaaaa 3981
ggacaatcag gatgtcatca gggaaatgaa aataaaaacc acaatgagat atcaccttat 4041
accaggtaga atggctacta taaaaaaatg aagtgtcatc aaggatatag agaaattgga 4101
acccttcttc actgctggag ggaatggaaa atgggtgtagc cgttatgaaa aacagtacgg 4161
aggtttctca aaaattaaaa atagaactgc tatatgatcc agcaatctca cttctgtata 4221
tatacccaaa ataattgaaa tcagaatttc aagaaaatat ttacactccc atgttcattg 4281
tggcactctt cacaatcact gtttccaaag ttatggaaac aacccaaatt tccattgaaa 4341
aataaatgga caaagaaaat gtgcatatac gtacaatggg atattattca gcctaaaaaa 4401
agggggaatc ctgttattta tgacaacatg aataaaccgg gaggccatta tgctatgtaa 4461
aatgagcaag taacagaaag acaataactg cctgatttca tttatatgag gttctaaaat 4521
agtcaaaact atagaagcag agaatagaac agtggttcct agggaaaagg aggaaggagg 4581
aatgagggaa atagggaggt gtctaattgg tataaaatta tagtatgcaa gatgaattag 4641
ctctaagat cagctgtata gcagagttcg tataatgaac aatactgtat tatgcactta 4701
acattttgtt aagagggtac ctctcatgtt aagtgttctt accatataca tatacacaag 4761
gaagcttttg gaggtgatgg atatatttat taccttgatt gtggtgatgg tttgacaggt 4821
atgtgactat gtctaaactc atcaaattgt atacattaaa tatatgcagt tttataatat 4881
caattatgtc tgaatgaagc tataaaaaag aaaagacaac aaaattcagt tgtcaaaact 4941
ggaaatatga ccacagtcag aagtgtttgt tactgagtggt ttcagagtggt gtttggtttg 5001
agcagggtcta gggtgattga acatccctgg gtgtgtttcc atgtctcatg tactagttaa 5061
agtagatgtg tgcatttggt cacatatccc tatgtatccc tatcagggct gtgtgtattt 5121
gaaagtgtgt gtgtccgcat gatcatatct gtatagaaga gagtgtgatt atatttcttg 5181
aagaatacat ccatttgaaa tggatgtcta tggctgtttg agatgagttc tctactcttg 5241
tgcttgtaga gtagtctccc cttatccctt atgcttggtg gatacgttct tagaccccaa 5301
gtggatctct gagaccgag atgggtaccaa acctcatata tgcaatattt tttcctatac 5361
ataaatacct aagataaagt tcatcttctg aattaggcac agtaagagat taacaataac 5421
taacaataaa attgaatagt tataataata tattgtaata aaagttatgt gaatgtgatc 5481
tctttctttc tctctctcaa aa 5503

```

<210> 2

<211> 839

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Met Ser Ala Ser Arg Leu Ala Gly Thr Leu Ile Pro Ala Met Ala

10

ES 2 378 847 T3

1	5	10	15
Phe Leu Ser Cys Val Arg Pro Glu Ser Trp Glu Pro Cys Val Glu Val	20	25	30
Val Pro Asn Ile Thr Tyr Gln Cys Met Glu Leu Asn Phe Tyr Lys Ile	35	40	45
