

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 407 994**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/39** (2006.01)

**C07K 14/475** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2009** **E 09796949 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2013** **EP 2370101**

54 Título: **Utilización de ligando Flt3 para reforzar las respuestas inmunológicas en la inmunización con ARN**

30 Prioridad:

**10.12.2008 DE 102008061522**

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

**17.06.2013**

73 Titular/es:

**BIONTECH AG (50.0%)**

**Hölderlinstrasse 8**

**55131 Mainz, DE y**

**TRON - TRANSLATIONALE ONKOLOGIE AN DER**

**UNIVERSITÄTSMEDIZIN DER JOHANNES**

**GUTENBERG- UNIVERSITÄT MAINZ**

**GEMEINNÜTZIGE GMBH (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SAHIN, UGUR;**

**TÜRECI, ÖZLEM;**

**KREITER, SEBASTIAN y**

**SELMİ, ABDERRAOUF**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**ES 2 407 994 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Utilización de ligando Flt3 para reforzar las respuestas inmunológicas en la inmunización con ARN.

5 La invención se refiere al campo de la vacunación y de la inmunoestimulación mediante la utilización de ARN, en particular ARNm, que codifica uno o más antígenos, que se asocian, por ejemplo, con enfermedades infecciosas o enfermedades malignas tales como el cáncer.

10 El sistema inmunológico puede mostrar inmunidad tanto específica como no específica. En general, la inmunidad específica es producida por los linfocitos B y T, que presentan, sobre su superficie celular, receptores específicos para un antígeno particular. El sistema inmunológico puede reaccionar a diferentes antígenos de dos maneras diferentes: (i) inmunidad humoral, que incluye la estimulación de células B y la producción de anticuerpos o inmunoglobulinas, e (ii) inmunidad mediada por células, que generalmente incluye células T, incluyendo los linfocitos T citotóxicos (LTC).

15 Las reacciones de células T específicas de antígeno son producidas por péptidos antigénicos, que se unen al surco de unión de las glucoproteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), como parte del mecanismo del sistema inmunológico por el que se identifican los antígenos y se induce una reacción contra ellos. Los péptidos antigénicos unidos interactúan con los receptores de las células T y modulan de esta manera una respuesta inmunológica. Los péptidos antigénicos se unen no covalentemente a "bolsillos de unión" particulares, que se forman a partir de residuos polimórficos del surco de unión de la proteína de CMH.

20 Las moléculas del CMH de clase II son glucoproteínas heterodiméricas, que consisten de cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ . Los dominios  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  de estas moléculas se pliegan reuniéndose y formando un surco de unión a péptidos. Los péptidos antigénicos se unen a la molécula del CMH mediante interacción entre aminoácidos de anclaje sobre el péptido y los dominios  $\alpha 1$  y  $\beta 1$ . Las moléculas del CMH de clase I presentan disposiciones de los dominios diferentes de las de las moléculas del CMH de clase II, aunque generalmente presentan una estructura similar con un sitio o surco de unión a péptidos que se encuentra lejos de los dominios membranales.

25 La etapa inicial en la presentación de un antígeno proteína foránea es la unión del antígeno nativo a una célula presentadora de antígeno (CPA). Tras la unión a las CPA, los antígenos penetran en las células, mediante fagocitosis, endocitosis mediada por receptores o pinocitosis. Estos antígenos internalizados se localizan en vesículas intracelulares unidas a la membrana que se denominan endosomas. Tras la fusión de endosomas-lisomas, los antígenos son procesados en péptidos pequeños por proteasas celulares localizadas en los lisomas. Los péptidos se asocian con las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de las moléculas del CMH de clase II dentro de estos lisomas. Estas moléculas del CMH de clase II, que habían sido sintetizadas previamente en el retículo endoplasmático rugoso, son transportadas secuencialmente a los complejos de Golgi y después al compartimiento lisosómico. El complejo de péptido-CMH es presentado sobre la superficie de las CPA para la activación de las células T y B.

30 La inmunidad no específica comprende diversas células y mecanismos, tales como la fagocitosis por macrófagos o granulocitos, y la actividad de células asesinas naturales (NK). La inmunidad no específica se basa en mecanismos que no han avanzado tanto en términos evolutivos y no presenta las propiedades de especificidad y capacidad de memoria, las cuales son características importantes de una respuesta inmunológica específica.

35 Las vacunas recombinantes resultan especialmente importantes en medicina humana y veterinaria como sustancias activas y productos medicinales para la profilaxis y el tratamiento de enfermedades infecciosas y el cáncer. El objetivo de la vacunación con una vacuna recombinante es inducir una respuesta inmunológica específica a un antígeno definido, proporcionando un efecto preventivo o terapéutico contra enfermedades definidas.

40 Tras demostrar que la inyección intramuscular directa de ADN plasmídico conducía a la expresión prolongada de los genes codificados sobre la superficie celular (Wolff, J.-A. *et al.*, *Science* 247:1465-1468, 1990), las vacunas basadas en ADN se presentaron como una nueva y prometedora estrategia de inmunización. Estas observaciones fueron un importante incentivo para el desarrollo de vacunas basadas en ácidos nucleicos. En primer lugar, las vacunas basadas en ADN se probaron contra patógenos infecciosos (Cox G.J. *et al.*, *J. Virol.* 67:5664-5667, 1993; Davis H.L. *et al.*, *Hum. Mol. Genet.* 2:1847-1851, 1993; Ulmer J.B., *Science* 259:1745-1749, 1993; Wang B. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:4156-4160, 1993), aunque pronto también se llevó a cabo investigación sobre la terapia génica contra tumores para inducir una inmunidad antitumoral específica (Conry, R.-M. *et al.*, *Cancer Res.* 54:1164-1168, 1994; Conry R.M. *et al.*, *Gene Ther.* 2:59-65, 1995; Spooner R.A. *et al.*, *Gene Ther.* 2:173-180, 1995; Wang B. *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 6:407-418, 1995). Esta estrategia de inmunización tumoral presenta varias ventajas decisivas. Las vacunas basadas en ácidos nucleicos son fáciles de fabricar y relativamente económicas. Además, pueden amplificarse a partir de un número reducido de células.

45 El ADN es más estable que el ARN pero comporta algunos potenciales riesgos de seguridad, tales como la inducción de anticuerpos anti-ADN (Gilkeson G.S. *et al.*, *J. Clin. Invest.* 95:1398-1402, 1995) y la integración del transgén en el genoma del huésped. Esto puede conducir a la inactivación de genes celulares, a una expresión a

largo plazo incontrolable del transgén, u oncogénesis, y por lo tanto no puede utilizarse de manera general para los antígenos asociados a tumor con potencial oncogénico tales como, por ejemplo, erb-B2 (Bargmann C.I. *et al.*, Nature 319:226-230, 1986) y p53 (Greenblatt M.S. *et al.*, Cancer Res. 54:4855-4878, 1994). Para evitar estos riesgos potenciales, la utilización de ARN ofrece una alternativa atractiva.

Entre las ventajas del ARN como forma de terapia génica reversible se incluyen la expresión temporal y el carácter no transformante. No resulta necesario que el ARN entre en el núcleo para expresarse transgénicamente y además no puede integrarse en el genoma del huésped, de manera que se elimina el riesgo de oncogénesis. Al igual que con el ADN (Condon C. *et al.*, Nat. Med. 2:122-1128, 1996; Tang D.C. *et al.*, Nature 356:152-154, 1992), también puede inducirse *in vivo* mediante inyección de ARN una respuesta inmunológica tanto celular como humoral (Hoerr I. *et al.*, Eur. J. Immunol. 30:1-7, 2000; Ying H. *et al.*, Nat. Med. 5:823-827, 1999).

Para la inmunoterapia con ARN transcrito *in vitro* (ARN-TIV) o ARN amplificado *in vitro*, se siguen dos estrategias diferentes, ambas probadas con éxito en diversos modelos animales y que han encontrado aplicación preliminar en el ser humano.

Se transfectan células dendríticas (CD) con el ARN transcrito *in vitro* mediante lipofección o electroporación y después se aplican (Heiser A., J. Immunol. 164:5508-5514, 2000) o el ARN se inyecta directamente por diversas vías de inmunización (Hoerr I. *et al.*, Eur. J. Immunol. 30:1-7, 2000; Granstein R.D. *et al.*, Journal of Investigative Dermatology 114:632-636, 2000; Conry R.M., Cancer Research 55:1397-1400, 1995). Se ha demostrado que la inmunización con CD transfectadas por ARN induce LTC específicas de antígeno *in vitro* e *in vivo* (Su Z., Cancer Res. 63:2127-2133, 2003; Heiser A. *et al.*, J. Clin. Invest. 109:409-417, 2002). Los datos clínicos preliminares sobre la utilización de células dendríticas transfectadas por ARN como vacuna temporal se remontan a los años 2001 y 2002 y han demostrado que pueden inducirse células T específicas de antígeno en pacientes tumorales (Heiser A. *et al.*, J. Clin. Invest. 109:409-417, 2002; Rains N., Hepato-Gastroenterology 48:347-351, 2001). Para la inyección intradérmica directa de ARN en pacientes, de momento se dispone de los datos preliminares de un estudio clínico de fase I/II con pacientes de melanoma (Weide B., Journal of Immunotherapy 31:180-188, 2008). Este estudio ha demostrado la seguridad y baja toxicidad de la inyección de ARN desnudo. Basándose en los datos preclínicos, que habían demostrado una inmunidad de TH-1 mejorada tras la administración de FEC-GM, se utilizó FEC-GM como adyuvante (Carralot, J.-P. *et al.*, Cell Mol. Life Sci. 61:2418-2424, 2004). Sin embargo, no se observó ningún efecto clínico en los pacientes de melanoma tratados.

Por lo tanto, las vacunas de ARN pueden utilizarse para transfectar transitoriamente las células con ARN que codifican para proteínas antigénicas, la expresión de las cuales estimula una respuesta inmunológica. Basándose en la producción intracelular de estos antígenos y el procesamiento de los mismos en la ruta endógena, las vacunas de ARN inducen inmunidad humoral e inmunidad de células T con la producción de linfocitos T citotóxicos (LTC).

Basándose en las propiedades indicadas anteriormente, el ARN aparentemente resulta especialmente adecuado para aplicaciones clínicas. Sin embargo, la utilización de ARN se encuentra muy restringida, principalmente por la corta vida media del ARN en el citoplasma, ya que la molécula es rápidamente degradada por enzimas, con el resultado de que se produce poca expresión proteica. Por lo tanto, resulta de considerable interés amplificar la inmunogenicidad del ARN como sustancia activa.

Se han utilizado adyuvantes desde hace mucho tiempo para potenciar la acción de las vacunaciones (Aguilar J.C. *et al.*, Vaccine 25:3752-3762, 2007; Chiarella P. *et al.*, Expert Opinion on Biological Therapy 7:1551-1562, 2007). Ya se ha investigado una gran diversidad de agentes, tales como CpG, Poly I:C, FEC-GM, ligando Flt3 o monofosforil-lípido A en estudios preclínicos y clínicos de estadio temprano con respecto a su potencia dentro del ámbito de las estrategias de vacunación tumoral (Speiser D.E. *et al.*, Journal of Clinical Investigation 115:739-746, 2005; Cui Z.R. *et al.*, Cancer Immunology Immunotherapy 55:1267-1279, 2006; Jaffee E.M., Journal of Clinical Oncology 19:145-156, 2001; Shackleton M. *et al.*, Cancer Immunity 4:9-20, 2004; Neidhart J. *et al.*, Vaccine 22:773-780, 2004). Con el fin de incrementar las respuestas inmunológicas tras la vacunación con células dendríticas transfectadas por ARN, en estudios preclínicos se han cotransfectado diversos adyuvantes (IL-12, CD40-L, OX40-L, 4-1BBL) (Dannull J. *et al.*, Blood 105:3206-3213, 2005; Bontkes H.J. *et al.*, Gene Therapy 14:366-375, 2007; Grunebach F., Cancer Gene Therapy 12:749-756, 2005). Alternativamente, también se ha cotransfectado ARN de doble cadena (Poly I:C) con el ARN codificante del antígeno (Michiels A., Gene Therapy 13:1027-1036, 2006).

Dentro del alcance de las investigaciones sobre la utilización de adyuvantes en el contexto de la vacunación con ARN-TIV desnudo, hasta el momento sólo se ha sometido a ensayo la administración s.c. de FEC-GM, que en investigaciones preclínicas condujo a una inducción ligeramente reforzada de la inmunidad de TH-1 (Carralot J.P., Cell Mol. Life Sci. 61:2418-2424, 2004). Los requisitos de los adyuvantes para la utilización dentro del alcance de la aplicación directa de ARN desnudo difieren fundamentalmente de los de los adyuvantes que se utilizan dentro del ámbito de las vacunas basadas en péptidos, en ADN o en células. Lo anterior puede explicarse por el mecanismo responsable de la incorporación del ARN en las células desde el espacio extracelular.

Por lo tanto, existe una necesidad de agentes que intensifiquen el grado de inmunoestimulación producido al administrar vacunas de ARN.

Dicho problema se resuelve según la invención mediante el objeto de las reivindicaciones de patente.

La invención satisface dichas necesidades en el aspecto de que describe compuestos que proporcionan soporte a la incorporación de ARN en el citosol de las células presentadoras de antígenos y/o puede producir una respuesta inmunológica más efectiva con la administración de una vacuna de ARN.

Los inventores han encontrado que la administración de moléculas de ARN que codifican antígenos que pueden utilizarse para la vacunación y la terapia, conjuntamente con la administración de ligando Flt3 (Flt3-L), puede conducir efectivamente a una respuesta inmunológica que es específica para estos antígenos.

Se ha encontrado según la invención que diversos adyuvantes conocidos no sólo conducen a una falta de incremento de la eficiencia de sensibilización de las células T tras la inmunización directa con ARN-TIV desnudo, sino que tienden a reducir la respuesta de células T. Este resultado fue inesperado y sólo puede explicarse por la influencia de los adyuvantes sobre la incorporación del ARN en las células presentadoras de antígeno. Éste es un mecanismo que, de una manera descrita por los inventores por primera vez, es responsable de la incorporación de los ácidos ribonucleicos de cadena larga. La eficiencia de este mecanismo de incorporación resulta inhibida por diversos adyuvantes. Sólo el ligando flt3 fue capaz de mostrar un efecto adyuvante significativo en la inmunización con ARN. Las investigaciones presentadas demuestran en particular que al administrar ligando Flt3 conjuntamente con ARN que codifica para un antígeno, se observaba un fuerte incremento de células T CD8+ específicas de antígeno.