Pro Asp Asn Leu Pro Phe Ser Thr Lys Asn Leu Asp Leu Ser Phe Asn	50	55	60
Pro Leu Arg His Leu Gly Ser Tyr Ser Phe Phe Ser Phe Pro Glu Leu	65	70	75
Gln Val Leu Asp Leu Ser Arg Cys Glu Ile Gln Thr Ile Glu Asp Gly	85	90	95
Ala Tyr Gln Ser Leu Ser His Leu Ser Thr Leu Ile Leu Thr Gly Asn	100	105	110
Pro Ile Gln Ser Leu Ala Leu Gly Ala Phe Ser Gly Leu Ser Ser Leu	115	120	125
Gln Lys Leu Val Ala Val Glu Thr Asn Leu Ala Ser Leu Glu Asn Phe	130	135	140
Pro Ile Gly His Leu Lys Thr Leu Lys Glu Leu Asn Val Ala His Asn	145	150	155
Leu Ile Gln Ser Phe Lys Leu Pro Glu Tyr Phe Ser Asn Leu Thr Asn	165	170	175
Leu Glu His Leu Asp Leu Ser Ser Asn Lys Ile Gln Ser Ile Tyr Cys	180	185	190
Thr Asp Leu Arg Val Leu His Gln Met Pro Leu Leu Asn Leu Ser Leu	195	200	205
Asp Leu Ser Leu Asn Pro Met Asn Phe Ile Gln Pro Gly Ala Phe Lys	210	215	220
Glu Ile Arg Leu His Lys Leu Thr Leu Arg Asn Asn Phe Asp Ser Leu	225	230	235
Asn Val Met Lys Thr Cys Ile Gln Gly Leu Ala Gly Leu Glu Val His	245	250	255
Arg Leu Val Leu Gly Glu Phe Arg Asn Glu Gly Asn Leu Glu Lys Phe	260	265	270
Asp Lys Ser Ala Leu Glu Gly Leu Cys Asn Leu Thr Ile Glu Glu Phe	275	280	285

Arg Leu Ala Tyr Leu Asp Tyr Tyr Leu Asp Asp Ile Ile Asp Leu Phe
 290 295 300
 Asn Cys Leu Thr Asn Val Ser Ser Phe Ser Leu Val Ser Val Thr Ile
 305 310 315 320
 Glu Arg Val Lys Asp Phe Ser Tyr Asn Phe Gly Trp Gln His Leu Glu
 325 330 335
 Leu Val Asn Cys Lys Phe Gly Gln Phe Pro Thr Leu Lys Leu Lys Ser
 340 345 350
 Leu Lys Arg Leu Thr Phe Thr Ser Asn Lys Gly Gly Asn Ala Phe Ser
 355 360 365
 Glu Val Asp Leu Pro Ser Leu Glu Phe Leu Asp Leu Ser Arg Asn Gly
 370 375 380
 Leu Ser Phe Lys Gly Cys Cys Ser Gln Ser Asp Phe Gly Thr Thr Ser
 385 390 395 400
 Leu Lys Tyr Leu Asp Leu Ser Phe Asn Gly Val Ile Thr Met Ser Ser
 405 410 415
 Asn Phe Leu Gly Leu Glu Gln Leu Glu His Leu Asp Phe Gln His Ser
 420 425 430
 Asn Leu Lys Gln Met Ser Glu Phe Ser Val Phe Leu Ser Leu Arg Asn
 435 440 445
 Leu Ile Tyr Leu Asp Ile Ser His Thr His Thr Arg Val Ala Phe Asn
 450 455 460
 Gly Ile Phe Asn Gly Leu Ser Ser Leu Glu Val Leu Lys Met Ala Gly
 465 470 475 480
 Asn Ser Phe Gln Glu Asn Phe Leu Pro Asp Ile Phe Thr Glu Leu Arg
 485 490 495
 Asn Leu Thr Phe Leu Asp Leu Ser Gln Cys Gln Leu Glu Gln Leu Ser
 500 505 510
 Pro Thr Ala Phe Asn Ser Leu Ser Ser Leu Gln Val Leu Asn Met Ser
 515 520 525
 His Asn Asn Phe Phe Ser Leu Asp Thr Phe Pro Tyr Lys Cys Leu Asn
 530 535 540
 Ser Leu Gln Val Leu Asp Tyr Ser Leu Asn His Ile Met Thr Ser Lys
 545 550 555 560

Lys Gln Glu Leu Gln His Phe Pro Ser Ser Leu Ala Phe Leu Asn Leu
 565 570 575
 Thr Gln Asn Asp Phe Ala Cys Thr Cys Glu His Gln Ser Phe Leu Gln
 580 585 590
 Trp Ile Lys Asp Gln Arg Gln Leu Leu Val Glu Val Glu Arg Met Glu
 595 600 605
 Cys Ala Thr Pro Ser Asp Lys Gln Gly Met Pro Val Leu Ser Leu Asn
 610 615 620
 Ile Thr Cys Gln Met Asn Lys Thr Ile Ile Gly Val Ser Val Leu Ser
 625 630 635 640
 Val Leu Val Val Ser Val Val Ala Val Leu Val Tyr Lys Phe Tyr Phe
 645 650 655
 His Leu Met Leu Leu Ala Gly Cys Ile Lys Tyr Gly Arg Gly Glu Asn
 660 665 670
 Ile Tyr Asp Ala Phe Val Ile Tyr Ser Ser Gln Asp Glu Asp Trp Val
 675 680 685
 Arg Asn Glu Leu Val Lys Asn Leu Glu Glu Gly Val Pro Pro Phe Gln
 690 695 700
 Leu Cys Leu His Tyr Arg Asp Phe Ile Pro Gly Val Ala Ile Ala Ala
 705 710 715 720
 Asn Ile Ile His Glu Gly Phe His Lys Ser Arg Lys Val Ile Val Val
 725 730 735
 Val Ser Gln His Phe Ile Gln Ser Arg Trp Cys Ile Phe Glu Tyr Glu
 740 745 750
 Ile Ala Gln Thr Trp Gln Phe Leu Ser Ser Arg Ala Gly Ile Ile Phe
 755 760 765
 Ile Val Leu Gln Lys Val Glu Lys Thr Leu Leu Arg Gln Gln Val Glu
 770 775 780
 Leu Tyr Arg Leu Leu Ser Arg Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Glu Asp Ser
 785 790 795 800
 Val Leu Gly Arg His Ile Phe Trp Arg Arg Leu Arg Lys Ala Leu Leu
 805 810 815
 Asp Gly Lys Ser Trp Asn Pro Glu Gly Thr Val Gly Thr Gly Cys Asn
 820 825 830
 Trp Gln Glu Ala Thr Ser Ile
 835

<210> 3
 <211> 608
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 3

Glu Ser Trp Glu Pro Cys Val Glu Val Val Pro Asn Ile Thr Tyr Gln
 1 5 10
 Cys Met Glu Leu Asn Phe Tyr Lys Ile Pro Asp Asn Leu Pro Phe Ser
 20 25 30
 Thr Lys Asn Leu Asp Leu Ser Phe Asn Pro Leu Arg His Leu Gly Ser
 35 40 45
 Tyr Ser Phe Phe Ser Phe Pro Glu Leu Gln Val Leu Asp Leu Ser Arg
 50 55 60