La invención se refiere de manera general a la provisión de vacuna de ARN a las células. En particular, la invención se refiere a la utilización conjunta de vacuna de ARN y ligando Flt3 para la inducción, producción o incremento de una respuesta inmunológica al administrarlos en animales (incluyendo seres humanos).

Según la invención, el ligando Flt3, preferentemente utilizado con una vacuna de ARN, incrementa la respuesta inmunológica de un animal a antígenos específicos que son producidos mediante la utilización de la vacuna de ARN. Son vacunas típicas utilizadas en este enfoque algunas vacunas víricas, tales como las vacunas de influenza, herpes, citomegalovirus, VIH-1, VLTH-1 y VIF, vacunas bacterianas, vacunas del cáncer y vacunas contra parásitos.

Preferentemente, según la invención, se inmuniza un animal mediante la introducción de ligando Flt3 y ARN que codifica un antígeno, en un animal. El ARN es incorporado en las células presentadoras de antígeno del animal (monocitos, macrófagos, células dendríticas u otras células). Se forma un producto de traducción antigénico del ARN y el producto es opcionalmente procesado y presentado por las células en el contexto de complejos mayores de histocompatibilidad, generando de esta manera una respuesta inmunológica contra el antígeno. De esta manera, el ARN produce el antígeno en una traducción.

En formas de realización particulares, el ligando Flt3 se administra antes, simultáneamente y/o después de la administración de una vacuna de ARN. Preferentemente, el ligando Flt3 se administra antes de la administración de una vacuna de ARN.

En un aspecto, la invención se refiere a una preparación inmunogénica, que comprende ARN que codifica por lo menos un antígeno, y un ligando Flt3. El ARN y el ligando Flt3 pueden encontrarse presentes en la preparación inmunogénica según la invención en una composición común, es decir, mezclados entre sí. Además, también se encuentran contempladas formas de realización según la invención en las que el ARN y el ligando Flt3 se encuentran presentes simultáneamente, pero no en la misma composición. Dichas formas de realización se refieren en particular a kits con por lo menos dos recipientes, en los que un recipiente contiene una composición que comprende el ARN y el otro recipiente contiene una composición que comprende el ligando Flt3.

En la preparación inmunogénica según la invención, el ARN preferentemente es ARNm. El ARN preferentemente se obtiene mediante transcripción *in vitro*.

La preparación inmunogénica según la invención puede comprender además por lo menos un factor estabilizador del ARN, tal como un inhibidor de RNasa para estabilizar el ARN.

La preparación inmunogénica según la invención preferentemente es una preparación que se formula para una utilización terapéutica. Según la invención, la expresión "utilización terapéutica" comprende un tratamiento o la prevención de una enfermedad. En este aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una preparación inmunogénica según la invención.

Típicamente, la preparación inmunogénica según la invención o la composición farmacéutica según la invención puede comprender además un solvente, tal como un solvente acuoso o cualquier solvente que permita conservar la integridad del ARN, un adyuvante tal como hidróxido de aluminio, adyuvante de Freund, oligonucleótidos con un motivo CpG o cualquier otro adyuvante conocido por el experto en la materia, y cualquier estabilizador, tal como protamina. Una composición farmacéutica según la invención preferentemente comprende un diluyente farmacéuticamente compatible y/o un excipiente farmacéuticamente compatible.

Además, resulta posible incrementar la inmunogenicidad de las preparaciones según la invención mediante la adición de uno o más adyuvantes adicionales. También resulta posible estabilizar el ARN de la preparación inmunogénica según la invención mediante acomplejamiento con compuestos catiónicos, preferentemente compuestos policatiónicos, tales como, por ejemplo, un péptido o proteína catiónico o policatiónico. Según una forma de realización preferente de la preparación inmunogénica según la invención, el péptido o proteína de acomplejamiento del ARN es una protamina, una poli-L-lisina, una poli-L-arginina o una histona.

Una composición farmacéutica según la invención preferentemente se encuentra en una forma que la convierte en adecuada para la vacunación de un organismo.

Una preparación inmunogénica según la invención o una composición farmacéutica según la invención o por lo menos el componente que comprende ARN de la misma preferentemente se encuentra en forma de una formulación para la administración intranodal.

Las preparaciones y composiciones indicadas anteriormente pueden utilizarse en los procedimientos, en particular en los procedimientos de inmunización, descritos en la presente memoria.

En otro aspecto, la invención se refiere al ligando Flt3 para la utilización en un procedimiento para producir o incrementar una respuesta inmunológica en un individuo, que comprende la administración de ARN que codifica un antígeno, contra el que debe dirigirse la respuesta inmunológica, y la administración de ligando Flt3. La respuesta inmunológica preferentemente presenta una acción protectora y/o terapéutica sobre el individuo y preferentemente comprende una respuesta inmunológica de células T específica de antígeno.

En otro aspecto, la invención se refiere a ligando Flt3 para la utilización en un procedimiento para incrementar la cantidad de células efectoras específicas de antígeno, en particular de células T citotóxicas CD8+ y/o células T adyuvantes CD4+ en un individuo, comprendiendo la administración de ARN que codifica el antígeno y la administración de ligando Flt-3.

Otro aspecto se refiere a la prevención y/o al tratamiento del cáncer utilizando un protocolo de inmunización, que incluye la utilización de ligando Flt3. En este aspecto, la invención se refiere en particular al ligando Flt3 para la utilización en un procedimiento para prevenir y/o tratar el cáncer en un individuo, comprendiendo la administración de ARN que codifica un antígeno tumoral, contra el que debe dirigirse la respuesta inmunológica, y la administración de ligando Flt3.

Otro aspecto se refiere a la prevención y/o tratamiento de infecciones víricas utilizando un protocolo de inmunización que incluye la utilización de ligando Flt3. En este aspecto, la invención se refiere en particular a ligando Flt3 para la utilización en un procedimiento para prevenir y/o tratar una infección vírica en un individuo, comprendiendo la administración de ARN que codifica un antígeno vírico, contra el que debe dirigirse la respuesta inmunológica, y la administración de ligando Flt3.

Otro aspecto se refiere a la prevención y/o al tratamiento de infecciones bacterianas utilizando un protocolo de inmunización que incluye la utilización de ligando Flt3. En este aspecto, la invención se refiere en particular a ligando Flt3 para la utilización en un procedimiento para la prevención y/o el tratamiento de una infección bacteriana en un individuo, comprendiendo la administración de ARN que codifica un antígeno bacteriano, contra el que debe dirigirse la respuesta inmunológica, y la administración de ligando Flt3.

Un protocolo de inmunización según la invención que incluye la utilización de ligando Flt3 también resulta útil para la prevención y/o el tratamiento de una infección por organismos unicelulares. En este aspecto, se utiliza el ligando Flt3 en un procedimiento de prevención y/o tratamiento de una infección por un organismo unicelular en un individuo, comprendiendo la administración de ARN que codifica un antígeno del organismo unicelular, contra el que debe dirigirse la respuesta inmunológica, y la administración de ligando Flt3.

Otro aspecto se refiere a la prevención y/o tratamiento de la alergia en un paciente, que incluye la administración de ligando Flt3 conjuntamente con una inmunoterapia específica de alérgeno. En este aspecto, la invención se refiere en particular al ligando Flt3 para la utilización en un procedimiento para la prevención y/o tratamiento de una alergia en un individuo, comprendiendo la administración de ARN que codifica un alérgeno relevante a la alergia, y la administración de ligando Flt3.

Entre las ventajas del tratamiento y/o la prevención de enfermedades o infecciones utilizando la estrategia descrita en la presente memoria se incluyen, entre otras, que la inmunogenicidad de los antígenos débilmente inmunogénicos, tales como los antígenos recombinantes, puede incrementarse; que la cantidad de antígeno utilizada o del ARN codificante del mismo puede reducirse, que existe una menor necesidad de inmunizaciones de refuerzo y que se incrementa la eficiencia de la inmunización.

La utilización de ligando Flt3 con las vacunas de ARN puede reforzar la inmunogenicidad de determinadas proteínas víricas y antígenos específicos de cáncer, los cuales normalmente producirían una respuesta inmunológica débil. La

técnica de vacunación puede utilizarse, por ejemplo, para la inducción de una respuesta inmunológica a proteínas víricas débilmente inmunogénicas. En el caso de las vacunas de ARN según la invención, el antígeno proteico nunca se expone a anticuerpos séricos, sino que es producido por las células transfectadas mismas tras la traducción del ARNm. Por lo tanto, la anafilaxis no debería ser un problema. Por lo tanto, la invención permite realizar una

5 inmunización repetida de un paciente sin riesgo de reacciones alérgicas.

La estrategia de inmunización según la invención también posibilita el incremento cuantitativo de la frecuencia de linfocitos T específicos de antígeno tras la inmunización basada en ARN. Este incremento de la eficiencia puede utilizarse para la inmunoterapia de pacientes en el sentido de una mejor eficacia clínica o en el sentido de la

10 reducción de la dosis de vacuna o de la frecuencia de aplicación con la misma eficacia.

En ratones transgénicos para ALH, mediante la inmunización según la invención con una vacuna de ARN que codifique antígenos asociados a tumor humano, pueden aislarse clones o receptores de células T que reconocen epítomos procesados naturalmente en el contexto de una molécula de ALH humana. Mediante la estrategia de

15 inmunización según la invención, pueden generarse células T específicas de antígeno con una probabilidad más alta. Además, la estrategia de inmunización según la invención también ofrece la posibilidad de amplificar fuertemente las células T específicas de antígeno que se encuentran presentes a una frecuencia de precursor baja. Este incremento de eficiencia permite un aislamiento más completo de las células T específicas de antígeno presentes en el repertorio no expuesto. Además, el incremento de eficiencia con el procedimiento de inmunización se asocia a una reducción del coste.

También se encuentra contemplado extraer células de un animal y transfectar las células *in vitro* con ligando Flt3/ARN. El ARN se incorpora en las células y se forma un producto de traducción antigénico del polinucleótido. Tras la transfección, las células que expresan el antígeno se introducen en el animal, preferentemente mediante

25 inyección, en el que el sistema inmunológico ahora puede reaccionar contra el antígeno, que ahora es endógeno, y se produce una respuesta inmunológica contra el inmunógeno. En esta forma de realización, las células que deben transfectarse preferentemente son células linfoides, en particular células presentadoras de antígeno, que han sido extraídas del animal.

En el caso de que las células de un animal deban transfectarse *in vitro*, la fuente de las células puede ser células sanguíneas periféricas, las cuales pueden aislarse rápidamente a partir de sangre completa, con el fin de proporcionar una fuente de células que contenga moléculas de MHC tanto de clase I como de clase II. Estas células pueden fraccionarse adicionalmente en células B, células T auxiliares, células T citotóxicas o macrófagos/monocitos. Las células de médula ósea pueden proporcionar una fuente de células linfoides menos diferenciadas.

30 Las células T, en particular los linfocitos CD4+ y CD8+, pueden estimularse o activarse *in vitro* o en un organismo en un procedimiento que comprende la provisión, para las células T o la administración en el organismo, de ARN que codifica por lo menos un antígeno, para el que las células T deben ser específicas, y ligando Flt3. Dicha estimulación o activación preferentemente se manifiesta en la expansión, reactividad citotóxica y/o liberación de citoquinas de las células T.

Los enfoques descritos anteriormente resultan adecuados en particular para el tratamiento o la profilaxis de enfermedades infecciosas, causadas por ejemplo por bacterias o virus. En determinadas formas de realización, el antígeno utilizado según la invención se deriva de un patógeno infeccioso, tal como hepatitis A, B, C, VIH, micobacterias, patógenos del paludismo, patógenos del SARS, virus herpes, virus influenza, poliovirus o de patógenos bacterianos tales como clamidias y micobacterias. Una aplicación especialmente útil de la presente invención es la inmunoterapia o vacunación frente al cáncer, en la que la activación particular de células T reactivas con antígenos tumorales se intensifica, de manera que se refuerzan las perspectivas de la inmunoterapia o vacunación de células T contra las células tumorales.

50 En formas de realización específicas, el antígeno utilizado según la invención se selecciona de entre el grupo que comprende los antígenos siguientes: p53 ART-4, BAGE, ss-catenina/m, Bcr-abL CAMEL, CAP-1, CASP-8, CD27/m, CDK4/m, CEA, CLAUDINA-6, CLAUDINA-12, c-MYC, CT, Cyp-B, DAM, ELF2M, ETV6-AML1, G250, GAGE, GnT-V, Gap100, HAGE, HER-2/neu, HPV-E7, HPV-E6, HAST-2, hTERT (o hTRT), LAGE, LDLR/FUT, MAGE-A, preferentemente MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11 o MAGE-A12, MAGE-B, MAGE-C, MART-1/melan-A, MC1R, miosina/m, MUC1, MUM-1, MUM-2, MUM-3, NA88-A, NF1, NY-ESO-1, NY-BR-1, p190 menor bcr-abL Pml/RARa, PRAME, proteinasa-3, PSA, PSM, RAGE, RU1 o RU2, SAGE, SART-1 o SART-3, SCGB3A2, SCP1, SCP2, SCP3, SSX, SURVININA, TEL/AML1, TPI7m, TRP-1, TRP-2, TRP-2/INT2, TPTE y WT, preferentemente WT-1.

### 60 Descripción detallada de la invención

Según la invención, pueden utilizarse procedimientos estándares para la producción de ácidos nucleicos recombinantes, el cultivo de células y la introducción de ácidos nucleicos en células. Las reacciones enzimáticas tienen lugar según las instrucciones del fabricante o de una manera conocida *per se*.