 Cys Glu Ile Gln Thr Ile Glu Asp Gly Ala Tyr Gln Ser Leu Ser His
 65 70 75 80
 Leu Ser Thr Leu Ile Leu Thr Gly Asn Pro Ile Gln Ser Leu Ala Leu
 85 90 95
 Gly Ala Phe Ser Gly Leu Ser Ser Leu Gln Lys Leu Val Ala Val Glu
 100 105 110
 Thr Asn Leu Ala Ser Leu Glu Asn Phe Pro Ile Gly His Leu Lys Thr
 115 120 125
 Leu Lys Glu Leu Asn Val Ala His Asn Leu Ile Gln Ser Phe Lys Leu
 130 135 140
 Pro Glu Tyr Phe Ser Asn Leu Thr Asn Leu Glu His Leu Asp Leu Ser
 145 150 155 160
 Ser Asn Lys Ile Gln Ser Ile Tyr Cys Thr Asp Leu Arg Val Leu His
 165 170 175
 Gln Met Pro Leu Leu Asn Leu Ser Leu Asp Leu Ser Leu Asn Pro Met
 180 185 190
 Asn Phe Ile Gln Pro Gly Ala Phe Lys Glu Ile Arg Leu His Lys Leu
 195 200 205
 Thr Leu Arg Asn Asn Phe Asp Ser Leu Asn Val Met Lys Thr Cys Ile
 210 215 220
 Gln Gly Leu Ala Gly Leu Glu Val His Arg Leu Val Leu Gly Glu Phe
 225 230 235 240

Arg Asn Glu Gly Asn₂₄₅ Leu Glu Lys Phe Asp₂₅₀ Lys Ser Ala Leu Glu₂₅₅ Gly
 Leu Cys Asn Leu₂₆₀ Thr Ile Glu Glu Phe₂₆₅ Arg Leu Ala Tyr Leu₂₇₀ Asp Tyr
 Tyr Leu Asp₂₇₅ Asp Ile Ile Asp Leu₂₈₀ Phe Asn Cys Leu Thr₂₈₅ Asn Val Ser
 Ser Phe₂₉₀ Ser Leu Val Ser Val₂₉₅ Thr Ile Glu Arg Val₃₀₀ Lys Asp Phe Ser
 Tyr Asn₃₀₅ Phe Gly Trp Gln₃₁₀ His Leu Glu Leu Val₃₁₅ Asn Cys Lys Phe Gly₃₂₀
 Gln Phe Pro Thr Leu₃₂₅ Lys Leu Lys Ser Leu₃₃₀ Lys Arg Leu Thr Phe₃₃₅ Thr
 Ser Asn Lys Gly₃₄₀ Gly Asn Ala Phe Ser₃₄₅ Glu Val Asp Leu Pro₃₅₀ Ser Leu
 Glu Phe Leu₃₅₅ Asp Leu Ser Arg Asn₃₆₀ Gly Leu Ser Phe Lys₃₆₅ Gly Cys Cys
 Ser Gln₃₇₀ Ser Asp Phe Gly Thr₃₇₅ Thr Ser Leu Lys Tyr₃₈₀ Leu Asp Leu Ser
 Phe Asn₃₈₅ Gly Val Ile Thr₃₉₀ Met Ser Ser Asn Phe₃₉₅ Leu Gly Leu Glu₄₀₀ Gln
 Leu Glu His Leu Asp₄₀₅ Phe Gln His Ser Asn₄₁₀ Leu Lys Gln Met Ser₄₁₅ Glu
 Phe Ser Val Phe₄₂₀ Leu Ser Leu Arg Asn₄₂₅ Leu Ile Tyr Leu Asp₄₃₀ Ile Ser
 His Thr His₄₃₅ Thr Arg Val Ala Phe₄₄₀ Asn Gly Ile Phe Asn₄₄₅ Gly Leu Ser
 Ser Leu Glu Val Leu Lys Met₄₅₅ Ala Gly Asn Ser Phe₄₆₀ Gln Glu Asn Phe
 Leu Pro Asp Ile Phe Thr₄₇₀ Glu Leu Arg Asn Leu₄₇₅ Thr Phe Leu Asp Leu₄₈₀
 Ser Gln Cys Gln₄₈₅ Leu Glu Gln Leu Ser Pro₄₉₀ Thr Ala Phe Asn Ser₄₉₅ Leu
 Ser Ser Leu Gln₅₀₀ Val Leu Asn Met Ser₅₀₅ His Asn Asn Phe Phe₅₁₀ Ser Leu

Asp Thr Phe Pro Tyr Lys Cys Leu Asn Ser Leu Gln Val Leu Asp Tyr