- 5 La expresión "ligando Flt3" o "Flt3-L" se refiere a "ligando de tirosina quinasa 3 de tipo Fms". Flt3 es un receptor tirosina quinasa (RTK), que es expresado por células precursoras hematopoyéticas inmaduras. El ligando de Flt3 (Flt3-L) es una proteína transmembranal o una proteína soluble y es expresada por un gran número de células, incluyendo las células hematopoyéticas y las células estromales de la médula ósea. En combinación con otros factores de crecimiento, el ligando estimula la proliferación y desarrollo de diversos tipos celulares, incluyendo células madre, células mieloides y células precursoras linfoides, células dendríticas y células NK. La activación del receptor conduce a una fosforilación de las tirosinas de diversas proteínas adaptadoras clave, que es conocido que participan en diversas rutas de transducción de señales, las cuales controlan la proliferación, supervivencia y otros procesos en las células hematopoyéticas.
- 10 La expresión "ligando de Flt3" comprende cualesquiera moléculas, en particular péptidos y proteínas, que se unen a receptores de Flt3 y que preferentemente presentan actividad biológica de transducción de una señal estimuladora a la célula mediante el receptor de Flt3 unido.
- 15 La expresión "ligando de Flt3" comprende todas las variantes, en particular variantes de procesamiento y variantes modificadas post-traduccionalmente, conformaciones, isoformas y homólogos específicos del ligando de Flt3, que son naturalmente expresadas por células o que son expresadas por células que han sido transfectadas con un ácido nucleico que codifica para el ligando de Flt3. Además, la expresión "ligando de Flt3" comprende todas las formas de ligando de Flt3 que se han producido y que pueden producirse mediante procedimientos recombinantes.
- 20 La expresión "ácido nucleico que codifica el ligando de Flt3" preferentemente se refiere a un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que se selecciona de entre el grupo que consiste de: (i) SEC ID nº 3 y nº 4 del listado de secuencias, (ii) una secuencia derivada de la secuencia de ácidos nucleicos según (i), e (iii) una parte de la secuencia de ácidos nucleicos según (i) o (ii).
- 25 En una forma de realización preferente, el ligando de Flt3 comprende una secuencia de aminoácidos que se encuentra codificada por un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que se selecciona de entre el grupo que consiste de: (i) SEC ID nº 3 y nº 4 del listado de secuencias, (ii) una secuencia derivada de la secuencia de ácidos nucleicos según (i), e (iii) una parte de la secuencia de ácidos nucleicos según (i) o (ii). En otra realización preferente, el ligando de Flt3 comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona de entre el grupo que consiste de SEC ID nº 1 y nº 2 del listado de secuencias, una secuencia derivada de las mismas, o una parte de las mismas.
- 30 Las formas de ligando de Flt3 que pueden utilizarse según la invención comprenden, aunque sin limitarse a ellas, ligando de Flt3 de ratón y de ser humano, tal como se muestran en SEC ID nº 1 y nº 2 del listado de secuencias y polipéptidos con secuencias derivadas de las mismas.
- 35 Con referencia a las SEC ID nº 1 y nº 2, la expresión "secuencia derivada de las mismas" preferentemente se refiere a secuencias acortadas respecto a SEC ID nº 1 y nº 2 y que principalmente comprenden la parte extracelular de las proteínas. Dichas secuencias preferentemente no comprenden la parte transmembranal y la parte intracelular. La expresión "ligando de Flt3" comprende polipéptidos tales como los indicados en US-PS nº 5.554.512 y en US-PS nº 6.291.661, que se incluyen como referencia en la presente memoria.
- 40 Son formas especialmente preferentes del ligando de Flt3, las formas solubles biológicamente activas y en particular aquellas formas que comprenden el dominio extracelular o uno o más fragmentos del dominio extracelular. Dichas formas preferentemente no comprenden la parte transmembranal e intracelular, es decir, la parte citoplasmática del ligando de Flt3. Las formas solubles del ligando de Flt3 son polipéptidos que pueden secretarse de las células en las que se expresan. En dichas formas, el dominio intracelular y el dominio transmembranal del polipéptido o una parte del mismo han sido delecionados, de manera que el polipéptido es secretado por completo de la célula en la que se expresa. El dominio intracelular y el dominio transmembranal de los polipéptidos pueden determinarse según la invención de una manera que es conocida *per se* mediante procedimientos conocidos para la determinación de dichos dominios basándose en la información de secuencia. Con referencia a SEC ID nº 1, el dominio intracelular puede definirse como los aminoácidos 206 a 235 y el dominio transmembranal como los aminoácidos 185 a 205 o 183 a 205.
- 45 El ligando de Flt3 humano puede comprender una secuencia de aminoácidos que se selecciona de entre el grupo que consiste de los aminoácidos 1-X, 27-X o 28-X de SEC ID nº 1 o una secuencia derivada de la misma, en la que X representa un aminoácido entre 160 y 235, preferentemente 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184 o 185.
- 50 El ligando de Flt3 murino puede comprender una secuencia de aminoácidos que se selecciona de entre el grupo que consiste de los aminoácidos 1-Y, 27-Y o 28-Y de SEC ID nº 2 o una secuencia derivada de la misma, en la que Y representa un aminoácido entre 163 y 232.
- 55 Las formas de realización de ligando de Flt3 humano soluble comprenden la secuencia de aminoácidos de residuos 1 a 160 de SEC ID nº 1 (ambos inclusive), 27 a 160 de SEC ID nº 1 (ambos inclusive), 28 a 160 de SEC ID nº 1

(ambos inclusive), 1 a 179 de SEC ID nº 1 (ambos inclusive), 27 a 179 de SEC ID nº 1 (ambos inclusive), 28 a 179 de SEC ID nº 1 (ambos inclusive), 1 a 182 de SEC ID nº 1 (ambos inclusive), 27 a 182 de SEC ID nº 1 (ambos inclusive), 28 a 182 de SEC ID nº 1 (ambos inclusive), 1 a 185 de SEC ID nº 1 (ambos inclusive), 27 a 185 de SEC ID nº 1 (ambos inclusive), 28 a 185 de SEC ID nº 1 (ambos inclusive), 1 a 235 de SEC ID nº 1 (ambos inclusive), 27 a 235 de SEC ID nº 1 (ambos inclusive) y 28 a 235 de SEC ID nº 1 (ambos inclusive).

Las formas de realización de ligando de Flt3 murino soluble comprenden la secuencia de aminoácidos de residuos 1 a 163 de SEC ID nº 2 (ambos inclusive), la secuencia de aminoácidos de residuos 28 a 163 de SEC ID nº 2 (ambos inclusive), la secuencia de aminoácidos de residuos 1 a 188 de SEC ID nº 2 (ambos inclusive), la secuencia de aminoácidos de residuos 28 a 188 de SEC ID nº 2 (ambos inclusive), la secuencia de aminoácidos de residuos 1 a 232 de SEC ID nº 2 (ambos inclusive) y la secuencia de aminoácidos de residuos 28 a 232 de SEC ID nº 2 (ambos inclusive).

La expresión "ligando de Flt3" comprende además, según la invención, moléculas que comprenden las secuencias anteriormente indicadas en combinación, preferentemente en forma de una fusión covalente, con uno o más péptidos o proteínas heterólogos, opcionalmente separados por un conector. A este respecto, un péptido o proteína es heterólogo respecto a una secuencia con la que se combina en el caso de que el péptido o proteína no se encuentre presente naturalmente en combinación con la secuencia. Por ejemplo, las secuencias que se derivan de un ligando de Flt3 natural y las secuencias que se derivan de anticuerpos son secuencias heterólogas. Estos péptidos o proteínas heterólogos pueden, por ejemplo, controlar la secreción de las secuencias anteriormente indicadas a partir de una célula huésped, producir la compartimentalización de las secuencias anteriormente indicadas en orgánulos particulares de una célula, incrementar la estabilidad de las secuencias anteriormente indicadas o posibilitar o facilitar la purificación. En una forma de realización, el péptido o proteína heterólogo se deriva de un anticuerpo, preferentemente la cadena pesada de un anticuerpo, en particular un anticuerpo de clase IgG1, IgG2, preferentemente IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4, IgM, IgA, preferentemente IgA1, IgA2, IgA secretorio, IgD o IgE. Preferentemente, el péptido o proteína heterólogo se deriva de la región constante de un anticuerpo y preferentemente comprende esta región o una parte de la misma. Preferentemente, el péptido o proteína heterólogo comprende la secuencia mostrada en SEC ID nº 5 o una secuencia derivada de la misma. En una forma de realización, el ligando de Flt3 según la invención comprende la secuencia mostrada en SEC ID nº 6 o una secuencia derivada de la misma.

Además, la expresión "ligando de Flt3" según la invención comprende todos los polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos que se deriva de las secuencias indicadas específicamente en la presente memoria.

La expresión "respuesta inmunológica" se utiliza en la presente memoria en su sentido convencional y comprende la inmunidad humoral y la inmunidad celular. Una respuesta inmunológica se manifiesta en la aparición de una o más reacciones, que se seleccionan de entre el desarrollo de anticuerpos contra un antígeno y la expansión de linfocitos T específicos de antígeno, preferentemente linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+, más preferentemente linfocitos T CD8+, los cuales pueden detectarse en diversos ensayos *in vitro* de proliferación y de producción de citoquinas.

El término "inmunoterapia" se refiere al tratamiento basado en la activación de una respuesta inmunológica específica.

Términos tales como "protege", "profiláctico" o "protector" en la presente memoria se refieren a prevenir y/o tratar la aparición y/o incremento de un tumor o patógeno en un organismo. La administración profiláctica de una vacuna puede proteger al receptor frente al desarrollo del crecimiento tumoral o frente a la infección por un patógeno. La administración terapéutica de una vacuna o la inmunoterapia pueden proteger al receptor, por ejemplo frente a la expansión o metástasis de tumores existentes o producir la reducción de la masa tumoral de los tumores existentes.

Las células presentadoras de antígeno o CPA tal como se utiliza en la presente memoria son células que presentan fragmentos peptídicos de antígenos proteicos asociados a moléculas del MHC sobre su superficie celular. Algunas CPA puede activar células T específicas de antígeno. Los ejemplos de CPA comprenden, aunque sin limitarse a ellos, células dendríticas, macrófagos, monocitos, células B y similares.

La expresión "complejo de CMH/péptido" se refiere a un complejo no covalente del dominio de unión de una molécula del CMH de clase I o del CMH de clase II y un péptido de unión al CMH de clase I o al CMH de clase II.

La expresión "péptido de unión al CMH" o "péptido de unión" se refiere a un péptido que se une a una molécula del CMH de clase I y/o de CMH de clase II. En el caso de los complejos de CMH de clase I/péptido, los péptidos de unión típicamente presentan una longitud de 8 a 10 aminoácidos, aunque pueden resultar efectivos péptidos más largos o más cortos. En el caso de los complejos de CMH de clase II/péptido, los péptidos de unión típicamente presentan una longitud de 10 a 25 aminoácidos y en particular de 13 a 18 aminoácidos, aunque pueden resultar efectivos péptidos más largos y más cortos.

La expresión "complejo mayor de histocompatibilidad" y la abreviatura "CMH" se refieren a un complejo de genes que se encuentra presente en todos los vertebrados. Las proteínas o moléculas del CMH funcionan, durante la



señalización entre linfocitos y células presentadoras de antígeno en las respuestas inmunológicas normales, mediante la unión de péptidos y la presentación de los mismos para el posible reconocimiento por parte de receptores de células T (RCT). Las moléculas del CMH se unen a péptidos en un compartimiento intracelular de procesamiento y presentan estos péptidos sobre la superficie de las células presentadoras de antígeno a las células T. La región del CMH humana, también denominada ALH, se encuentra situada en el cromosoma 6 y comprende la región de clase I y la región de clase II.

La expresión "CMH de clase I" o "clase I" se refiere a las proteínas o genes del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I. Dentro de la región del CMH de clase I, en el ser humano existen las subregiones HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F, CD1a, CD1b y CD1c.

Las cadenas  $\alpha$  de clase I son glucoproteínas con un peso molecular de aproximadamente 44 kDa. La cadena polipeptídica es ligeramente más larga que 350 residuos aminoácidos. Puede dividirse en tres regiones funcionales: una región externa, una región transmembranal y una región citoplasmática. La región externa presenta una longitud de 283 residuos aminoácidos y se divide en tres dominios:  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ . Los dominios y regiones habitualmente están codificados por exones separados del gen de clase I. La región transmembranal atraviesa la bicapa lipídica de la membrana plasmática. Consiste de 23 residuos aminoácidos mayoritariamente hidrofóbicos que se encuentran dispuestos en una hélice  $\alpha$ . La región citoplasmática, es decir, la parte encarada hacia el citoplasma, que es contigua a la región transmembranal, típicamente presenta una longitud de 32 residuos aminoácidos y es capaz de interactuar con los elementos del citoesqueleto. La cadena  $\alpha$  interactúa con la microglobulina  $\beta 2$  y forma de esta manera dímeros  $\alpha$ - $\beta 2$  sobre la superficie celular.

La expresión "CMH de clase II" o "clase II" se refiere a las proteínas o genes del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II. Dentro de la región del CMH de clase II en el ser humano se encuentran las subregiones DP, DQ y DR para los genes de la cadena  $\alpha$  y de la cadena  $\beta$  de clase II (es decir, DP $\alpha$ , DP $\beta$ , DQ $\alpha$ , DQ $\beta$ , DR $\alpha$  y DR $\beta$ ).

Las moléculas de clase II son heterodímeros, que consisten de una cadena  $\alpha$  y una cadena  $\beta$ . Ambas cadenas son glucoproteínas con un peso molecular de entre 31 y 34 kDa ( $\alpha$ ) o de entre 26 y 29 kDa ( $\beta$ ). La longitud total del a cadena  $\alpha$  varía entre 229 y 233 residuos aminoácidos y la de las cadenas  $\beta$  es de entre 225 y 238 residuos. Las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  consisten de una región externa, un péptido de unión, una región transmembranal y una cola citoplasmática. La región externa consiste de dos dominios:  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  o  $\beta 1$  y  $\beta 2$ . El péptido de unión en las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  presenta una longitud de 13 y 9 residuos, respectivamente. Une el segundo dominio a la región transmembranal, que consiste tanto en las cadenas  $\alpha$  como en las cadenas  $\beta$  de 23 residuos aminoácidos. La longitud de la región citoplasmática, es decir, la parte encarada hacia el citoplasma, que es contigua a la región transmembranal, varía entre 3 y 16 residuos en las cadenas  $\alpha$  y entre 8 y 20 residuos en las cadenas  $\beta$ .

La expresión "dominio de unión al CMH" se refiere al "dominio de unión al CMH de clase I" y al "dominio de unión al CMH de clase II".

La expresión "dominio de unión al CMH de clase I" se refiere a la región de una molécula del CMH de clase I o a una cadena del CMH de clase I que resulta necesaria para la unión a un péptido antigénico. Un dominio de unión del CMH de clase I está formado principalmente por los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  de la cadena  $\alpha$  del CMH de clase I. Aunque el dominio  $\alpha 3$  de la cadena  $\alpha$  y la microglobulina  $\beta 2$  no representan partes esenciales del dominio de unión, presumiblemente resultan importantes para la estabilización de toda la estructura de la molécula del MHC de clase I y, por lo tanto, la expresión "dominio de unión del CMH de clase I" preferentemente incluye estas regiones. Un dominio de unión del CMH de clase I también puede definirse esencialmente como el dominio extracelular de una molécula del CMH de clase I, que lo distingue de las regiones transmembranal y citoplasmática.

La expresión "dominio de unión del CMH de clase II" se refiere a la región de una molécula del CMH de clase II o a una cadena del CMH de clase II que resulta necesaria para la unión a un péptido antigénico. Un dominio de unión del CMH de clase II está formado principalmente por los dominios  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del CMH de clase II. Los dominios  $\alpha 2$  y  $\beta 2$  de estas proteínas presumiblemente también resultan importantes, sin embargo, para la estabilización de la estructura completa del surco de unión del CMH y, por lo tanto, la expresión "dominio de unión del CMH de clase II" según la invención preferentemente incluye estas regiones. Un dominio de unión del CMH de clase II también puede definirse esencialmente como el dominio extracelular de una molécula del CMH de clase II, que lo distingue del dominio transmembranal y del dominio citoplasmático.

Según la invención, el término "antígeno" cubre cualquier molécula que comprenda por lo menos un epítipo. Según la invención, un antígeno es preferentemente una molécula que, opcionalmente después del procesamiento, puede inducir una respuesta inmunológica, que preferentemente es específica para el antígeno. Cualquier antígeno adecuado que sea un candidato para una respuesta inmunológica, en la que ésta puede ser una respuesta inmunológica tanto humoral como celular, puede utilizarse según la invención. En las formas de realización según la invención, el antígeno o una forma procesada del mismo preferentemente será presentado por una célula en relación a las moléculas del CMH, de manera que se induzca una respuesta inmunológica contra el antígeno o la forma procesada del mismo.

El término "antígeno" comprende en particular proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, en particular, ARN, y nucleótidos. Un antígeno es preferentemente un producto que se ha derivado de alérgenos, virus, bacterias, hongos, parásitos u otros agentes infecciosos o patógenos, o antígenos tumorales. Un antígeno puede según la invención corresponder a un producto natural, por ejemplo una proteína vírica, o puede derivarse de la misma, en particular mediante la modificación del orden y/o longitud de la secuencia, añadiendo o insertando secuencias adicionales, etc., en particular con el fin de incrementar la inmunogenicidad. Sin embargo, el antígeno utilizado preferentemente producirá una respuesta inmunológica, que también se dirige contra el producto natural a partir del cual se ha derivado. Por lo tanto, el término "antígeno" también comprende, según la invención, partes inmunogénicas o epítopos de proteínas completas o péptidos completos, que pueden encontrarse en forma de proteínas, péptidos, proteínas o péptidos multiméricos, péptidos sintéticos y similares. El término "inmunogenicidad" se refiere a la efectividad relativa de un antígeno para producir una respuesta inmunológica.

El término "antígeno" comprende además antígenos derivatizados, es decir, sustancias secundarias que sólo se convierten en antigénicas (y sensibilizantes) mediante transformación (por ejemplo transformación intermedia en la molécula, o completándose con una proteína somática).

En una forma de realización preferida, el antígeno es un antígeno tumoral, es decir, un constituyente de células de cáncer, que se deriva del citoplasma, la superficie celular y el núcleo celular, en particular aquellos antígenos que se forman, preferentemente que se multiplican, intracelularmente o como antígenos de superficie sobre las células tumorales. Son ejemplos el antígeno carcinoembrionario, la  $\alpha 1$ -fetoproteína, la isoferritina y la sulfoglucoproteína fetal, la  $\alpha 2$ -H-ferroproteína y la  $\gamma$ -fetoproteína y diversos antígenos tumorales víricos. En otra forma de realización, el antígeno es un antígeno vírico, tal como ribonucleoproteínas o proteínas de cubierta víricas. En particular, el antígeno o péptidos del mismo deben ser presentados por moléculas del CMH y, de esta manera, deben ser capaces de modular, en particular, activar células del sistema inmunológico, preferentemente linfocitos  $CD4^+$  y  $CD8^+$ , en particular mediante la modulación de la actividad de un receptor de células T y, por lo tanto, preferentemente inducir la multiplicación de las células T.

Según la invención, un antígeno tumoral preferentemente comprende cualquier antígeno que sea característico, con respecto al tipo y/o cantidad, de un tumor o cáncer, o de células tumorales o de cáncer.

El ligando de Flt3 también puede utilizarse en el tratamiento de las alergias. Los protocolos de inmunización que utilizan ligando de Flt3, descritos en la presente memoria, pueden aplicarse en la inmunoterapia específica de alérgenos de las alergias. La inmunoterapia específica de alérgenos se define como la administración de preferentemente dosis crecientes de una vacuna de alérgenos en un organismo que presenta una o más alergias, con el fin de alcanzar un estado en el que se alivian los síntomas asociados a una exposición posterior al alérgeno causativo. La eficacia de una inmunoterapia específica de alérgeno utilizando el ligando de Flt3 pueden evaluarse mediante procedimientos estándares conocidos, tales como la medición de anticuerpos IgG e IgE específicos de alérgeno del paciente.

Los inmunógenos son antígenos que inducen una respuesta inmunológica en un organismo.

Las composiciones que deben utilizarse según la invención no se encuentran limitadas con respecto al tipo y número de antígenos que se encuentran codificados por las moléculas de ARN.

Según la invención, puede administrarse una especie individual de ARN con una secuencia definida, aunque también resulta posible administrar varios ARN diferentes con diferentes secuencias. En una forma de realización, según la invención se administra un grupo de moléculas de ARN. En el caso de que el ARN comprenda, según la invención, moléculas de ARN con diferentes secuencias, las secuencias codificantes de estos ARN pueden derivarse de antígenos idénticos o diferentes.

El término "patógeno" se refiere a microorganismos patogénicos y comprende virus, bacterias, organismos unicelulares y parásitos. El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el citomegalovirus (CMV), el virus herpes (VHS), el virus de la hepatitis A (VHA), VHB, VHC, el papilomavirus y el virus T linfotrópico humano (VLTH) son ejemplos de virus patogénicos. Los organismos unicelulares comprenden plasmodios, tripanosomas, amebas y similares.

El término "vacuna" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una composición que comprende uno o más antígenos o el ácido o ácidos nucleicos codificantes de los mismos. Además, una vacuna puede comprender uno o más adyuvantes, diluyentes, excipientes y similares, y se administra en un organismo mediante cualquier vía adecuada, con el fin de producir una respuesta inmunológica protectora y/o terapéutica a un antígeno. Por lo tanto, una vacuna puede servir para prevenir una enfermedad y puede administrarse, por ejemplo, previamente a la infección o puede administrarse después de la aparición de una enfermedad. Una vacuna puede comprender antígenos naturales, derivatizados, sintéticos, recombinantes o no recombinantes o el ácido o ácidos nucleicos codificantes de los mismos. Según la invención, una vacuna contiene ARN que presenta secuencias polinucleótidas que codifican para uno o más antígenos. El ARN puede ser ARN desnudo o puede incorporarse en liposomas o en otras partículas para la transferencia génica. Otros agentes que pueden incorporarse en la vacuna con el fin de

facilitar la administración comprenden polipéptidos, péptidos, conjugados de polisacáridos, lípidos y similares.

El experto en la materia conocerá que uno de los principios de la inmunobiología y de la vacunación se basa en el hecho de que se produce una reacción inmunoprotectora a una enfermedad mediante la inmunización de un organismo con un antígeno, que es inmunológicamente relevante con respecto a la enfermedad que debe tratarse. Por lo tanto, se entenderá que en los procedimientos según la invención para el tratamiento del cáncer deberían incluirse enfermedades infecciosas y similares que comprenden antígenos que son inmunológicamente relevantes para la enfermedad que debe prevenirse o tratarse. Por ejemplo, las vacunas del cáncer comprenderían uno o más antígenos del cáncer.

En el caso de una vacuna de ARN, un ARN que codifica operativamente para un péptido o proteína inmunogénico y que preferentemente se presenta en un excipiente farmacéuticamente compatible, se administra en las células de un animal, el cual, por ejemplo, presenta cáncer o una infección patogénica, en el que el ARN se incorpora en las células y se produce una cantidad de un péptido o proteína inmunogénico que, opcionalmente después del procesamiento, es capaz de producir una respuesta inmunológica protectora o terapéuticamente efectiva.

El material de ARN suministrado a las células puede contener la secuencia completa o sólo una parte de un péptido o proteína inmunogénico. También puede contener secuencias que codifican para otras secuencias polipeptídicas. Además, puede contener elementos que participan en la regulación de la expresión génica (por ejemplo promotores, intensificadores, secuencias de UTR 5' o 3', y similares). El ARN también puede comprender una secuencia inmunoestimuladora, la cual intensifica la inmunogenicidad de un producto génico particular y/o puede comprender secuencias que incrementan la incorporación del polinucleótido.

Debe indicarse en este aspecto que, para que resulte eficaz, una vacuna según la invención puede producir únicamente inmunidad en una parte de la población, ya que algunos individuos podrían no presentar ninguna capacidad para producir una respuesta inmunológica robusta o protectora o en algunos casos para producir ninguna respuesta inmunológica en absoluto frente a la vacuna. Esta incapacidad podría estar causada en el fondo genético del individuo o en un estado de inmunodeficiencia (adquirida o congénita) o en la inmunosupresión (por ejemplo mediante el tratamiento con inmunosupresores, para prevenir el rechazo de órganos o para suprimir un estado autoinmunitario).

Las células efectoras tal como se describen en la presente memoria son células que llevan a cabo funciones efectoras durante una respuesta inmunológica. Estas células secretan, por ejemplo, citoquinas y/o quimioquinas, matan microbios, reconocen células infectadas o degeneradas y opcionalmente las eliminan y secretan anticuerpos. Entre los ejemplos se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, células T (células T citotóxicas, células T auxiliar, células T infiltrantes de tumores), células B, células NK, neutrófilos, macrófagos y células dendríticas.

Las células dendríticas comprenden una población celular heterogénea con morfología particular y una amplia distribución en los tejidos. El sistema de las células dendríticas y su papel en el sistema inmunológico han sido comentados por Steinman R.M., Annu. Rev. Immunol. 9:271-296, 1991, incluyendo dicha exposición como referencia. Las células dendríticas presentan una capacidad de sensibilización de las células T restringidas al CMH y son muy efectivas en la presentación de los antígenos a las células T. La expresión "células dendríticas" o "CD" se refiere a los miembros de una población diversa de tipos celulares morfológicamente similares, que se observan en tejidos linfoides o no linfoides. Las células dendríticas son una clase de células presentadoras de antígenos "profesionales" y presentan la capacidad de sensibilizar las células T restringidas al CMH. Dependiendo de la línea particular y el nivel de madurez particular, las células dendríticas pueden ser reconocidas por la función o el fenotipo, en particular por el fenotipo de la superficie celular. Estas células se caracterizan por una morfología particular, una capacidad fagocítica/endocítica, un elevado grado de expresión en superficie del CMH de clase II y la capacidad de presentar antígenos contra las células T, en particular células T no expuestas. Funcionalmente, las células dendríticas pueden identificarse mediante un ensayo en el que se determina la capacidad de presentación de antígenos. Dicho ensayo puede comprender una evaluación de la capacidad de estimular las células T mediante la presentación de un antígeno de ensayo, y opcionalmente la determinación de la proliferación de las células T, la liberación de IL-2 y similares.

Según la invención, las células dendríticas linfoides que han sido expuestas *in vivo* o *in vitro* a ARN pueden utilizarse como células presentadoras de antígenos para la inducción de una respuesta inmunológica a los antígenos que se encuentran codificados por el ARN.

Los inmunoadyuvantes o adyuvantes son compuestos que, administrados en un individuo, refuerzan la respuesta inmunológica frente a un antígeno respecto a un individuo de ensayo en el que únicamente se administra el antígeno, o intensifican determinadas actividades de las células del sistema inmunológico.

Según la invención, el ARN codificante para uno o más antígenos puede administrarse con cualquier adyuvante. El término "adyuvante" se refiere a cualquier sustancia que sea diferente del antígeno y del ligando de Flt3, e incluida en una vacuna, acelera, prolonga o intensifica la respuesta inmunológica frente a un huésped de un antígeno. Aunque el ligando de Flt3 no se considera, según la invención, un adyuvante tal como se define en la presente

memoria, sin embargo puede considerarse un adyuvante según la acción descrita de intensificación de las respuestas inmunológicas. Sin embargo, para mayor claridad, el ligando de Flt3 no se denomina adyuvante en la presente memoria. Se cree que los adyuvantes ejercen sus efectos biológicos mediante uno o más mecanismos, incluyendo un incremento del área superficial de un antígeno, la prolongación de la retención del antígeno en el cuerpo, el enlentecimiento de la liberación del antígeno, el reconocimiento de un antígeno presente sobre los macrófagos, el incremento de la incorporación de antígenos, el incremento del procesamiento de antígenos, la estimulación de la liberación de citoquinas, la estimulación y activación de las células inmunológicas, tales como las células B, los macrófagos, las células dendríticas, las células T y algún otro tipo de inducción de una activación no específica de las células del sistema inmunológico. Entre los adyuvantes se incluyen un grupo heterogéneo de compuestos tales como emulsiones aceitosas (por ejemplo adyuvante de Freund), compuestos minerales (tales como alúmina), productos bacterianos (tales como la toxina de *Bordetella pertussis*), liposomas y complejos inmunoestimuladores.