515 520 525

Ser Leu Asn His Ile Met Thr Ser Lys Lys Gln Glu Leu Gln His Phe
530 535 540

Pro Ser Ser Leu Ala Phe Leu Asn Leu Thr Gln Asn Asp Phe Ala Cys
545 550 555 560

Thr Cys Glu His Gln Ser Phe Leu Gln Trp Ile Lys Asp Gln Arg Gln
565 570 575

Leu Leu Val Glu Val Glu Arg Met Glu Cys Ala Thr Pro Ser Asp Lys
580 585 590

Gln Gly Met Pro Val Leu Ser Leu Asn Ile Thr Cys Gln Met Asn Lys
595 600 605

<210> 4

<211> 30

5 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> cebador

10

<400> 4

gattagcata cttagactac tacctccatg 30

<210> 5

15 <211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

20 <223> cebador

<400> 5 tgtgggaaac gttccaaatt taca 24

<210> 6

25 <211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

30 <223> cebador

<400> 6

tgagtttcaa aggttgctgt tctc 24

<210> 7

35 <211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

40 <223> cebador

	<400> 7 aggaatactg aaaactcact catttggt	28
5	<210> 8 <211> 15 <212> DNA <213> Artificial	
10	<220> <223> cebador	
15	<400> 8 ttaggctggt tgtcc	15
20	<210> 9 <211> 15 <212> DNA <213> Artificial	
	<220> <223> cebador	
25	<400> 9 ttaggctgat tgtcc	15
30	<210> 10 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial	
	<220> <223> cebador	
35	<400> 10 gattagcata ctagactac tacctccatg	30
40	<210> 11 <211> 24 <212> DNA <213> Artificial	
45	<220> <223> cebador	
	<400> 11 tgtgggaac gtccaaatt taca	24
50	<210> 12 <211> 25 <212> DNA <213> Artificial	
55	<220> <223> cebador	
60	<400> 12 ccattgaaga attccgatta gcata	25
	<210> 13 <211> 23 <212> DNA <213> Artificial	

<220>
 <223> cebador

 <400> 13
 5 cactcaccag ggaaatgaa gaa 23

 <210> 14
 <211> 24
 <212> DNA
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador
 <220>
 15 <221> union al cebador
 <222> (1)..(24)

 <400> 14
 20 tgagtttcaa aggttgctgt tctc 24

 <210> 15
 <211> 28
 <212> DNA
 25 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 15
 30 aggaatactg aaaactcact catttggt 28

 <210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido CpG

 <400> 16
 40 tccatgacgt tctgacgt 20

 <210> 17
 <211> 34
 45 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> péptido inhibidor
 50
 <400> 17
 Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Lys Lys Tyr Ser Arg Gly
 1 5 10 15

 Glu Ser Ile Tyr Asp Ala Phe Val Ile Tyr Ser Ser Gln Asn Glu Asp
 20 25 30

 Trp Val

 <210> 18
 55 <211> 34

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
5 <223> péptido mutante inhibidor

<400> 18

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Glu Glu Tyr Ser Glu Gly
1 5 10 15

Glu Ser Ile Tyr Asp Ala Phe Val Ile Tyr Ser Ser Gln Asn Glu Asp
20 25 30

Trp Val

10 <210> 19
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

15 <220>
<223> ODN inhibidor de TLR7/9

<400> 19
tgctcctgga ggggttgt 18

20 <210> 20
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial

25 <220>
<223> ODN de control

<400> 20
tcctgcaggt taagt 15

30 <210> 21
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

35 <220>
<223> cebador

40 <400> 21
ccattgaaga attccgatta gcata 25
<210> 22
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

45 <220>
<223> cebador

50 <400> 22
cactcaccag ggaaaatgaa gaa 23

55 <210> 23
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial

	<220>	
	<223> Oligonucleótido específico de alelo	
5	<400> 23	
	cctcgatgat attatt	16
	<210> 24	
	<211> 16	
10	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido específico de alelo	
15	<400> 24	
	ctcgatggta ttattg	16
20		

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método *in vitro* para determinar la sensibilidad de un sujeto a un tratamiento quimioterápico del cáncer seleccionado de una antraciclina, oxali-platino y cis-platino, cuyo método comprende detectar la presencia de un ácido nucleico de receptor 4 similar a Toll (TLR4) mutado o una expresión o actividad anormal de la proteína TLR4 en una muestra del sujeto, y la presencia de dicho ácido nucleico de TLR4 mutado o expresión o actividad anormal de TLR4 es indicativa de una resistencia a dicho tratamiento.
- 10 2. Un método *in vitro* para determinar la sensibilidad de un sujeto a la radioterapia, cuyo método comprende detectar la presencia de un ácido nucleico de un receptor 4 similar a Toll (TLR4) mutado o una expresión o actividad anormal de la proteína TLR4 en una muestra del sujeto, y la presencia de dicho ácido nucleico de TLR4 mutado o la expresión o actividad anormal de TLR4 es indicativa de una resistencia a dicho tratamiento.