Una "molécula auxiliar" tal como se define en la presente memoria es una molécula que se administra opcionalmente en un organismo, con el fin de acelerar, prolongar o reforzar la respuesta inmunológica del organismo frente a un antígeno. Por ejemplo, las citoquinas, factores de crecimiento y similares pueden utilizarse para incrementar o modular una respuesta inmunológica. Las citoquinas comprenden, aunque sin limitarse a ellas, interleuquinas tales como las interleuquinas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12, 15, 18 y 23, quimoquinas, GM-CSF, G-CSF, interferón- $\alpha$  e interferón- $\gamma$ , miembros de la familia de TNF, tales como TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , secuencias de CpG y similares.

El ARN suministrado a las células también puede ser ARN antisentido o ARNip. Por lo tanto, el ligando de Flt3 descrito según la invención en la presente memoria puede utilizarse para suministrar ARN antisentido o ARNip al interior de las células diana.

La capacidad de una composición de modular la actividad de los receptores de células T puede determinarse fácilmente mediante un ensayo *in vitro*. Típicamente, las células T para los ensayos son suministradas por líneas de células T transformadas, tales como los hibridomas de células T o células T que han sido aisladas de un mamífero, tal como un ser humano o un rodero tal como un ratón. Los hibridomas de células T adecuados se encuentran fácilmente disponibles o pueden producirse de una manera conocida *per se*. Las células T pueden aislarse de un mamífero de una manera conocida *per se*; ver, por ejemplo, Shimonkevitz R. *et al.*, J. Exp. Med. 158:303, 1983.

Un ensayo adecuado para determinar si una composición es capaz de modular la actividad de las células T se lleva a cabo de la manera siguiente, llevando a cabo las etapas 1 a 4 siguientes. Las células T expresan un marcador de una manera adecuada, que puede someterse a ensayo y que indica la activación o modulación de las células T o la actividad de las células T tras la activación. De esta manera, resulta posible utilizar el hibridoma de células T de ratón DO11.10, que expresa interleuquina-2 (IL-2) tras la activación. Pueden medirse las concentraciones de IL-2 con el fin de determinar si una composición es capaz de modular la actividad de dicho hibridoma de células T. Se lleva a cabo un ensayo adecuado de este tipo llevando a cabo las etapas siguientes:

1. Se obtienen células T, por ejemplo a partir de un hibridoma de células T de interés o mediante aislamiento a partir de un mamífero.
2. Las células T se cultivan bajo condiciones que permiten la multiplicación.
3. Las células T en multiplicación se ponen en contacto con células presentadoras de antígeno, que a su vez han sido puestas en contacto con un antígeno o un ácido nucleico codificante del mismo.
4. Las células T se someten a ensayo para un marcador, por ejemplo se mide la producción de IL-2.

Las células T utilizadas en los ensayos se incuban bajo condiciones adecuadas para la multiplicación. Por ejemplo, se incuba convenientemente un hibridoma de células DO11.10T a aproximadamente 37°C y con 5% de CO<sub>2</sub> en medio completo (RPMI 1640 suplementado con FBS al 10%, penicilina/estreptomina, L-glutamina y 2-mercaptoetanol 5x10<sup>-5</sup> M). Las señales de activación de las células T son proporcionadas por las células presentadoras de antígeno, que han sido cargadas con el péptido antigénico apropiado.

A modo de alternativa a la medición de una proteína expresada tal como IL-2, la modulación de la activación de las células T puede determinarse convenientemente a partir de los cambios en la multiplicación de las células T dependientes de antígeno, medida mediante técnicas de marcaje radioactivo conocidas. Por ejemplo, puede incluirse un nucleótido marcado (tal como tritiado) en un medio de cultivo de ensayo. La incorporación de este nucleótido marcado en el ADN sirve como medida de la multiplicación de las células T. Este ensayo no resulta adecuado para las células T que no requieren presentación de antígeno para el crecimiento, tales como los hibridomas de células T. El ensayo resulta adecuado para medir la modulación de la activación de las células T en el caso de células T no transformadas que han sido aisladas de mamíferos.

La capacidad de inducir una respuesta inmunológica, incluyendo en la preparación de vacunas contra una enfermedad diana posible, puede determinarse fácilmente mediante un ensayo *in vitro*. Por ejemplo, puede

administrarse una composición en un mamífero, tal como un ratón, y extraerse muestras de sangre del mamífero en el punto temporal de la primera administración y repetidamente a intervalos regulares posteriormente (tal como 1, 2, 5 y 8 semanas después de la administración). Se obtiene suero de las muestras de sangre y se somete a ensayo para el desarrollo de anticuerpos resultantes de la inmunización. Pueden determinarse las concentraciones de anticuerpo. Además, pueden aislarse linfocitos T de la sangre o de órganos linfáticos y someterse a ensayo funcional para la reactividad frente al antígeno o epítomos derivados del antígeno. Para ello, pueden utilizarse todos los sistemas "de lectura" conocidos por el experto en la materia, incluyendo los ensayos de proliferación, secreción de citoquinas, actividad citotóxica y análisis de tetrámeros.

Una molécula de ácidos nucleicos o una secuencia de ácidos nucleicos se refiere según la invención a un ácido nucleico, que preferentemente es ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN). Los ácidos nucleicos comprenden, según la invención, ADN genómico, ADNc, ARNm, moléculas producidas mediante técnicas recombinantes y las sintetizadas químicamente. Un ácido nucleico puede, según la invención, encontrarse en forma de una molécula de cadena sencilla o de doble cadena, lineal o cerrada circularmente de manera covalente.

El término "ARN" se refiere a una molécula que comprende por lo menos un residuo ribonucleótido. El término "ribonucleótido" se refiere a un nucleótido con un grupo hidroxilo en la posición 2' de un grupo  $\beta$ -D-ribofuranosa. El término comprende ARN de doble cadena, ARN de cadena sencilla, ARN aislado, tal como ARN parcial o completamente purificado, ARN sustancialmente puro, ARN sintético, ARN producido recombinantemente y ARN alterado, que difiere del ARN de origen natural en la adición, delección, sustitución y/o alteración de uno o más nucleótidos. Estos cambios pueden comprender la adición de material no nucleotídico, tal como en el extremo o extremos de un ARN o dentro del mismo, por ejemplo en uno o más nucleótidos del ARN. Los nucleótidos en las moléculas de ARN también pueden comprender nucleótidos no estándares, tales como nucleótidos de origen no natural o de nucleótidos o desoxinucleótidos sintetizados químicamente. Estos ARN alterados pueden denominarse análogos o como análogos de ARN natural.

El término "ARNm" se refiere a "ARN mensajero" y se refiere a un "transcrito", el cual es producido utilizando ADN como molde y que codifica por sí mismo un péptido o proteína. Un ARNm típicamente comprende una región 5' no traducida, una región codificante de proteína y una región 3' no traducida. El ARNm presenta un vida media limitada en las células e *in vitro*. Según la invención, puede producirse ARNm mediante la transcripción *in vitro* de un ADN molde.

Según la invención, puede proporcionarse ARN con modificaciones, las cuales, por ejemplo, incrementan la estabilidad del ARN y/o la eficiencia con la que se traduce el ARN. De esta manera, el ARN puede proporcionarse, por ejemplo, con una secuencia poli(A), en particular una secuencia poli(A) con extremo abierto. Se ha demostrado que el ARN con una secuencia poli(A) con extremo abierto se traduce más eficientemente que ARN con una secuencia poli(A) con un extremo cerrado. Además, se ha encontrado que una secuencia poli(A) larga, en particular de aproximadamente 120 pb, conduce a una estabilidad del transcrito y a una eficiencia de traducción del ARN óptimas. También se ha demostrado que una región 3' no traducida duplicada (UTR), en particular del gen de la  $\beta$ -globina humana, en una molécula de ARN conlleva una mejora de la eficiencia de la traducción, muy superior al efecto aditivo esperable con dos UTR individuales. Una combinación de las modificaciones indicadas anteriormente puede presentar una influencia sinérgica sobre la estabilización del ARN y un incremento de la traducción. Dicha modificaciones se describen en la solicitud de patente PCT nº EP 2006/009448, que se incluye en la presente memoria como referencia y que se encuentran contempladas según la invención.

Preferentemente, según la invención, una modificación y estabilización y/o incremento posteriores de la eficiencia de traducción del ARN se consigue mediante modificación de ingeniería genética de los vectores de expresión, que preferentemente sirve como molde para la transcripción *in vitro* del ARN.

En particular, dichos vectores deben permitir la transcripción del ARN con una secuencia poli(A), en la que la secuencia poli(A) preferentemente presenta un extremo abierto en el ARN, es decir, ningún nucleótido diferente de los nucleótidos A flanquea la secuencia poli(A) en su extremo 3'. Puede conseguirse una secuencia poli(A) de extremo abierto en el ARN mediante la introducción de un sitio de restricción de tipo II en un vector de expresión, el cual permite la transcripción del ARN bajo el control de un promotor de ARN polimerasa situado en posición 5' y que contiene un casete de poliadenilación (secuencia poli(A)), en el que el sitio de reconocimiento se sitúa en posición 3' respecto a la secuencia poli(A), mientras que el sitio de corte se encuentra situado cadena arriba y, de esta manera, dentro de la secuencia poli(A). Mediante el corte de restricción en el sitio de corte de restricción de tipo II, en un plásmido, resulta posible una linearización del plásmido dentro de la secuencia poli(A). El plásmido linearizado seguidamente puede utilizarse como molde para una transcripción *in vitro*, en la que el transcrito resultante termina en una secuencia poli(A) no cerrada.

Además o alternativamente, según la invención una modificación y por lo tanto la estabilización y/o incremento de la eficiencia de traducción del ADN puede conseguirse mediante la ingeniería genética de los vectores de expresión de manera que permitan la transcripción del ARN con dos o más regiones 3'-no traducidas en su extremo 3' y preferentemente entre la secuencia codificante para un péptido o proteína (marco de lectura abierto) y la secuencia poli(A).

En una forma de realización preferente, el ARN codificante de la invención se obtiene mediante la transcripción *in vitro* de un ADN molde adecuado. El promotor para el control de la transcripción puede ser cualquier promotor de una ARN polimerasa. Son ejemplos específicos de las ARN polimerasas, las ARN polimerasa de T7, de T3 y SP6. La transcripción *in vitro* preferentemente se encuentra controlada según la invención por un promotor de T7 o SP6.

Puede producirse un molde de ADN para la transcripción *in vitro* mediante clonación de un ácido nucleico, en particular ADNc, y la inserción del ácido nucleico en un vector adecuado para la transcripción *in vitro*.

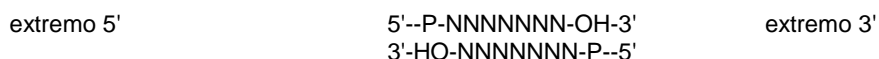
Según la invención, la expresión "ARN que codifica" se refiere, con respecto a un antígeno, a que el ARN, en el caso de que se encuentre en un ambiente adecuado, preferentemente en una célula, puede expresarse para producir el antígeno. Preferentemente el ARN es capaz de interactuar con la maquinaria celular de traducción, proporcionando el antígeno que codifica.

En el caso de que haya una referencia, según la invención, a que el ARN expresa más de un antígeno, el ARN puede comprender diversas moléculas de ARN, las cuales expresan diversos antígenos de entre estos diferentes antígenos. Sin embargo, la invención comprende además casos en los que una molécula de ARN expresa diversos antígenos, que opcionalmente se unen entre sí.

Según la invención, cualquier tecnología que resulte adecuada para transferir ARN al interior de las células puede utilizarse para introducir ARN en las células. Preferentemente se transfecta ARN en las células mediante técnicas estándares. Dichas técnicas comprenden la electroporación, la lipofección y la microinyección. Preferentemente, la introducción de ARN, que codifica para un antígeno, en una célula causa la expresión del antígeno en la célula.

Además, la expresión "ácido nucleico" comprende además derivados de ácidos nucleicos o secuencias de ácidos nucleicos tales como una derivatización química de un ácido nucleico en una base nucleótida, en el azúcar o en el fosfato y ácidos nucleicos que contienen nucleótidos y análogos de nucleótidos de origen no natural.

La expresión "extremo 3'" de un ácido nucleico" se refiere según la invención al extremo en el que se encuentra un grupo hidroxilo libre. En la representación esquemática de los ácidos nucleicos de doble cadena, en particular ADN, el extremo 3' se encuentra situado en todos los casos a la derecha. La expresión "extremo 5'" de un ácido nucleico" se refiere según la invención a aquel extremo en el que se encuentra situado un grupo fosfato libre. En la representación esquemática de los ácidos nucleicos de doble cadena, en particular de ADN, el extremo 5' en todos los casos se sitúa a la izquierda.



La expresión "acoplamiento funcional" o "acoplado funcionalmente" se refiere según la invención al acoplamiento en una relación funcional. Un ácido nucleico se encuentra "funcionalmente acoplado" en el caso de que se sitúe en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, un promotor se encuentra funcionalmente acoplado a una secuencia codificante en el caso de que influya sobre la transcripción de la secuencia codificante. Los ácidos nucleicos funcionalmente acoplados típicamente son contiguos entre sí, opcionalmente separados por secuencias de ácidos nucleicos adicionales.

Los ácidos nucleicos descritos según la invención preferentemente se encuentran aislados. La expresión "ácido nucleico aislado" se refiere, según la invención, a que el ácido nucleico: (i) ha sido amplificado *in vitro*, por ejemplo mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), (ii) ha sido producido recombinantemente mediante clonación, (iii) ha sido purificado, por ejemplo mediante corte y separación mediante electroforesis en gel, o (iv) ha sido sintetizado, por ejemplo mediante síntesis química. Un ácido nucleico aislado es un ácido nucleico que se encuentra disponible para la manipulación mediante técnicas de ADN recombinante.