- 15 3. El método de la reivindicación 1, en el que el tratamiento incluye además rayos X (RX).
4. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, estómago, sarcoma, ovárico, endometrio, vejiga, cuello de útero, próstata, recto, colon, pulmón, cáncer ORL, tumores pediátricos (neuroblastoma, glioblastoma multiforme), linfoma, leucemia, mieloma, seminoma, Hodgkin y hemopatías malignas.
- 20 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la presencia de un ácido nucleico de TLR4 mutado se detecta mediante el uso de la digestión de restricción, secuenciación, hibridación selectiva y/o amplificación selectiva.
- 25 6. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que el ácido nucleico de TLR4 mutado es un ácido nucleico de TLR4 de tipo natural que comprende una mutación puntual, preferiblemente un polimorfismo de nucleótido simple (SNP) que conduce a la sustitución de asparagina por glicina en la posición 299 y/o a la sustitución de treonina por isoleucina en la posición 399.
- 30 7. El método de la reivindicación 1 ó 2, cuyo método comprende determinar la expresión de la proteína TLR4 anormal midiendo el nivel celular de mRNA que codifica un TLR4 normal, en el que un nivel disminuido en comparación con un nivel de control o patrón se correlaciona con una expresión anormal de la proteína TLR4.
- 35 8. El método de la reivindicación 1 ó 2, cuyo método comprende determinar la presencia de una proteína TLR4 anormal, poniendo en contacto la muestra con un ligando identificado para unirse específicamente a tal proteína TLR4 anormal, tal como un anticuerpo específico para dicho TLR4 anormal.
- 40 9. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que el sujeto se someterá a un trasplante alogénico de médula ósea mediante el uso de la médula ósea de un sujeto donante que tiene una expresión o actividad normal de la proteína TLR4.

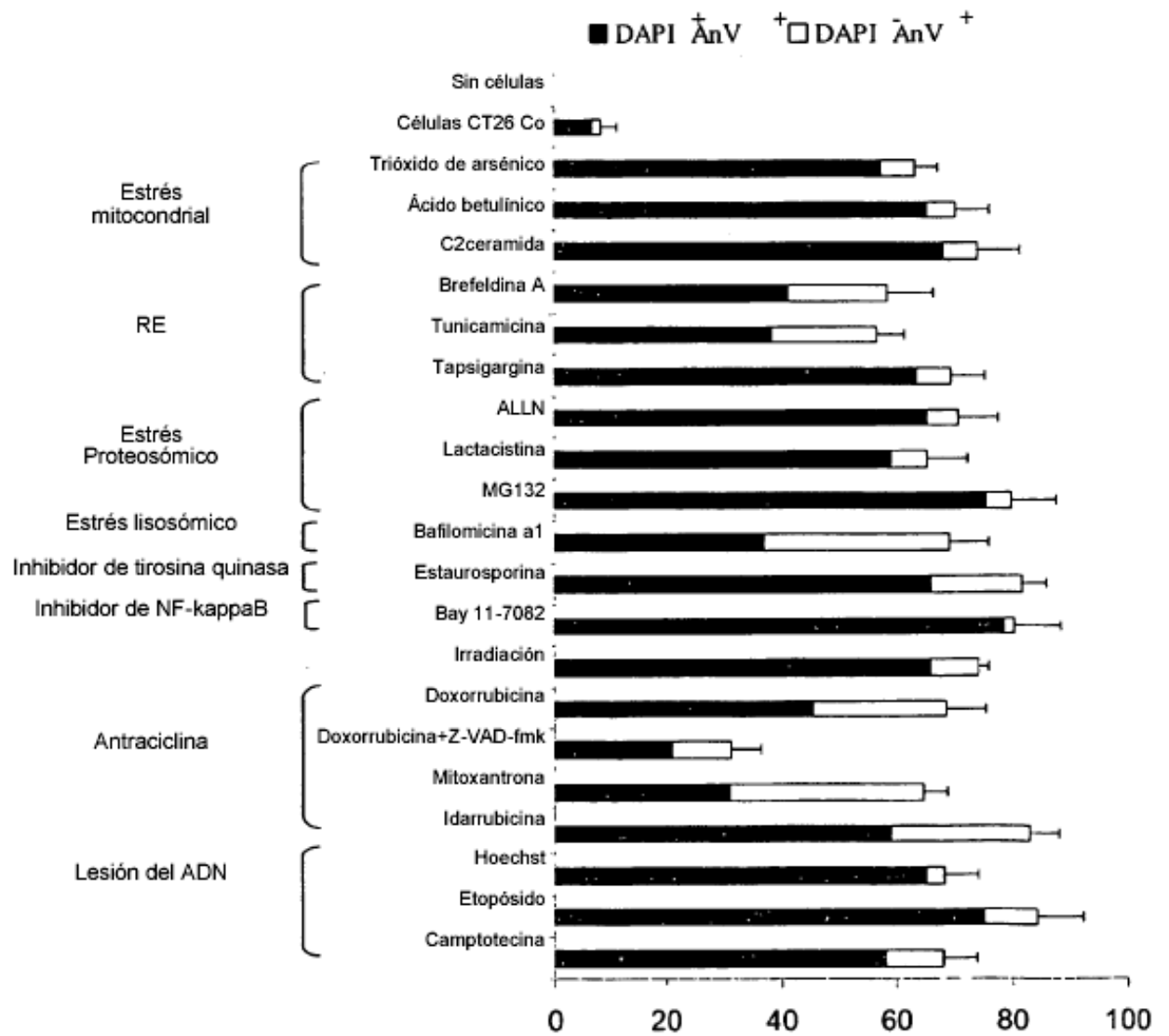


Figura 1 A

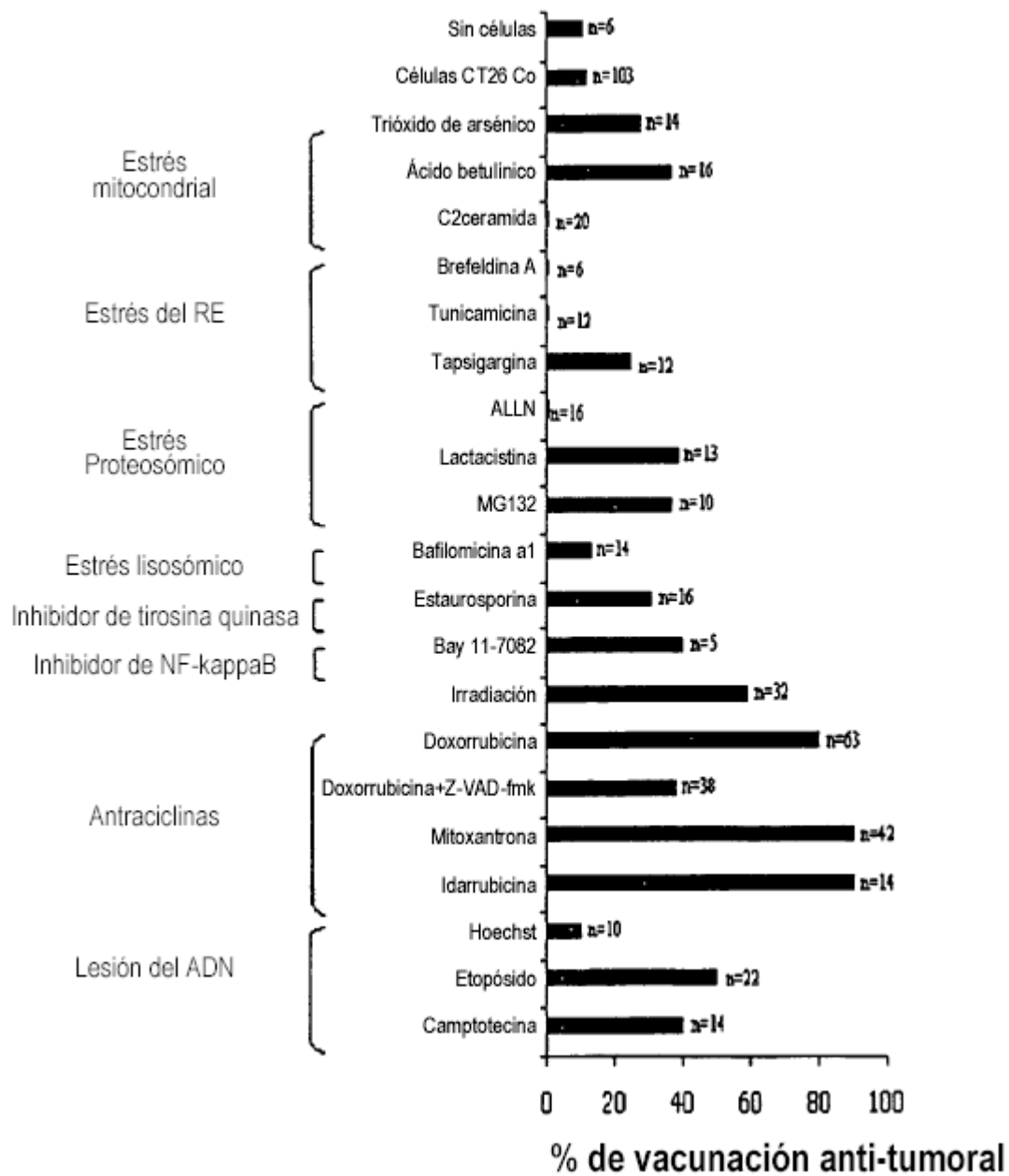