Según la invención, una "secuencia de ácidos nucleicos que ha sido derivada de una secuencia de ácidos nucleicos" se refiere a un ácido nucleico en el que, en comparación con el ácido nucleico del que se ha derivado, existen sustituciones, deleciones y/o adicionales individuales o múltiples de nucleótidos, en el que existe un determinado grado de homología entre los ácidos nucleicos, es decir, los ácidos nucleicos presentan concordancias directas o complementarias significativas en la secuencia de sus nucleótidos. Un ácido nucleico derivado de un ácido nucleico presenta, según la invención, una propiedad funcional del ácido nucleico del que se ha derivado. Dichas propiedades se definen en particular a partir de las propiedades de los productos de expresión de los ácidos nucleicos. En el caso del ligando de Flt3 lo anterior se refiere en particular a las propiedades de unión al receptor de Flt3 y preferentemente a presentar la actividad biológica de transducción de una señal estimuladora a la célula mediante el receptor de Flt3 unido y/o al administrarlo concomitantemente con una vacuna de ARN, con el fin de poder intensificar la respuesta inmunológica inducida por el ARN. En el caso de los antígenos, lo anterior se refiere a la propiedad de poder inducir una respuesta inmunológica con una especificidad y/o reactividad comparables. Un ejemplo de una "secuencia de ácidos nucleicos que ha sido derivada de una secuencia de ácidos nucleicos" es un ácido nucleico en el que, en comparación con el ácido nucleico del que se ha derivado, existen optimizaciones de codones, por ejemplo para una mejor expresión en un organismo huésped particular o en una célula huésped

particular.

Una secuencia derivada de una secuencia de ácidos nucleicos o la expresión "secuencia derivada de una secuencia de ácidos nucleicos" se refiere preferentemente a secuencias homólogas.

Preferentemente, el grado de identidad entre ácidos nucleicos homólogos según la invención es por lo menos de 70%, en particular de por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% y preferentemente de por lo menos 99%. El grado de identidad preferentemente se indica para una región de por lo menos aproximadamente 30, de por lo menos aproximadamente 50, de por lo menos aproximadamente 70, de por lo menos aproximadamente 90, de por lo menos aproximadamente 100, de por lo menos aproximadamente 150, de por lo menos aproximadamente 200, de por lo menos aproximadamente 300, de por lo menos aproximadamente 400, de por lo menos aproximadamente 500, o de por lo menos aproximadamente 1.000 nucleótidos consecutivos. En formas de realización preferentes, el grado de identidad se indica para la longitud total del ácido nucleico de referencia, tal como las secuencias de ácidos nucleicos indicadas en el listado de secuencias.

La expresión "porcentaje de identidad" se refiere a un porcentaje de nucleótidos que son idénticos entre dos secuencias que deben compararse en el caso de que exista una alineación óptima, en la que el porcentaje es puramente estadístico, las diferencias entre dos secuencias pueden distribuirse aleatoriamente y a lo largo de la secuencia completa y la secuencia que debe compararse puede comprender adiciones o deleciones en comparación con la secuencia de referencia, con el fin de conseguir la alineación óptima entre dos secuencias. Las comparaciones entre dos secuencias generalmente se llevan a cabo comparando estas secuencias tras la alineación óptima respecto a un segmento o "ventana de comparación", para identificar las regiones locales de concordancia de secuencias. La alineación óptima con fines de comparación puede llevarse a cabo manualmente o mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Ads App. Math.* 2:482, 1981, mediante el algoritmo de homología local de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970, y mediante el algoritmo de búsqueda de similitudes de Pearson y Lipman. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988, o con ayuda de programas informáticos que utilizan dichos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N y TFASTA en el paquete Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.).

El porcentaje de identidad se obtiene determinando el número de posiciones idénticas en las que concuerdan las secuencias que deben compararse, dividiendo este número por el número de posiciones comparado y multiplicando este resultado por 100.

Por ejemplo, resulta posible utilizar el programa BLAST "BLAST 2 sequences", que puede obtenerse del sitio de internet <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>.

Un ácido nucleico es, en particular, "homólogo" respecto a otro ácido nucleico en el caso de que dos secuencias de las cadenas complementarias se hibriden entre sí y puedan formar un dúplex estable, en el que la hibridación preferentemente tiene lugar bajo condiciones que permiten una hibridación específica entre polinucleótidos (condiciones astringentes). Las condiciones astringentes se describen, por ejemplo, en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook *et al.*, editor, 2a edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, o en *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel *et al.*, editor, John Wiley & Sons, Inc., New York, y se refieren, por ejemplo, a la hibridación a 65°C en tampón de hibridación (3,5 x SSC, Ficoll al 0,02%, polivinilpirrolidona al 0,02%, albúmina de suero bovino al 0,02%, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,5 mM (pH 7), SDS al 0,5%, EDTA 2 mM). SSC es cloruro sódico 0,15 M/citrato sódico 0,15 M, pH 7. Tras la hibridación, la membrana sobre la que se ha transferido el ADN se lava en, por ejemplo, 2xSSC a temperatura ambiente y después en 0,1-0,5 x SSC/0,1 x SDS a temperaturas de hasta 68°C.

El porcentaje de complementariedad indica el porcentaje de nucleótidos consecutivos en un ácido nucleico que pueden formar enlaces de hidrógeno con un segundo ácido nucleico (por ejemplo mediante apareamiento de bases de Watson-Crick). Los ácidos nucleicos complementarios preferentemente presentan, según la invención, por lo menos 40%, en particular por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90% y preferentemente por lo menos 95%, por lo menos 98% o por lo menos 99% de nucleótidos complementarios. Preferentemente, los ácidos nucleicos complementarios son completamente complementarios, lo que significa que la totalidad de los nucleótidos consecutivos formarán enlaces de hidrógeno con el mismo número de nucleótidos consecutivos en un segundo ácido nucleico.

La expresión "similitud de secuencias" muestra el porcentaje de aminoácidos que son idénticos o que representan sustituciones conservadoras de aminoácidos. La "identidad de secuencia" entre dos polipéptidos o ácidos nucleicos proporciona el porcentaje de aminoácidos o nucleótidos que son idénticos en las secuencias.

El término "derivado" referido a un ácido nucleico se refiere, según la invención, a que existen sustituciones, deleciones y/o adiciones individuales o múltiples de nucleótidos en un ácido nucleico. Además, el término "derivado" comprende además una derivatización química de un ácido nucleico en una base, un azúcar o fosfato de un nucleótido. El término "derivado" comprende además ácidos nucleicos que contienen nucleótidos y análogos de

nucleótidos que no son de origen natural.

Los derivados de un ácido nucleico particular se refieren en particular a variantes del ácido nucleico, en particular variantes de procesamiento, isoformas y homólogos específicos del ácido nucleico, en particular aquellos que se expresan naturalmente.

Los ácidos nucleicos pueden analizarse según la invención con respecto a variantes tales como las variantes de procesamiento de una manera conocida *per se*. Las técnicas para el análisis de las variantes de procesamiento comprenden la transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), la transferencia northern y la hibridación *in situ*.

También puede utilizarse una técnica denominada "protección frente a ARNasa" para identificar los ARNm de procesamiento alternativo. La protección frente a ARNasa comprende la transcripción de una secuencia génica en ARN sintético, el cual se hibrida con ARN, que por ejemplo ha sido derivado de otras células. A continuación, el ARN hibridado se incuba con enzimas que reconocen los apareamientos incorrectos del híbrido ARN:ARN. Los fragmentos que son de menor tamaño del esperado indican la presencia de ARNm procesados alternativamente. Los ARNm alternativamente procesados putativos pueden clonarse y secuenciarse de una manera conocida *per se*.

La RT-PCR también puede utilizarse para identificar los ARNm procesados alternativamente. En la RT-PCR, el ARNm es convertido en ADNc por el enzima transcriptasa inversa de una manera conocida *per se*. La secuencia codificante completa del ADNc seguidamente es amplificada mediante PCR utilizando un cebador directo, situado en la región 3' no traducida, y un cebador inverso, situado en la región 5' no traducida. Los productos de amplificación pueden analizarse, por ejemplo mediante electroforesis en gel de agarosa, con respecto a formas alternativamente procesadas, por ejemplo mediante comparación del tamaño de los productos amplificados con el tamaño del producto esperado procedente del ARNm procesado normalmente. Cualesquiera cambios con respecto al tamaño de los productos de amplificación podría indicar procesamiento alternativo.

El ARNm derivado de genes mutados también puede identificarse simplemente mediante las técnicas indicadas anteriormente para la identificación de formas procesadas alternativamente. Por ejemplo, pueden identificarse las formas alélicas de genes y el ARNm producido por ellos, que según la invención se consideran "mutantes".

Los ácidos nucleicos pueden, según la invención, encontrarse presentes solos o en combinación con otros ácidos nucleicos, que pueden ser homólogos o heterólogos. En formas de realización particulares, un ácido nucleico según la invención se acopla funcionalmente con secuencias de control de la expresión, que pueden ser homólogas o heterólogas respecto al ácido nucleico. El término "homólogo" se refiere a que un ácido nucleico también se acopla funcionalmente de manera natural con el ácido nucleico con el que se combina, y el término "heterólogo" se refiere a que un ácido nucleico no se acopla funcionalmente de manera natural con el ácido nucleico con el que se combina.

Un ácido nucleico transcribible, en particular un ácido nucleico codificante de un péptido o proteína, y una secuencia de control de la expresión se acoplan entre sí "funcionalmente" en el caso de que se unan entre sí covalentemente de manera que la transcripción o la expresión del transcribible y en particular del ácido nucleico codificante se encuentra bajo el control o bajo la influencia de la secuencia de control de la expresión. En el caso de que el ácido nucleico deba traducirse en un péptido o proteína funcional, en un acoplamiento funcional de una secuencia de control de la expresión con la secuencia codificante, una inducción de la secuencia de control de la expresión conduce a la transcripción de la secuencia codificante, sin resultar en un desplazamiento del marco de lectura de la secuencia codificante o en una incapacidad de la secuencia codificante de ser traducida en el péptido o proteína deseado.

Según la invención, la expresión "secuencia de control de la expresión" comprende promotores, secuencias de unión ribosómica y otros elementos de control, que controlan la transcripción de un gen o la traducción del ARN derivado. En formas de realización particulares según la invención, las secuencias de control de la expresión pueden regularse. La estructura precisa de las secuencias de control de la expresión puede variar dependiendo de la especie o del tipo celular, aunque generalmente comprende secuencias 5' no transcritas y secuencias 5' y 3' no traducidas que participan en el inicio de la transcripción o traducción, tales como la caja TATA, la secuencia de adición de caperuza, la secuencia CAAT y similares. En particular, las secuencias de control de la expresión 5' no transcritas comprenden una región promotora, que incluye una secuencia promotora para un control transcripcional del gen funcionalmente acoplado. Las secuencias de control de la expresión también pueden comprender secuencias intensificadoras o secuencias activadoras situadas cadena arriba.

El término "promotor" o "región promotora" se refiere a una secuencia de ADN que se encuentra situada cadena arriba (5') respecto a la secuencia codificante de un gen y controla la expresión de la secuencia codificante al proporcionar un sitio de reconocimiento y unión para la ARN polimerasa. La región promotora puede contener sitios de reconocimiento o de unión adicionales para otros factores que participan en la regulación de la transcripción del gen. Un promotor puede controlar la transcripción de un gen procariótico o eucariótico. Un promotor puede ser "inducible" e iniciar la transcripción en respuesta a un agente inductor o puede ser "constitutivo", en el caso de que la



transcripción no se encuentre controlada por un agente inductor. Un promotor inducible no se expresa o sólo se expresa en un grado muy limitado, en ausencia del agente inductor. En presencia del agente inductor, el gen se encuentra "activado" o se incrementa el nivel de transcripción. Convencionalmente lo anterior se produce mediante la unión de un factor de transcripción específico.

5 Los promotores preferentes según la invención son, por ejemplo, promotores para la polimerasa de SP6, de T3 o de T7.

10 El término "expresión" se utiliza según la invención en su sentido más amplio y comprende la producción de ARN y de ARN y proteínas. Comprende además una expresión parcial de los ácidos nucleicos. En referencia al ARN, el término "expresión" o "traducción" se refiere en particular a la producción de péptidos o proteínas. La expresión puede tener lugar de una manera transitoria o estable.

15 Un ácido nucleico que codifica para una proteína o péptido puede según la invención acoplarse con otro ácido nucleico que codifica para una secuencia peptídica, que por ejemplo controla la expresión de la proteína o péptido codificado por el ácido nucleico a partir de una célula huésped, o incrementa la inmunogenicidad de la proteína o péptido codificado por el ácido nucleico. Un ácido nucleico puede según la invención acoplarse también a otro ácido nucleico que codifica para una secuencia peptídica que provoca el anclaje de la proteína o péptido codificado a la membrana celular de una célula huésped o su compartimentalización en orgánulos particulares de esta célula. Iguualmente, puede producirse el acoplamiento a un ácido nucleico que representa un gen informador o cualquier "etiqueta".

25 El término "transcripción" se refiere según la invención a un proceso en el que el código genético en una secuencia de ADN se transcribe en ARN. A continuación, el ARN puede ser traducido en proteína. Según la invención, el término "transcripción" comprende la "transcripción *in vitro*", haciendo referencia la expresión "transcripción *in vitro*" a un procedimiento por el que el ARN, en particular el ARNm, se sintetiza *in vitro* sin células, es decir, preferentemente utilizando extractos celulares convenientemente preparados. Los vectores de clonación, que generalmente se denominan vectores de transcripción y según la invención se encuentran cubiertos por el término "vector" preferentemente se utilizan para la producción de transcritos.

30 El término "traducción" se refiere según la invención a un proceso en los ribosomas por el que una cadena de ARNm controla el ensamblaje de una secuencia de aminoácidos, para producir una proteína o péptido.

35 La región 3' no traducida se refiere a una región, situada en el extremo 3' de un gen situado cadena abajo del codón de parada de una región codificante de proteína, que se transcribe pero que no se traduce en una secuencia de aminoácidos.

40 Según la invención, una primera región polinucleótida se considera situada cadena abajo de una segunda región polinucleótida en el caso de que el extremo 5' de la primera región polinucleótida sea la parte más próxima de la primera región polinucleótida a la región 3' de la segunda región polinucleótida.

45 La región 3' no traducida típicamente se extiende desde el codón de parada para un producto de traducción hasta la secuencia poli(A), que convencionalmente se añade después del proceso de transcripción. Las regiones 3' no traducidas del ARNm de mamífero típicamente presentan una región de homología que se conoce como la secuencia hexanucleótido AAUAAA. Esta secuencia es presumiblemente la señal de adición de poli(A). Con frecuencia se encuentra 10 a 30 bases antes del sitio de adición de poli(A).

50 Las regiones 3' no traducidas pueden contener una o más repeticiones invertidas, que pueden plegarse en estructuras de tallo-bucle que funcionan como barrera a las exorribonucleasas o que interactúan con proteínas que es conocido que incrementan la estabilidad del ARN (por ejemplo las proteínas de unión al ARN).

55 Las regiones 5' y/o 3' no traducidas pueden según la invención acoplarse funcionalmente con un ácido nucleico transcribible y en particular codificante, de manera que estas regiones se encuentren en una relación con el ácido nucleico en la que incrementen la estabilidad y/o eficiencia de traducción del ARN transcrito por el ácido nucleico transcribible.

60 Las regiones 3' no traducidas de ARNm de inmunoglobulina son relativamente cortas (menos de aproximadamente 300 nucleótidos), mientras que las regiones 3' no traducidas de otros genes son relativamente largas. Por ejemplo, la región 3' no traducida de tPA presenta una longitud de aproximadamente 800 nucleótidos, la del factor VIII presenta una longitud de aproximadamente 1.800 nucleótidos y la eritropoyetina presenta una longitud de aproximadamente 560 nucleótidos.

65 Según la invención puede determinarse si una región 3' no traducida o una secuencia de ácidos nucleicos derivada de la misma incrementa la estabilidad y/o la eficiencia de traducción del ARN, mediante la inserción de la región 3' no traducida o la secuencia de ácidos nucleicos derivada de la misma en la región 3' no traducida de un gen y midiendo si dicha inserción incrementa la cantidad de la proteína sintetizada.

Lo anteriormente expuesto resulta aplicable al caso en que según la invención un ácido nucleico comprende 2 o más regiones 3' no traducidas, las cuales preferentemente se acoplan secuencialmente con o sin un conector entre ellas, preferentemente en una "relación cabeza con cola" (es decir, las regiones 3' no traducidas presentan la misma orientación, preferentemente la orientación natural en un ácido nucleico).

El término "gen" se refiere según la invención a una secuencia particular de ácidos nucleicos que es responsable de la producción de uno o más productos celulares y/o para conseguir una o más funciones intercelulares o intracelulares. En particular, el término se refiere a un segmento de ADN que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína específica o una molécula de ARN funcional o estructural.

Las expresiones "casete de poliadenilación" y "secuencia poli(A)" se refieren a una secuencia de residuos adenilo que típicamente se encuentra situada en el extremo 3' de una molécula de ARN. Se encuentra contemplado según la invención que dicha secuencia sea añadida por un ADN molde basándose en residuos timidilo repetitivos en la cadena complementaria a la cadena codificante durante la transcripción del ARN, mientras que normalmente no se encuentra codificado en el ADN sino que es unido al extremo 3' libre del ARN por una ARN polimerasa independiente de molde tras la transcripción en el núcleo celular. Según la invención, una secuencia de nucleótidos de por lo menos 20, preferentemente de por lo menos 40, preferentemente de por lo menos 80, preferentemente de por lo menos 100 y preferentemente de hasta 500, preferentemente de hasta 400, preferentemente de hasta 300, preferentemente de hasta 200 y en particular de hasta 150 nucleótidos A sucesivo, y en particular de aproximadamente 120 nucleótidos A sucesivos debe entenderse como una secuencia poli(A) de este tipo, en la que la expresión "nucleótido A" se refiere a residuos adenilo.

La expresión "endonucleasa de restricción" o "enzima de restricción" se refiere a una clase de enzimas que corta los enlaces fosfodiéster en ambas cadenas de una molécula de ADN dentro de secuencias de bases específicas. Reconocen, en una molécula de ADN de doble cadena, sitios de unión específicos, los cuales se denominan secuencias de reconocimiento. Los sitios en los que los enlaces fosfodiéster en el ADN son cortados por los enzimas se conocen como sitios de corte. En el caso de los enzimas de tipo II, el sitio de corte se encuentra a una distancia definida del sitio de unión del ADN. La expresión "endonucleasa de restricción" según la invención comprende, por ejemplo, los enzimas SapI, EciI, BpiI, AarI, AclI, BaeI, BbvCI, PpiI y PstI, BsrD1, BtsI, EarI, Bmri, BsaI, BsmBI, Faul, BbsI, BciVI, BfuAI, BspMI, BseRI, EciI, BtgZI, BpuEI, BsgI, MmeI, CspCI, BaeI, BsaMI, Mva1269I, PctI, Bse3DI, BseMI, Bst6I, Eam1104I, Ksp632I, BfiI, Bso31I, BspTNI, Eco31I, Esp3I, BfuI, Acc36I, AarI, Eco57I, Eco57MI, GsuI, AclI, Hin4I, PpiI y PstI.

La expresión "vida media" se refiere al periodo de tiempo que resulta necesario para la eliminación de la mitad de la actividad, cantidad o número de moléculas.

En una forma de realización preferente, una molécula de ácidos nucleicos según la invención es un vector. El término "vector" se utiliza en su sentido más amplio y comprende cualesquiera vehículos intermedios para un ácido nucleico, que permiten, por ejemplo, introducir el ácido nucleico en células huésped procarióticas y/o eucarióticas y opcionalmente se integran en un genoma. Dichos vectores preferentemente se replican y/o se expresan en la célula. Los vectores comprenden plásmidos, fagémidos o genomas víricos. El término "plásmido", tal como se utiliza en la presente memoria, generalmente se refiere a un constructo de material genético extracromosómico, habitualmente un ADN dúplex circular que puede replicarse independientemente de ADN cromosómico.

La expresión "célula huésped" se refiere según la invención a cualquier célula que es transformable o transfectable con un ácido nucleico exógeno, preferentemente ADN o ARN. La expresión "célula huésped" comprende, según la invención, células procarióticas (por ejemplo *E. coli*) o células eucarióticas (por ejemplo células de mamífero, en particular células humanas, células de levadura y células de insecto). Las células de mamífero, tales como células de ser humano, ratón, hámster, cerdo, cabra y primate resultan especialmente preferentes. Las células pueden derivarse de un gran número de tipos de tejidos y pueden comprender células y líneas celulares primarias. Entre los ejemplos específicos se incluyen queratinocitos, leucocitos sanguíneos periféricos y células madre de médula ósea. En formas de realización adicionales, la célula huésped es una célula presentadora de antígeno, en la que la expresión "célula presentadora de antígeno" comprende según la invención células dendríticas, monocitos y macrófagos. Un ácido nucleico puede encontrarse presentes en la célula huésped en únicamente una copia o en varias copias y en una forma de realización se expresa en la célula huésped.

El término "péptido" se refiere a sustancias que comprenden dos o más, preferentemente 3 o más, preferentemente 4 o más, preferentemente 6 o más, preferentemente 8 o más, preferentemente 10 o más, preferentemente 13 o más, preferentemente 16 o más, preferentemente 20 o más y hasta preferentemente 50, preferentemente 100 o preferentemente 150 aminoácidos sucesivos, los cuales se unen entre sí mediante enlaces peptídicos. El término "proteína" o "polipéptido" se refiere a grandes péptidos, preferentemente péptidos con por lo menos 151 aminoácidos; sin embargo, los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" generalmente se utilizan como sinónimos en la presente memoria. Los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" comprenden, según la invención, sustancias que contienen no sólo constituyentes aminoácidos, sino también constituyentes no aminoácidos, tales como azúcares y estructuras de fosfato y comprenden además sustancias que contienen enlaces, tales como enlaces éster, tioéter o disulfuro.

Una secuencia derivada de una secuencia de aminoácidos o la expresión "secuencia derivada de una secuencia de aminoácidos" se refiere según la invención a secuencias homólogas y derivados de la primera secuencia.

Una secuencia derivada de una secuencia de aminoácidos presenta según la invención una propiedad funcional de la secuencia de aminoácidos a partir de la que se ha derivado. En el caso del ligando de Flt3, lo anterior se refiere en particular a las propiedades de unión al receptor de Flt3 y preferentemente a que presenta la actividad biológica de transducción de una señal de estimulación a la célula mediante el receptor de Flt3 unido, y/o al administrarlo concomitantemente con una vacuna de ARN, a la capacidad de intensificar la respuesta inmunológica inducida por el ARN. En el caso de los antígenos, lo anterior se refiere a la propiedad de poder inducir una respuesta inmunológica de especificidad y/o reactividad comparables.

Los "homólogos" o "derivados" de una proteína o polipéptido o de una secuencia de aminoácidos en el sentido de la presente invención comprenden variantes por inserción de aminoácidos, variantes por delección de aminoácidos y/o variantes por sustitución de aminoácidos.

Las variantes por inserción de aminoácidos comprenden fusiones amino-terminales y/o carboxi-terminales, e inserciones de aminoácidos individuales o de varios aminoácidos en una secuencia particular de aminoácidos. En el caso de las variantes de secuencias de aminoácidos con una inserción, se insertan uno o más residuos aminoácidos en un punto predeterminado en una secuencia de aminoácidos, aunque también resulta posible la inserción aleatoria con el cribado adecuado del producto resultante. Las variantes por delección de aminoácidos se caracterizan por la eliminación de uno o más aminoácidos de la secuencia. Las variantes por sustitución de aminoácidos se caracterizan porque por lo menos un residuo en la secuencia ha sido eliminado y se ha insertado otro residuo en su lugar. Preferentemente, las modificaciones se localizan en posiciones de la secuencia de aminoácidos que no se encuentran conservadas entre proteínas o polipéptidos homólogos. Los aminoácidos preferentemente son sustituidos por otros con propiedades similares, tales como la hidrofobicidad, la hidrofiliidad, la electronegatividad, el volumen de la cadena lateral, etc. (sustitución conservadora). Las sustituciones conservadoras se refieren, por ejemplo, a la sustitución de un aminoácido por otro, encontrándose ambos aminoácidos listados en el mismo grupo proporcionado a continuación:

1. Residuos alifáticos, no polares o ligeramente polares de pequeño tamaño: Ala, Ser, Thr (Pro, Gly)
2. Residuos cargados negativamente y las amidas de los mismos: Asn, Asp, Glu, Gln
3. Residuos cargados positivamente: His, Arg, Lys
4. Residuos no polares alifáticos de gran tamaño: Met, Leu, Ile, Val (Cys)
5. Residuos aromáticos de gran tamaño: Phe, Tyr, Trp.

Se citan tres residuos entre paréntesis debido a su función especial para la arquitectura de las proteínas. Gly es el único residuo sin una cadena lateral y, por lo tanto, dota de flexibilidad a la cadena. Pro presenta una geometría peculiar, lo que limita la cadena considerablemente. Cys puede formar un puente disulfuro.

Las variantes de aminoácidos indicadas anteriormente pueden ser fácilmente producidas mediante técnicas conocidas de síntesis de péptidos, por ejemplo mediante "síntesis en fase sólida" (Merrifield, 1964) y procedimientos similares o mediante manipulación de ADN recombinante. Las técnicas para insertar mutaciones por sustitución en puntos predeterminados de ADN que presenta una secuencia conocida o parcialmente conocida son bien conocidas y comprenden, por ejemplo, la mutagénesis en M13. La manipulación de secuencias de ADN para producir proteínas con sustituciones, inserciones o delecciones y los procedimientos recombinantes generales de expresión de proteínas, por ejemplo en un sistema biológico (tal como sistemas de mamífero, de insecto, vegetales y víricos) se describen en detalle en, por ejemplo, Sambrook *et al.* (1989).

Los "derivados" de proteínas o polipéptidos comprenden además según la invención sustituciones, delecciones y/o adiciones individuales o múltiples de cualesquiera moléculas asociadas a la proteína o polipéptido, tales como carbohidratos, lípidos y/o proteínas o polipéptidos.

En una forma de realización, los "derivados" de proteínas o polipéptidos comprenden aquellos análogos modificados que se forman mediante glucosilación, acetilación, fosforilación, amidación, palmitoilación, miristoilación, isoprenilación, lipidación, alquilación, derivatización, inserción de grupos protectores/bloqueantes, corte proteolítico o unión a un anticuerpo o a otro ligando celular. Los derivados de proteínas o polipéptidos también pueden producirse mediante otros procedimientos, por ejemplo mediante corte químico con bromuro de cianógeno, tripsina, quimiotripsina, papaína, proteasa V8, NaBH<sub>2</sub>, acetilación, formilación, oxidación, reducción o mediante síntesis metabólica en presencia de tunicamicina.

Además, el término "derivado" también se extiende a todos los equivalentes químicos funcionales de las proteínas o polipéptidos.

Los derivados de una proteína o péptido particular se refieren además a las variantes modificadas post-traduccionales, a las isoformas y a los homólogos específicos de la proteína o péptido, en particular aquellos que se expresan naturalmente.

Las proteínas y péptidos descritos según la invención preferentemente han sido aislados. Las expresiones "proteína aislada" o "péptido aislado" se refieren a que la proteína o péptido ha sido aislado a partir de su ambiente natural. Una proteína o péptido aislado puede encontrarse en un estado sustancialmente purificado. La expresión "sustancialmente purificado" se refiere a que la proteína o péptido se encuentra esencialmente libre de otras sustancias, con las que se encuentra asociado en la naturaleza o *in vivo*.

Las proteínas o péptidos descritos según la invención pueden aislarse a partir de muestras biológicas, tales como homogenados de tejidos o celulares o pueden expresarse en un gran número de sistemas de expresión eucarióticos y procarióticos.