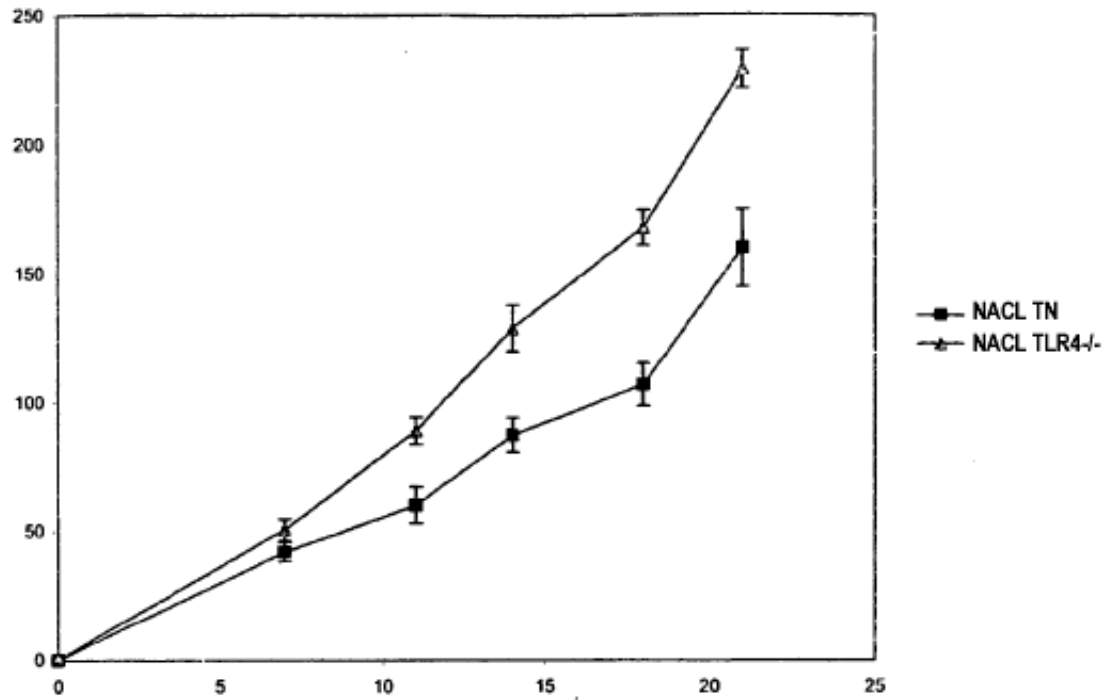


Figura 1B

A



B

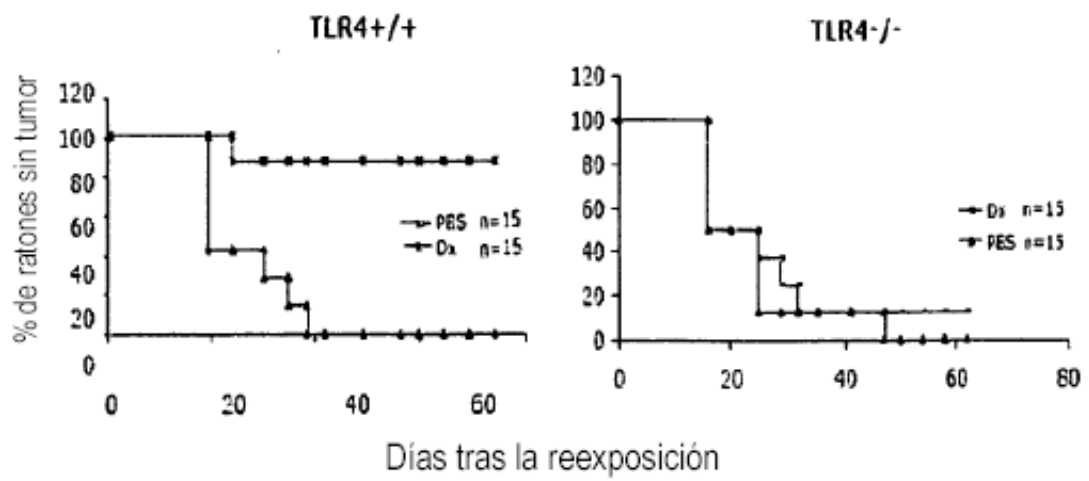


Figura 2

C

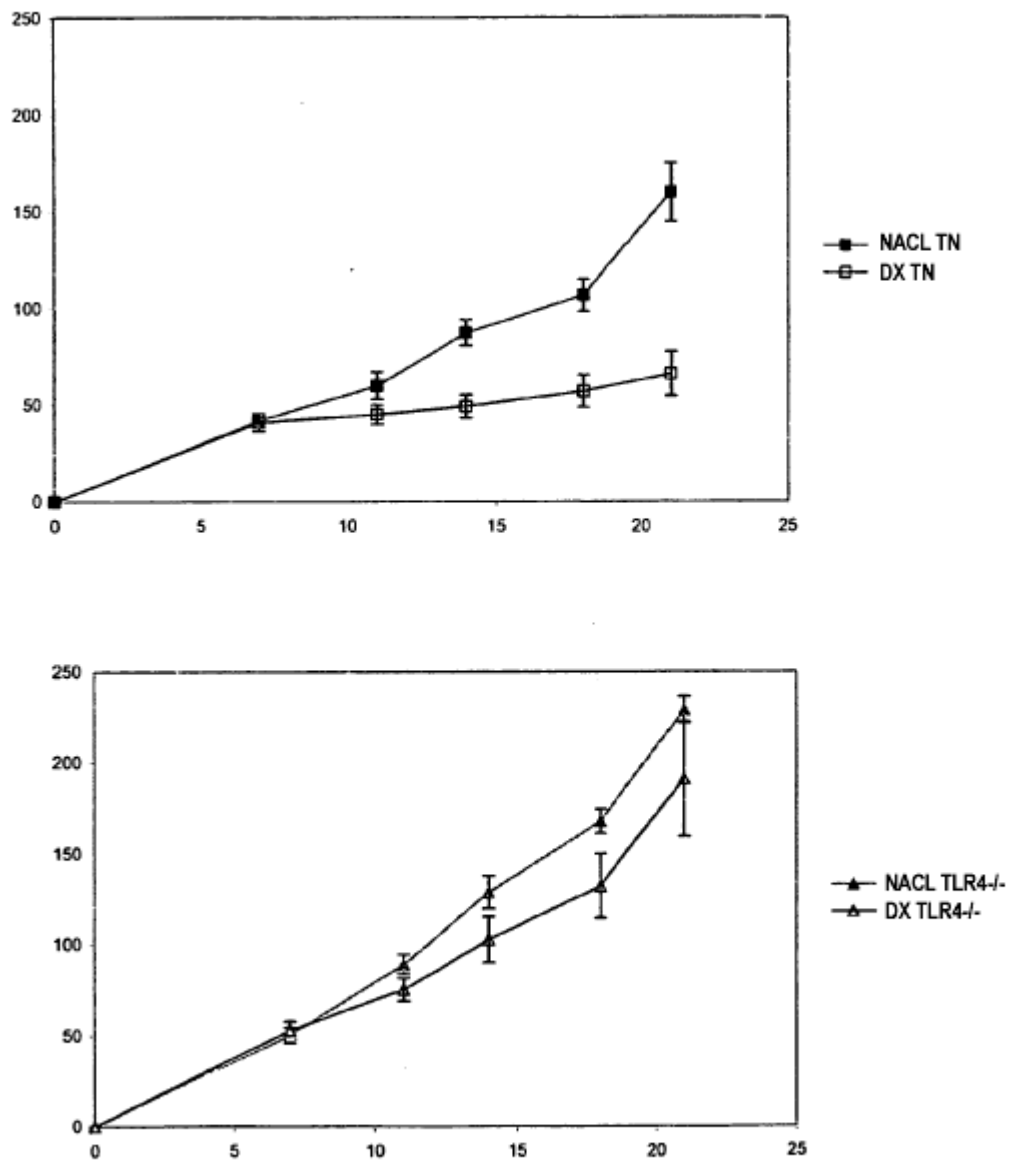


Figura 2

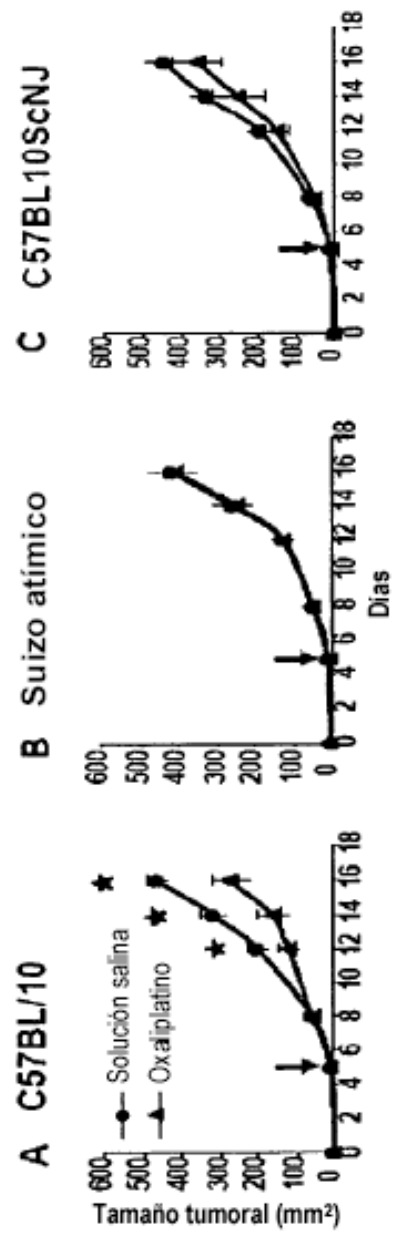


Figura 3

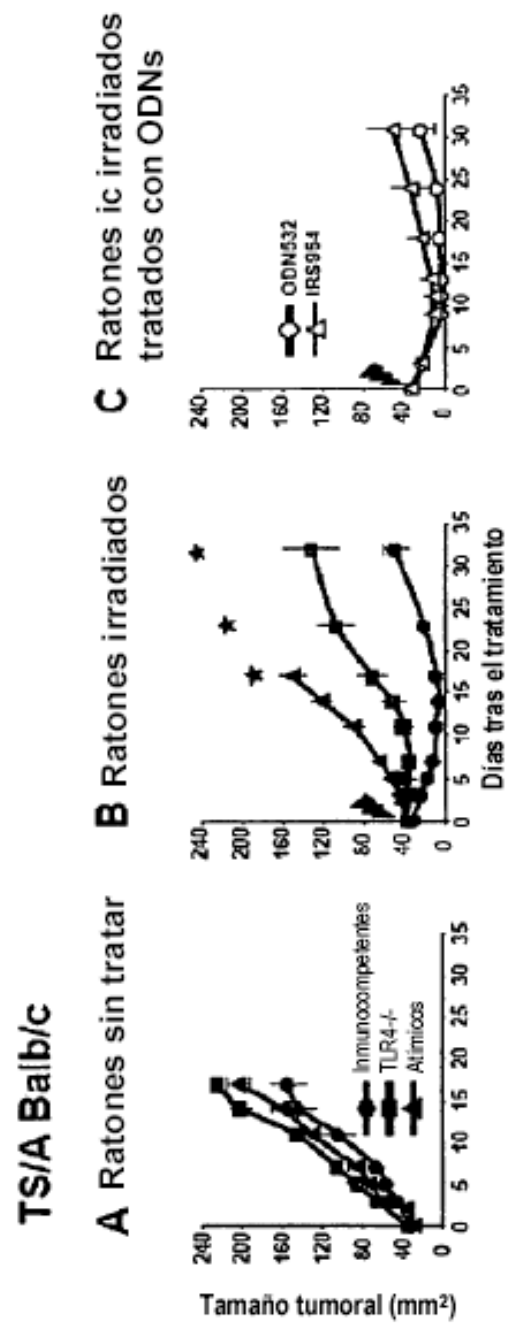


Figura 4

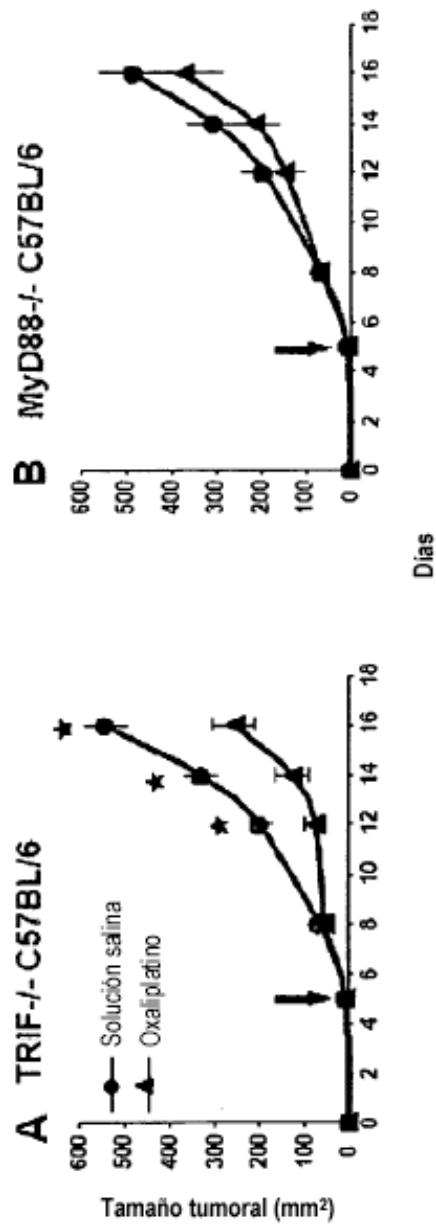


Figura 5

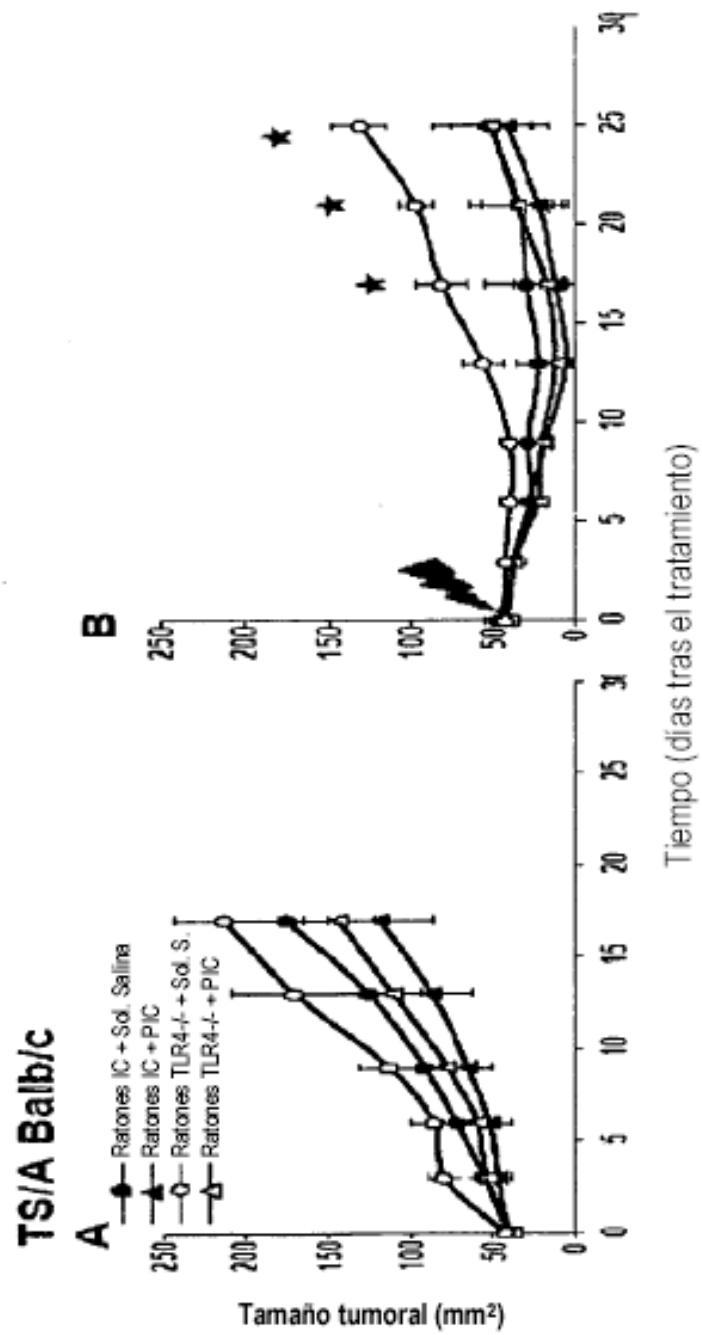


Figura 6

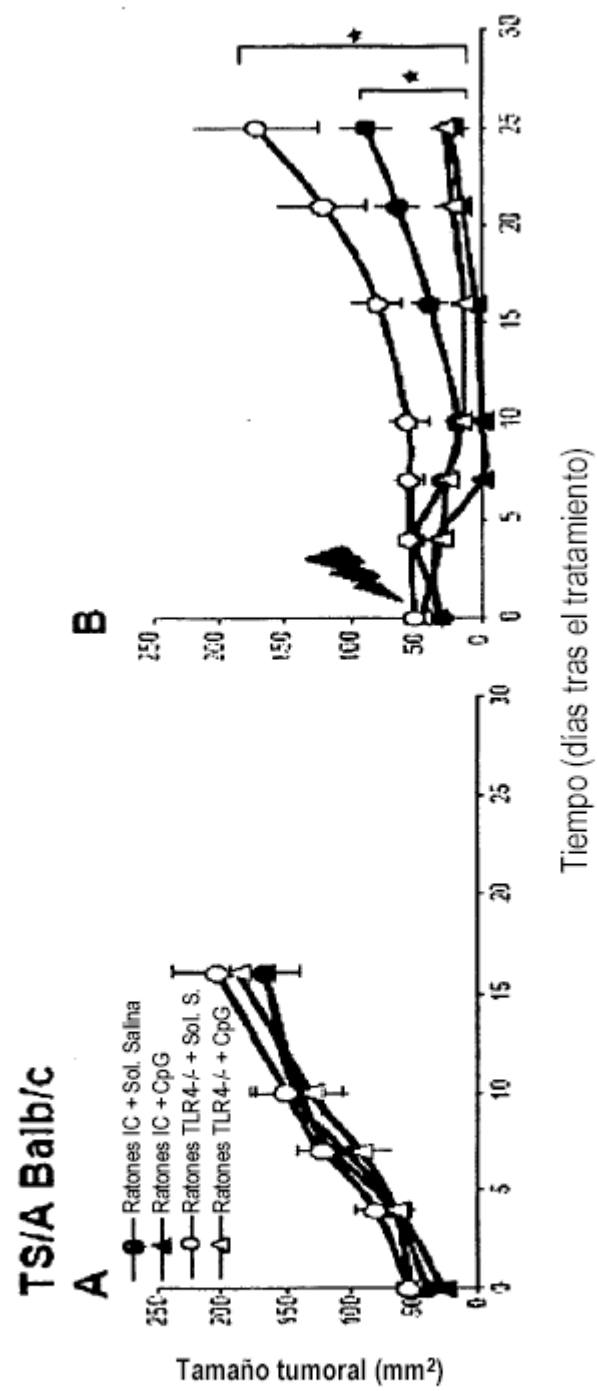


Figura 7

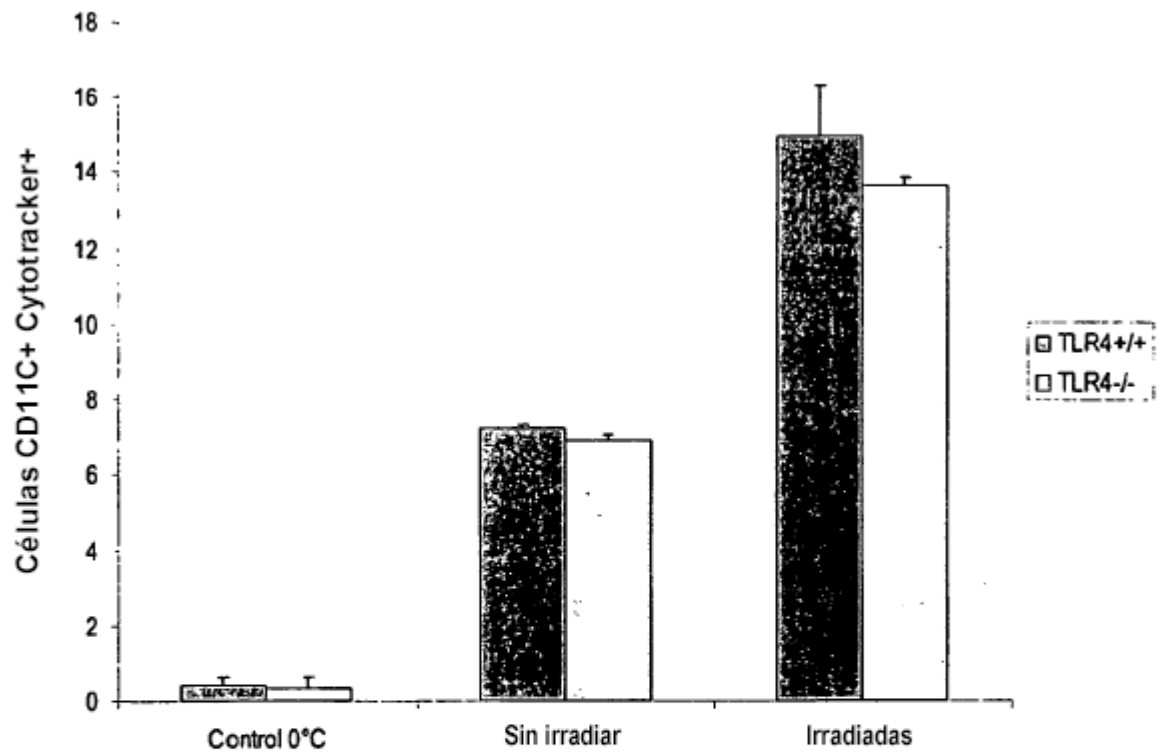


Figura 8A

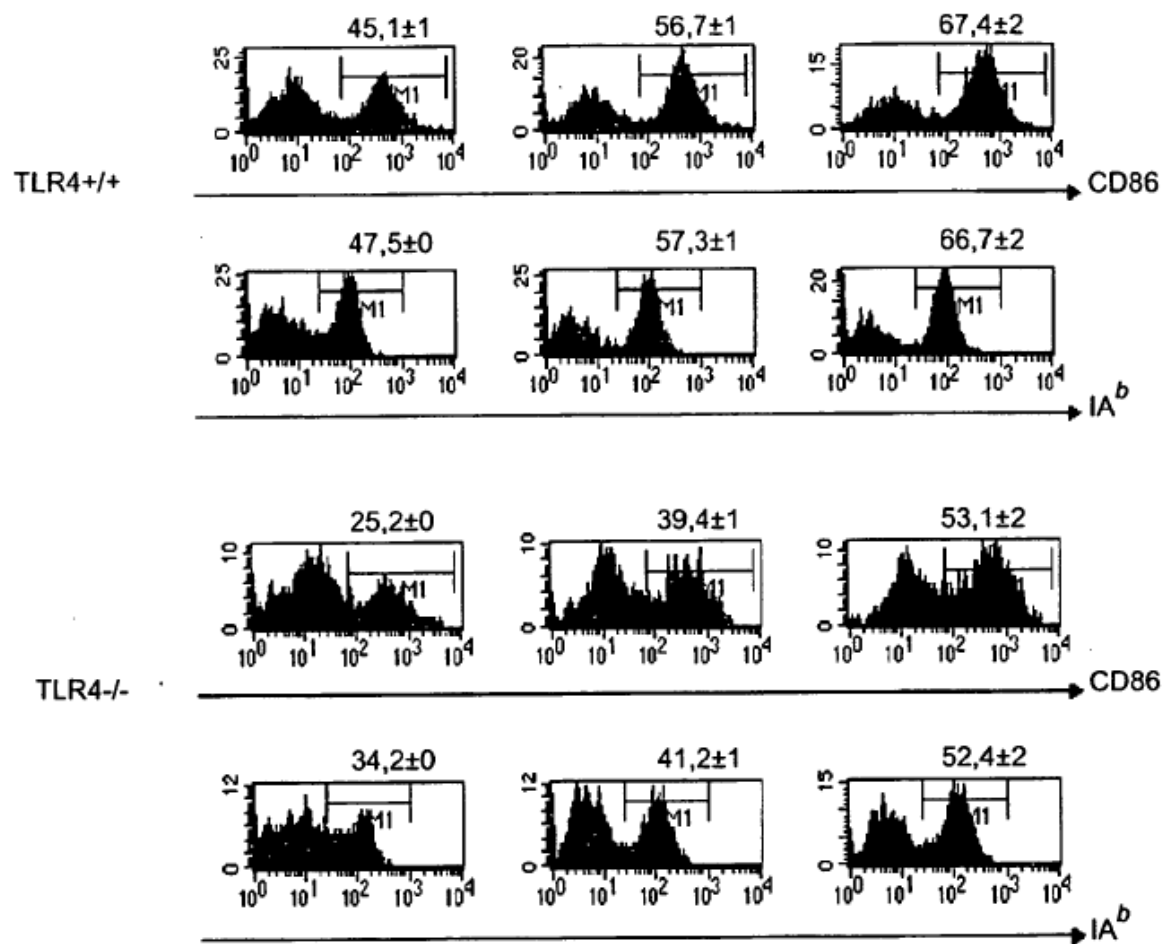


Figura 8B

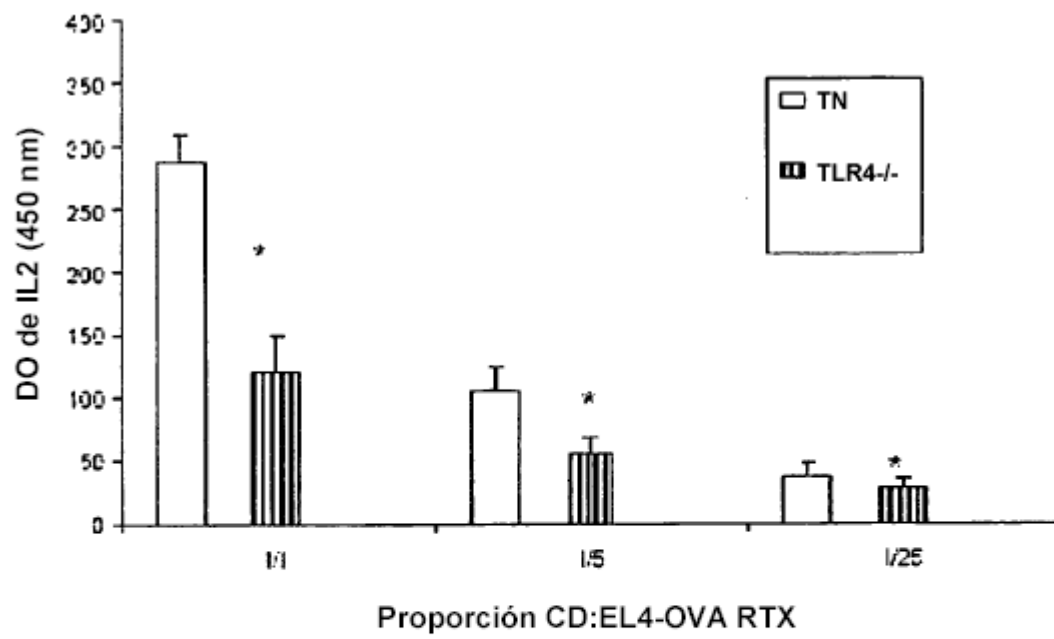


Figura 9A

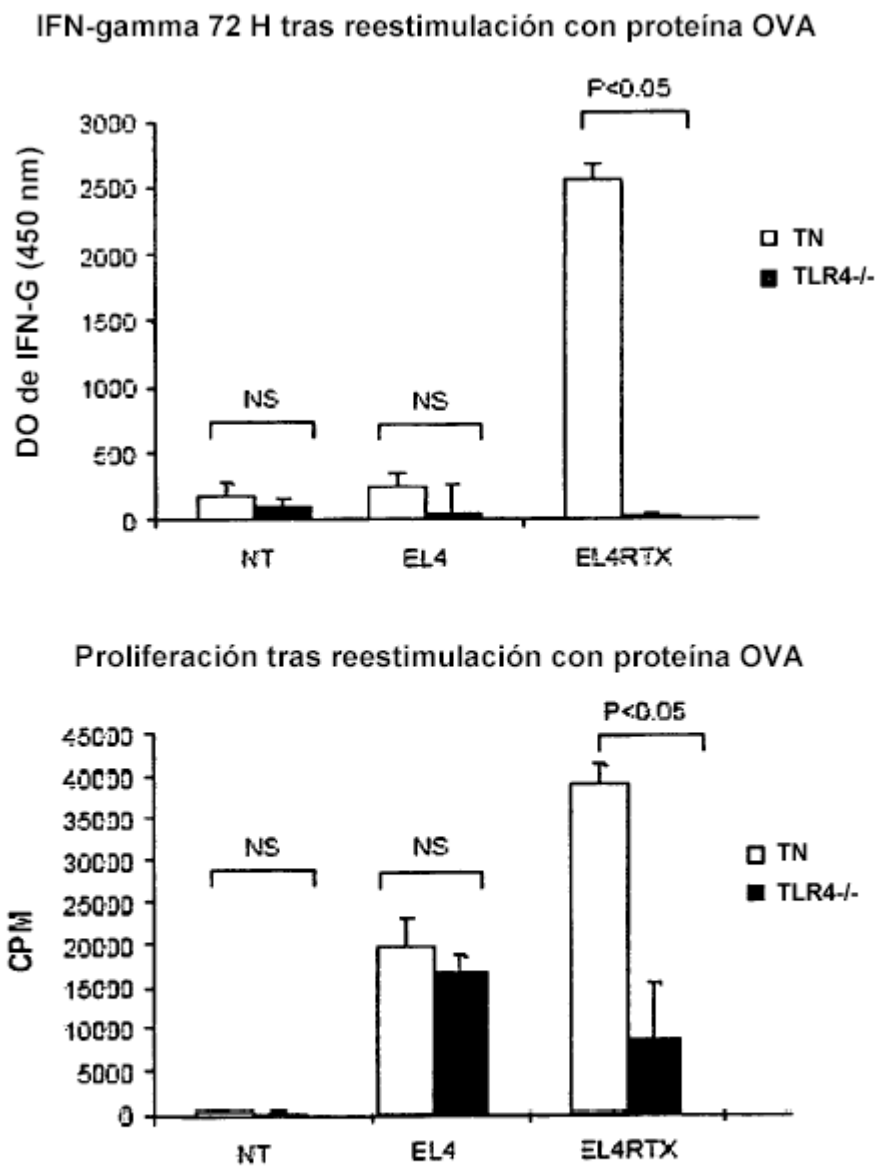


Figura 9B

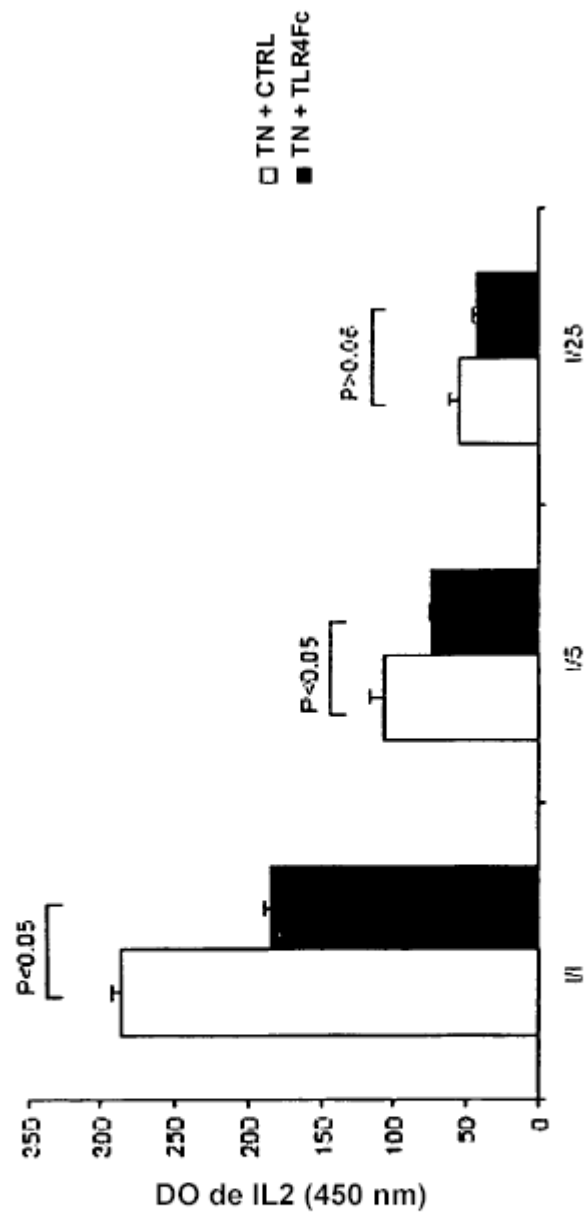


Figura 10A

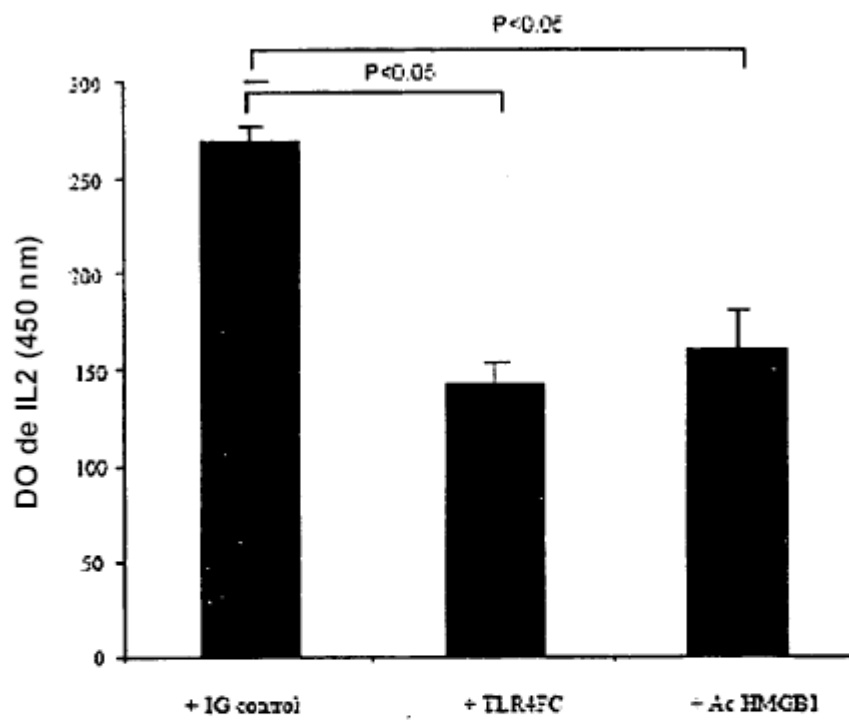


Figura 10B

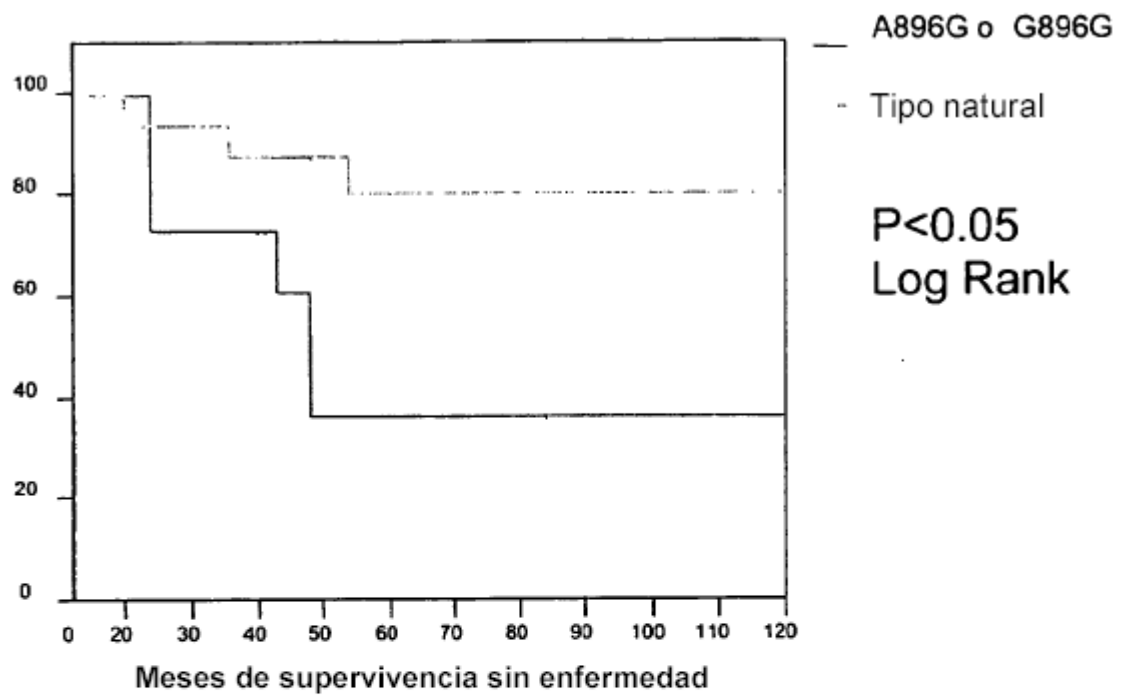


Figura 11A

	Grupo de control (n=112)	Cáncer de mama (n=56)	Valor p
Edad m $\pm$ DE Mujer n (%)	65.5 $\pm$ 12 112 (100)	65.7 $\pm$ 12 56 (100)	NS NS
Origen étnico			
- Caucásico n (%)	93 (83)	48 (85.7)	NS
- Africano n (%)	2 (1.8)	1 (1.8)	NS
- Mediterráneo n (%)	15 (13.4)	6 (10.7)	NS
- Asiático n (%)	2 (1.8)	1 (1.8)	NS
Patología			
- Control n (%)	54 (48.2)	26 (46.4)	NS
- Choque n (%)	28 (25)	16 (28.6)	NS
- Sepsis n (%)	30 (26.8)	14 (25)	NS
Incidencia de la mutación Asp299Gly	7 (6.3)	12 (21.4)	0.004

Figura 11B

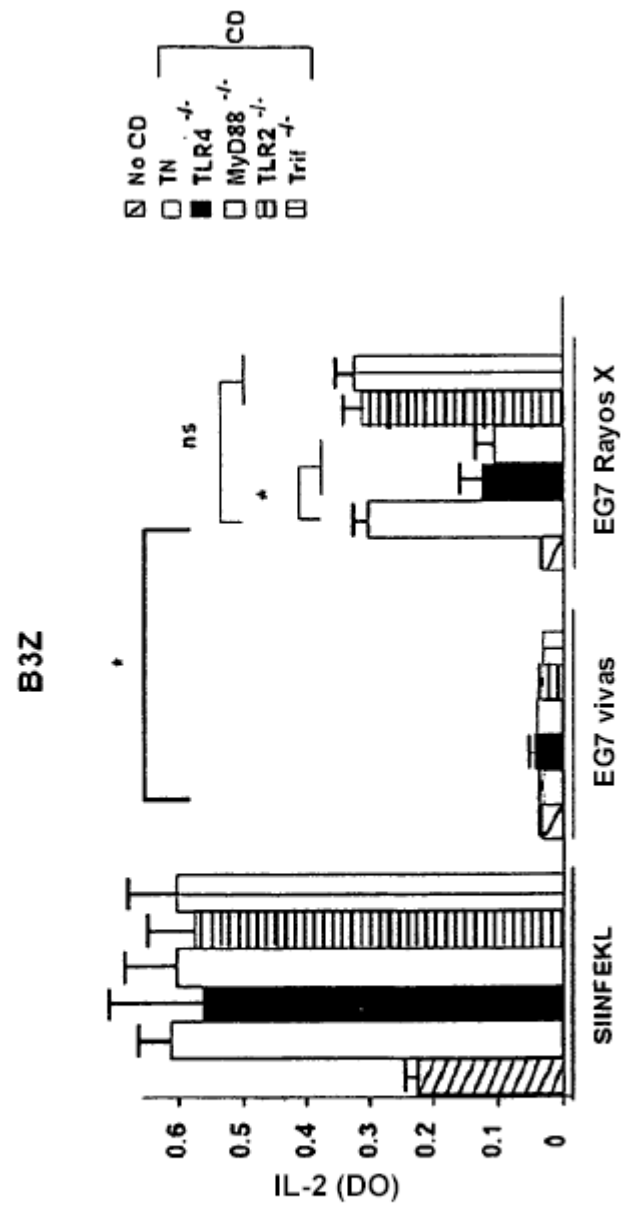


Figura 12

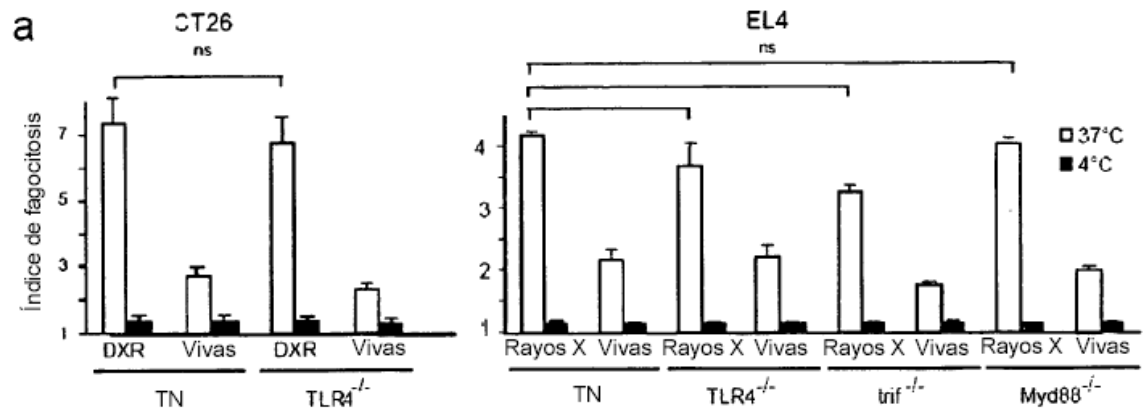


Figura 13a

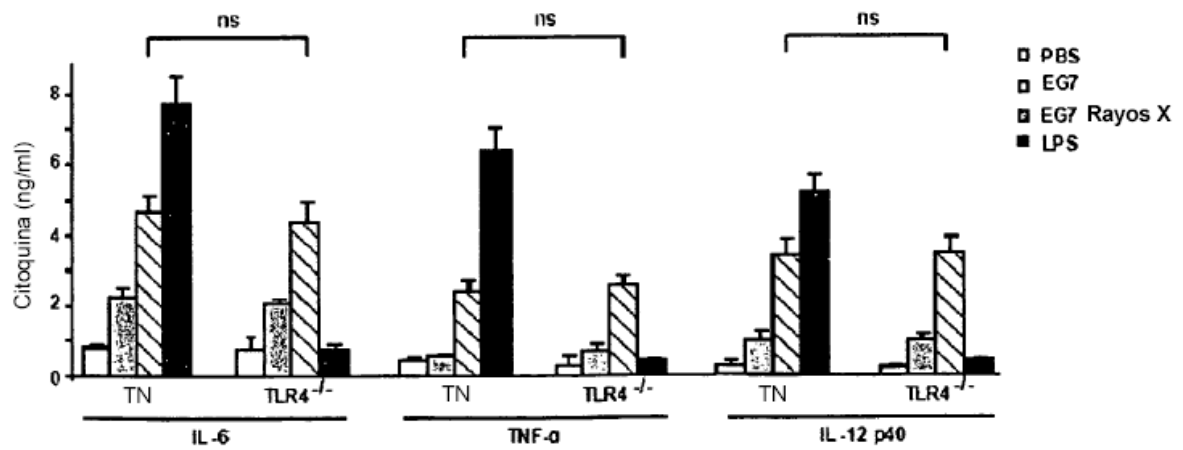


Figura 13b

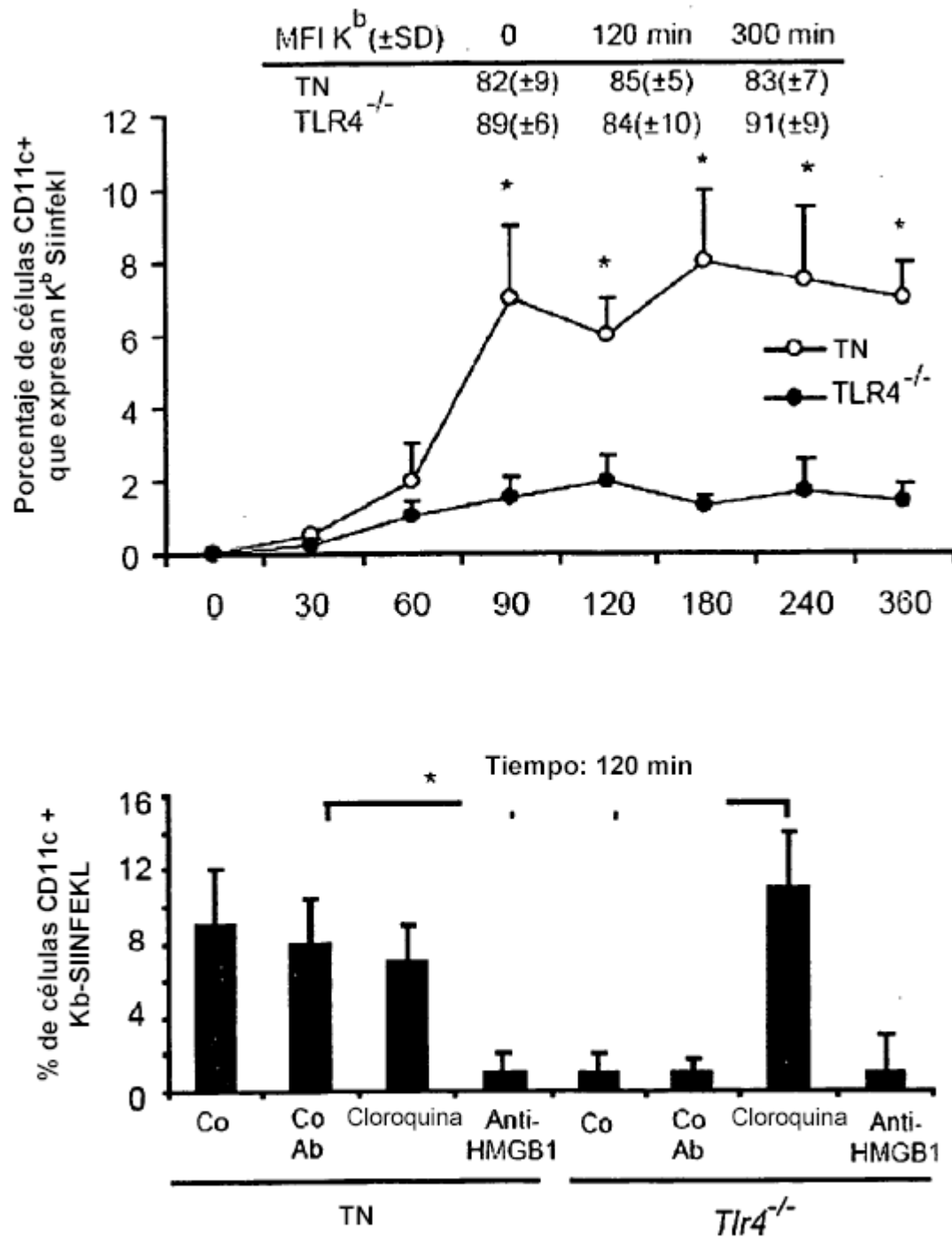


Figura 14a

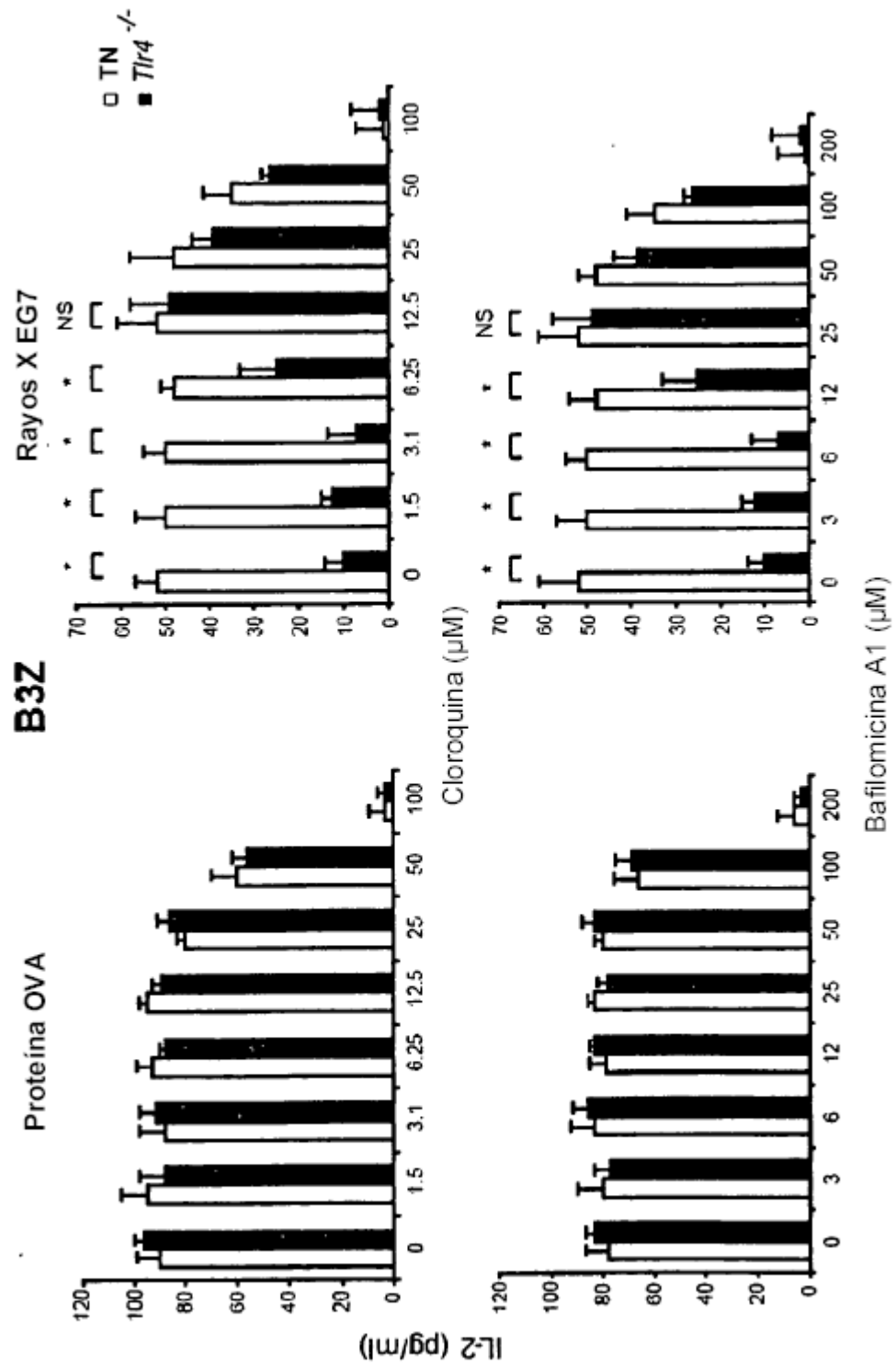


Figura 14b

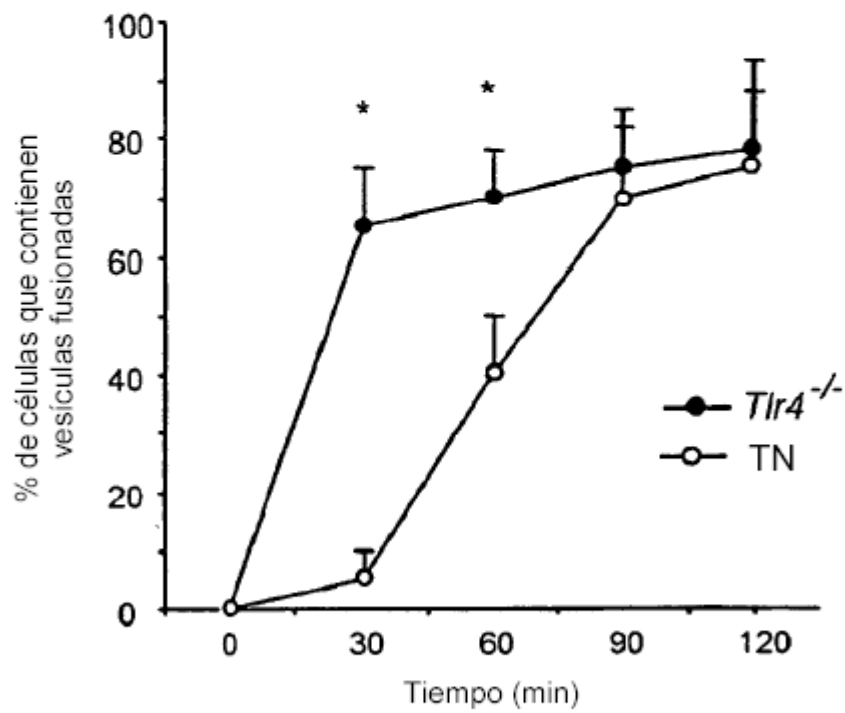
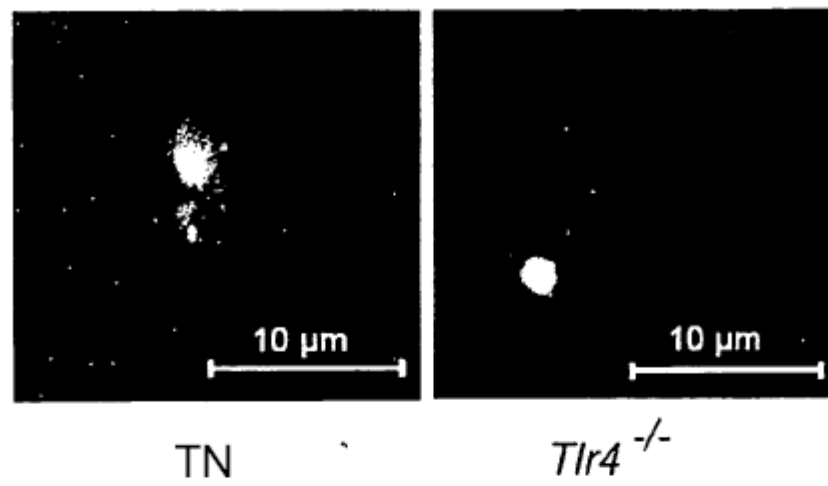


Figura 14c

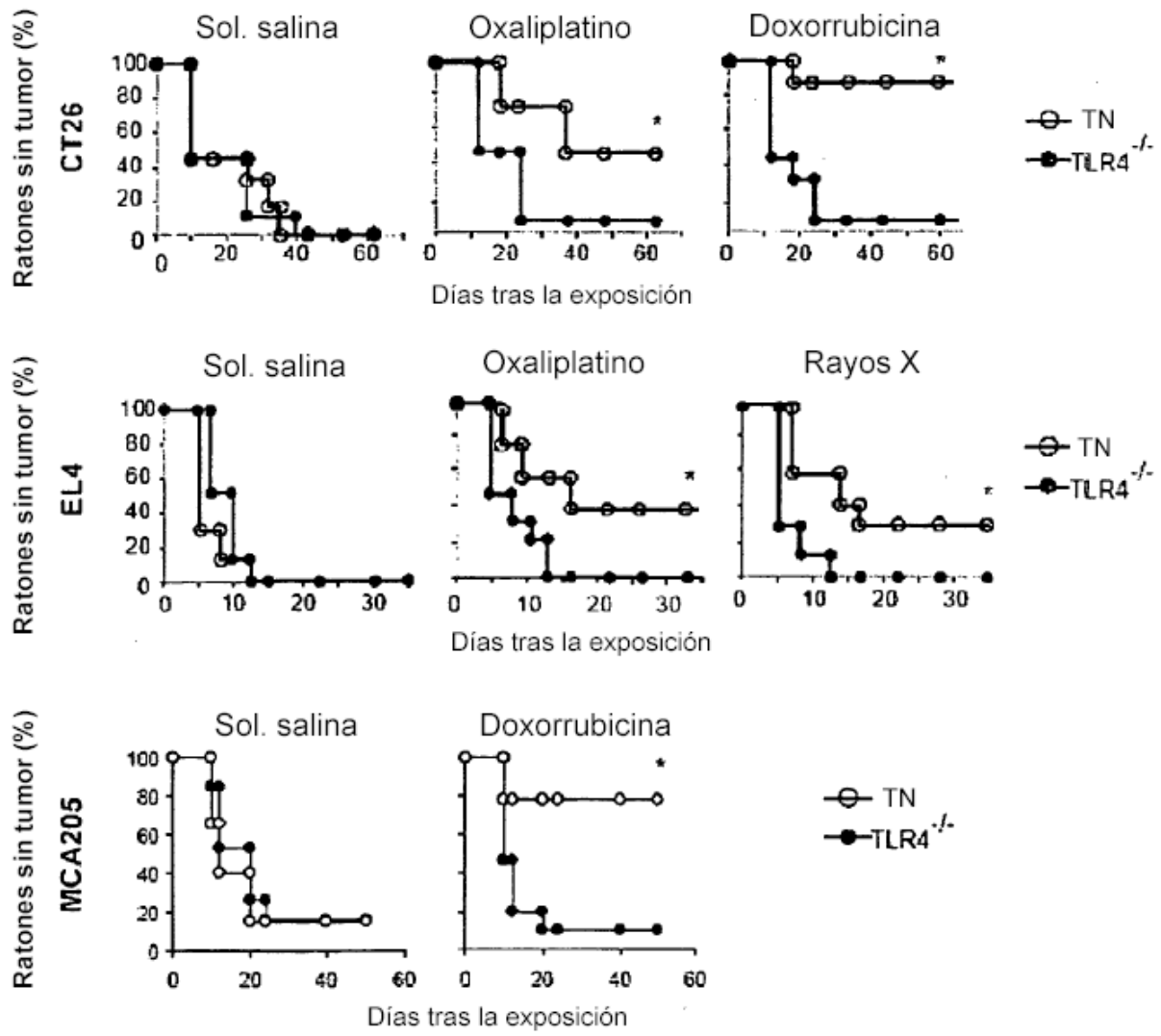


Figura 15a

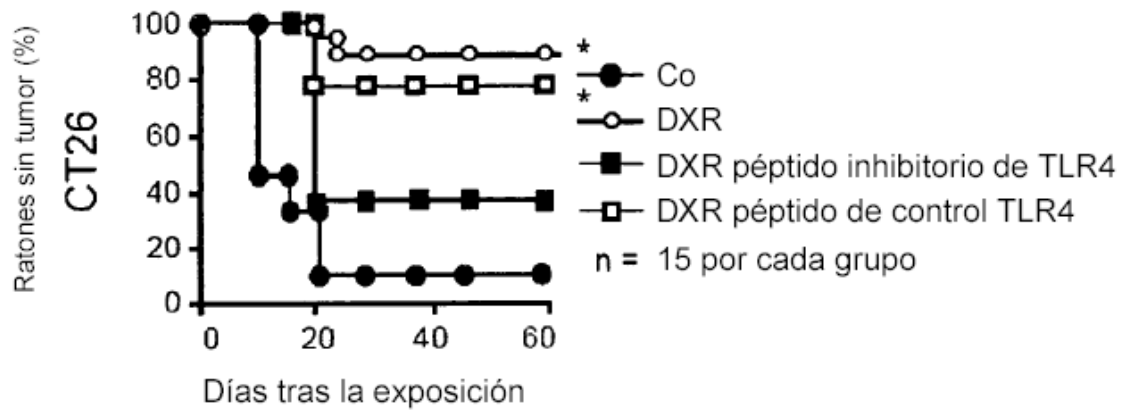


Figura 15b

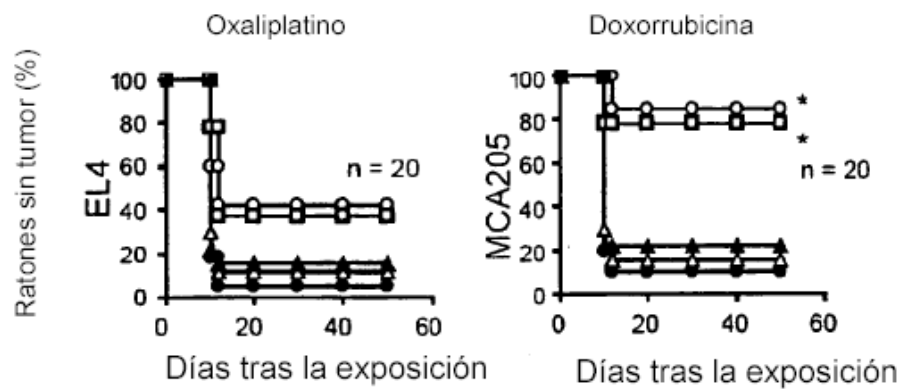
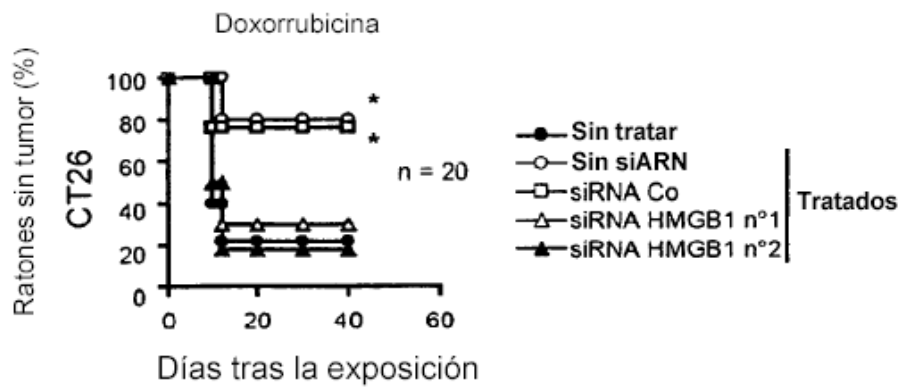


Figura 15c

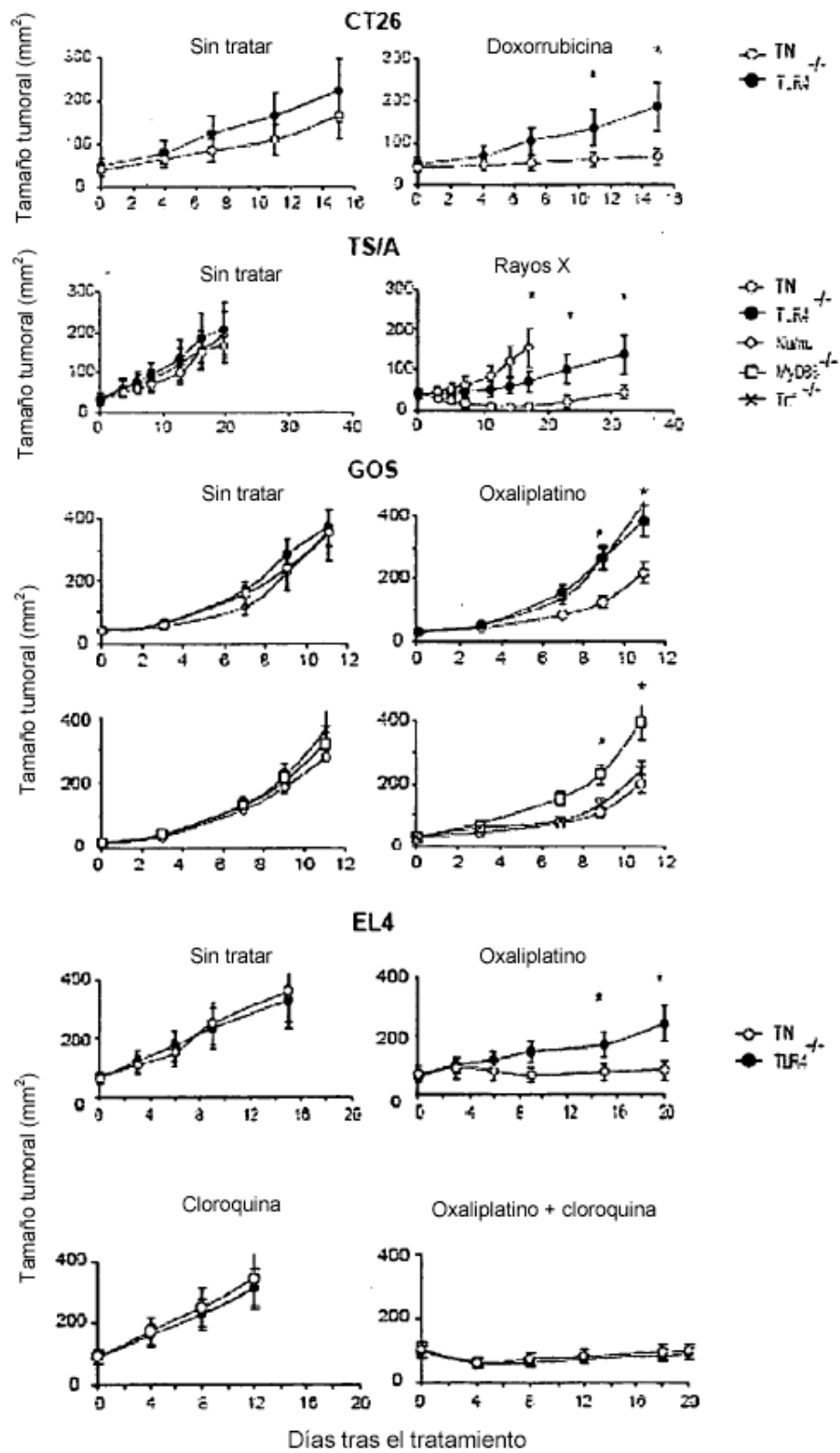


Figura 16a-d

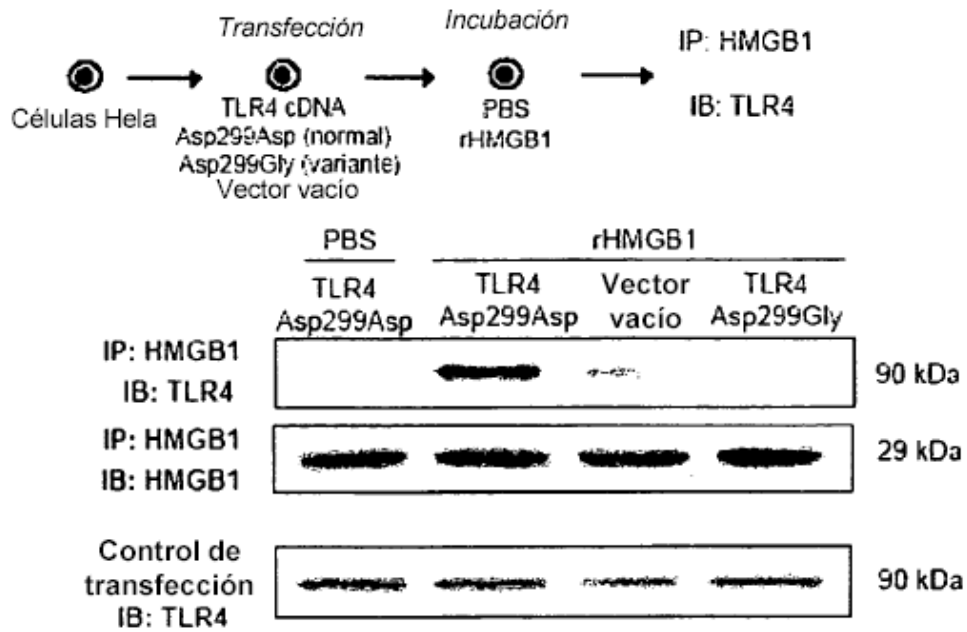


Figura 17a

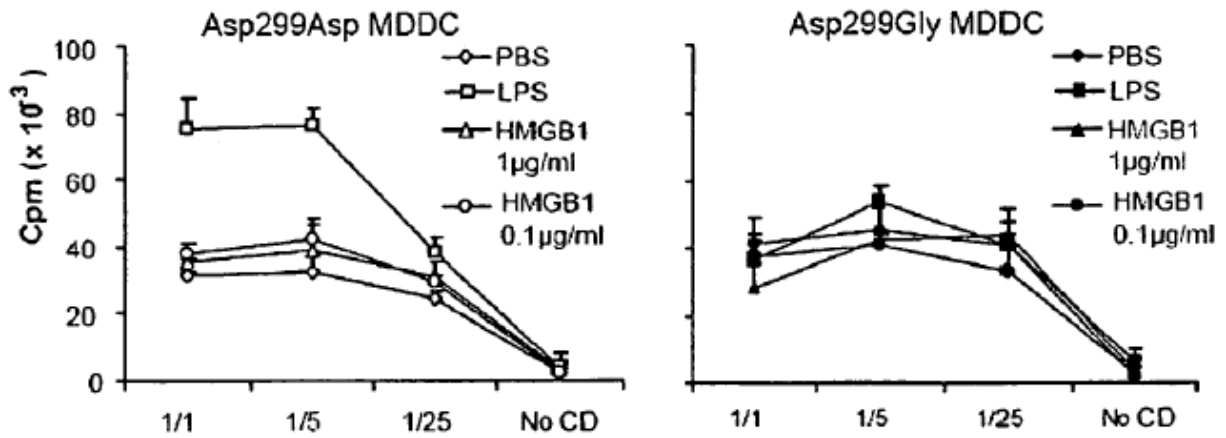


Figura 17b

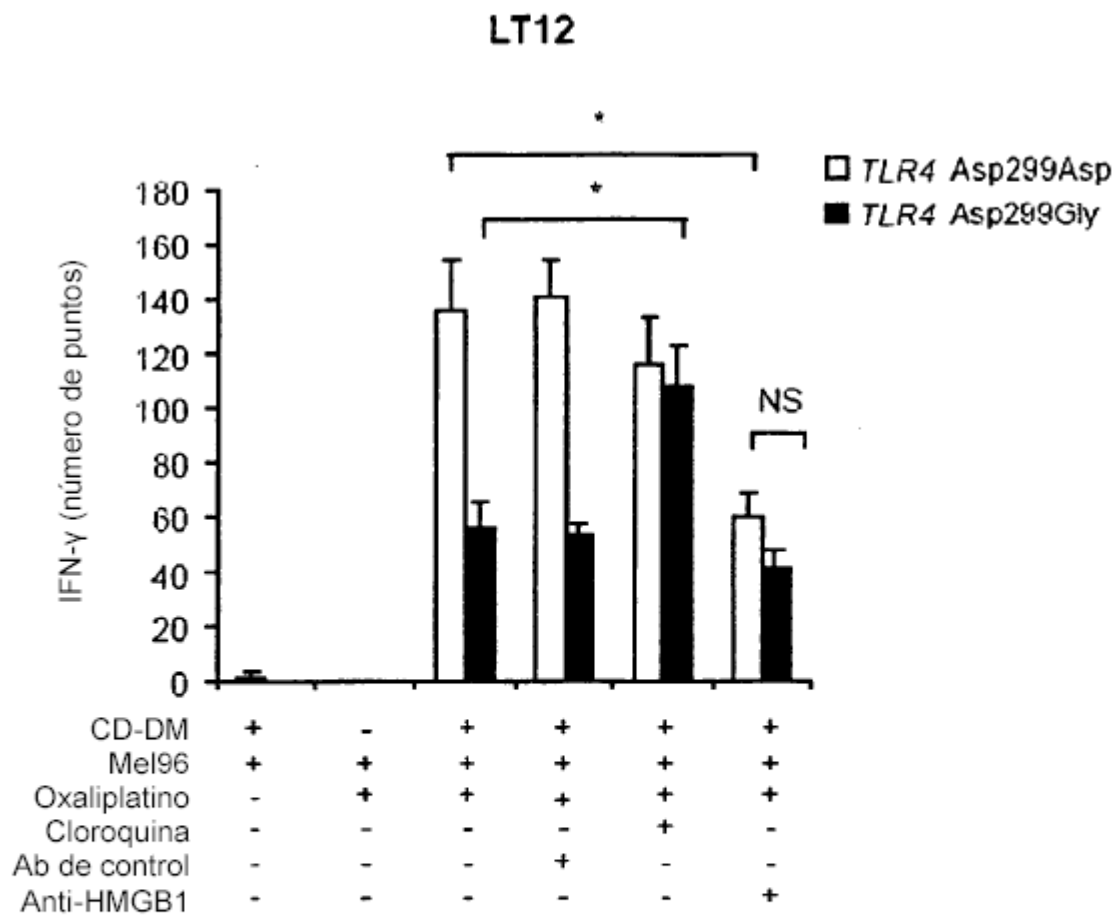


Figura 17c