Preferentemente, el grado de similitud, preferentemente la identidad entre una secuencia de aminoácidos indicada en la presente memoria y una secuencia de aminoácidos que se deriva de dicha secuencia de aminoácidos es de por lo menos 70%, preferentemente de por lo menos 80%, todavía más preferentemente de por lo menos 90% o más preferentemente de por lo menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99%. El grado de similitud o identidad preferentemente se indica para una región de por lo menos aproximadamente 10, por lo menos aproximadamente 20, por lo menos aproximadamente 40, por lo menos aproximadamente 60, por lo menos aproximadamente 80, por lo menos aproximadamente 100, por lo menos aproximadamente 150, por lo menos aproximadamente 200, por lo menos aproximadamente 250 o por lo menos aproximadamente 300 aminoácidos consecutivos. En formas de realización preferentes, el grado de identidad se indica para la longitud total de la secuencia de aminoácidos de referencia.

Con respecto a la identidad de las secuencias de aminoácidos, las afirmaciones anteriores con respecto a la identidad de las secuencias de ácidos nucleicos resultan adecuadamente aplicables.

Una parte, es decir un fragmento, o un derivado de una proteína o péptido preferentemente presenta, según la invención, una propiedad funcional de la proteína o péptido del que se ha derivado. Estas propiedades funcionales se han explicado anteriormente para el ligando y antígenos Flt3 y comprenden, por ejemplo, la reactividad inmunológica, en particular la interacción con anticuerpos o la interacción con otros péptidos o proteínas. Una importante propiedad es la capacidad de formar un complejo con las moléculas del CMH o los receptores de Flt3 y opcionalmente la producción o inhibición de una respuesta inmunológica, por ejemplo mediante la estimulación o inhibición de las células T citotóxicas o auxiliares o la inducción de una reacción celular. Una parte de una proteína o péptido preferentemente comprende una secuencia de por lo menos 6, por lo menos 8, por lo menos 10, por lo menos 12, por lo menos 15, por lo menos 20, por lo menos 30 y preferentemente hasta 8, hasta 10, hasta 12, hasta 15, hasta 20, hasta 30 o hasta 50 aminoácidos sucesivos de la proteína o péptido. En una forma de realización, una parte de una proteína o péptido se refiere según la invención a uno o más epítomos del péptido o proteína completo, en el que los epítomos pueden encontrarse en su acoplamiento natural o pueden presentar un acoplamiento artificial, es decir, no natural, es decir, los epítomos pueden encontrarse, por ejemplo, separados entre sí por un conector artificial. Preferentemente, una parte de una proteína o péptido se refiere según la invención a una secuencia que es una diana, en particular un epítopo, para una respuesta inmunológica en un paciente. En formas de realización preferentes, la secuencia es una diana para una respuesta inmunológica mediada por anticuerpos y/o células T. Un péptido, proteína o derivado utilizado según la invención puede comprender además varias de dichas secuencias, las cuales representan epítomos para anticuerpos o células T.

Una parte, es decir un fragmento, de un ácido nucleico que codifica para una proteína o péptido preferentemente se refiere según la invención a la parte del ácido nucleico que codifica para por lo menos la proteína o péptido y/o para una parte de la proteína o péptido tal como se ha definido anteriormente. Una parte de un ácido nucleico que codifica para una proteína o péptido preferentemente se refiere a la parte del ácido nucleico que corresponde al marco de lectura abierto.

Las preparaciones y composiciones farmacéuticas descritas según la invención pueden utilizarse terapéuticamente para el tratamiento de una enfermedad ya existente o preventivamente/profilácticamente como vacunas para la inmunización, para prevenir las enfermedades indicadas en la presente memoria.

Pueden utilizarse modelos animales para someter a ensayo una acción inmunizadora, por ejemplo contra el cáncer al utilizar un antígeno asociado a tumor como antígeno. Para ello, pueden introducirse, por ejemplo, células de cáncer humano en un ratón para crear un tumor y puede administrarse una preparación según la invención o una composición según la invención que comprende un ARN codificante para un antígeno asociado a tumor. El efecto sobre las células de cáncer (por ejemplo una reducción del tamaño tumoral) puede medirse como una medida de la eficacia de una inmunización.

Puede administrarse una o más vacunas de ARN con uno o más adyuvantes para inducir una respuesta inmunológica o para incrementar una respuesta inmunológica como parte de la composición para una inmunización.

También pueden administrarse otras sustancias que estimulan una respuesta inmunológica del paciente. Por ejemplo, pueden utilizarse citoquinas en una vacunación debido a sus propiedades reguladoras sobre los linfocitos. Dichas citoquinas comprenden, por ejemplo, interleuquina-12 (IL-12), que se ha demostrado que refuerza los efectos

protectores de las vacunas (ver Science 268:1432-1434, 1995), FEC-GM e IL-18.

El enfoque según la invención para inducir una respuesta inmunológica en un mamífero generalmente comprende la administración de una cantidad de una vacuna de ARN que, conjuntamente con la administración de ligando de Flt3, induce una respuesta inmunológica, que preferentemente es profiláctica y/o terapéutica.

El término "transfección" se refiere según la invención a la introducción de uno o más ácidos nucleicos en un organismo o en una célula huésped. Pueden utilizarse diversos procedimientos según la invención para introducir ácidos nucleicos en células *in vitro* o *in vivo*. Dichos procedimientos comprenden la transfección de precipitados de ácidos nucleicos-CaPO<sub>4</sub>, la transfección de ácidos nucleicos asociados a DEAE, la transfección o infección con virus portadores de los ácidos nucleicos de interés, la transfección mediada por liposomas y similares. En formas de realización particulares, resulta preferente dirigir el ácido nucleico a células particulares. En dichas formas de realización, un portador que se utiliza para la administración de un ácido nucleico en una célula (por ejemplo un retrovirus o un liposoma) puede presentar una molécula de reconocimiento unida. Por ejemplo puede incorporarse en el ácido nucleico portador o unirse al mismo una molécula, tal como un anticuerpo, que sea específica de una proteína membranal de superficie de la célula diana, o un ligando para un receptor en la superficie de la célula diana. En el caso que se desee la administración de un ácido nucleico con liposomas, pueden incorporarse en la formulación de liposomas, proteínas que se unen a una proteína membranal de superficie asociada mediante endocitosis, con el fin de posibilitar el reconocimiento y/o la incorporación. Dichas proteínas comprenden proteínas de cápside o fragmentos de las mismas, las cuales son específicas de un tipo celular particular, anticuerpos contra proteínas que se internalizan, proteínas con diana en un sitio intracelular, y similares.

Según la invención, la administración de ácidos nucleicos puede tener lugar en forma de ácidos nucleicos desnudos o conjuntamente con un reactivo de administración. Por ejemplo, la administración de ácidos nucleicos *in vivo* mediante liposomas dirigidos también se encuentra contemplada según la invención.

Para la administración de ácidos nucleicos, resulta posible utilizar vectores derivados de adenovirus (AD), virus adenoasociados (VAA), retrovirus (tales como lentivirus (LV), rabdovirus, virus de la leucemia murina) o virus herpes, y similares. El tropismo de los vectores víricos puede modificarse convenientemente mediante pseudotipado de los vectores con proteínas de cubierta u otros antígenos de superficie procedentes de otros virus o mediante sustitución de diversas proteínas de la cápside vírica.

Los liposomas pueden prestar apoyo al suministro del ácido nucleico a un tejido particular y también pueden incrementar la vida media del ácido nucleico. Los liposomas que resultan adecuados según la invención se forman a partir de lípidos estándares formadores de vesículas, entre los que generalmente se incluyen fosfolípidos neutros o cargados negativamente, y un esteroles tal como el colesterol. La selección de lípidos generalmente está determinada por factores tales como el tamaño de liposoma deseado y la vida media de los liposomas. Se conocen muchos procedimientos para la producción de liposomas; ver, por ejemplo, Szoka *et al.*, Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467, 1980, y las patentes US nº 4.235.871, nº 4.501.728, nº 4.837.028 y nº 5.019.369.

En formas de realización particulares, resulta preferente dirigir el ácido nucleico a células particulares. En dichas formas de realización, un portador que se utiliza para la administración de un ácido nucleico en una célula (por ejemplo un retrovirus o un liposoma) puede presentar una molécula de reconocimiento unida. Por ejemplo, una molécula, tal como un anticuerpo, que sea específica de una proteína membranal de superficie de la célula diana o un ligando para un receptor sobre la célula diana puede incorporarse en el portador de ácidos nucleicos o puede unirse al mismo. En el caso de que se desee la administración de un ácido nucleico con liposomas, las proteínas que se unen a una proteína membranal de superficie asociada a la endocitosis pueden incorporarse en la formulación de liposomas, haciendo posible el reconocimiento y/o la incorporación. Dichas proteínas comprenden proteínas de cápside o fragmentos de las mismas que son específicas para un tipo celular particular, anticuerpos contra proteínas que se internalizan, proteínas con diana en un sitio intracelular, y similares.

Preferentemente, se administra ARN conjuntamente con sustancias estabilizadoras, tales como inhibidores de ARNasa.

La administración de polipéptidos y péptidos puede tener lugar de una manera conocida *per se*.

El término "paciente", "individuo" u "organismo" se refiere a mamíferos. Por ejemplo, los mamíferos que se encuentran contemplados según la invención son seres humanos, primates, animales de compañía tales como perros, gatos, etc., animales domesticados tales como ovejas, vacas, cabras, cerdos, caballos y similares, animales de laboratorio tales como ratones, ratas, conejos, cobayas, etc., y animales mantenidos en cautividad, tales como animales de zoológico. El término "animal" tal como se utiliza en la presente memoria incluye los seres humanos.

Algunos términos tales como "cultivar", "incrementar" o "reforzar" preferentemente se refieren a cultivar, incrementar o intensificar en por lo menos 10%, en particular en por lo menos 20%, por lo menos 50% o por lo menos 100% desde un estado que no se encuentra presente y/o que no resulta detectable a un estado que se encuentra presente y/o detectable.

Las expresiones "célula T" y "linfocito T" se utilizan intercambiamente y comprenden células T auxiliares y células T citotóxicas, tales como células T citotóxicas.

5 El término "reducir" o "inhibir" se refiere en la presente memoria a la capacidad de producir una reducción, tal como una reducción de 20% o superior, más preferentemente de 50% o superior, y más preferentemente de 75% o superior.

10 Los protocolos de inmunización con ligando de Flt3 se refieren a la administración de ligando de Flt3 y ARN, mezclados conjunta o separadamente, opcionalmente en combinación con uno o más excipientes y otras moléculas y/o formulaciones acompañantes (tales como diluyentes, vehículos, excipientes y similares) en un organismo para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad o de una infección. El ligando de Flt3 y el ARN y cualesquiera otros constituyentes indicados en la presente memoria pueden administrarse en cualquier dosis, orden, frecuencia y disposiciones temporales. El experto en la materia apreciará que estos parámetros pueden ser alterados rutinariamente por el experto en la materia para optimizar un tratamiento.

15 Las composiciones farmacéuticas según la invención, que contienen vacunas de ARN, ligando de Flt3 o ambos, preferentemente se administran en preparaciones farmacéuticamente compatibles. Dichas preparaciones habitualmente pueden contener concentraciones farmacéuticamente compatibles de sales, tampones, conservantes, excipientes, sustancias suplementarias potenciadoras de la inmunidad, tales como adyuvantes (por ejemplo oligonucleótidos-CpG) y citoquinas, y opcionalmente sustancias terapéuticas activas.

20 Las composiciones farmacéuticas según la invención pueden administrarse mediante cualquier vía convencional, incluyendo mediante inyección o mediante infusión. La administración puede tener lugar, por ejemplo, por vía oral, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intracutánea, transdérmica, intralinfática, preferentemente mediante inyección en nódulos linfáticos, en particular nódulos linfáticos inguinales, vasos linfáticos y/o en el bazo.

25 El ARN y el ligando de Flt3 pueden administrarse separadamente, es decir, en diferentes composiciones, o en una composición común. En el caso de que se administren separadamente, la administración de ARN y ligando de Flt3 puede tener lugar simultáneamente o en tiempos diferentes, y el ARN y/o el ligando de Flt3 pueden administrarse repetidamente. En el caso de que la administración de ARN y ligando de Flt3 tenga lugar en diferentes tiempos, el intervalo de tiempo entre las administraciones o, en el caso de la administración repetida, entre las últimas administraciones de ARN o de ligando de Flt3 y la primera administración del constituyente respectivamente restante puede ser de 6 horas o más, de 12 horas o más, de 24 horas o más, de 2 días o más, de 3 días o más, de 5 días o más, de 7 días o más o de 9 días o más. Preferentemente, el intervalo de tiempo entre las administraciones no es superior a 24 horas, no es superior a 2 días, no es superior a 4 días, no es superior a 8 días o no es superior a 10 días. Preferentemente, el ligando de Flt3 se administra previamente a la administración del ARN. En el caso de que el ARN y el ligando de Flt3 se administren separadamente, el ARN preferentemente se administra intralinfáticamente, más preferentemente por vía intranodal, y el ligando de Flt3 preferentemente se administra por vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intracutánea o transdérmica, preferentemente por vía intraperitoneal o subcutánea.

30 Las composiciones según la invención se administran en cantidades efectivas. Una "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad que, sola o conjuntamente con dosis adicionales, consigue una reacción deseada o un efecto deseado. En el caso del tratamiento de una enfermedad particular o de un estado particular, la reacción deseada se refiere a la inhibición del proceso de la enfermedad. Lo anterior comprende enlentecer el avance de la enfermedad y en particular la interrupción del avance de la enfermedad. La reacción deseada en un tratamiento de una enfermedad o de un estado también puede retardar la aparición o prevenir la aparición de la enfermedad o del estado.

35 Una cantidad efectiva de una composición según la invención dependerá de la condición que debe tratarse, de la severidad de la enfermedad, de los parámetros individuales del paciente, incluyendo la edad, el estado fisiológico, la altura y el peso, la duración del tratamiento, el tipo de terapia concomitante (en caso de encontrarse presente), la vía específica de administración y factores similares.

40 Las composiciones farmacéuticas según la invención preferentemente son estériles y contienen una cantidad efectiva de la sustancia activa para producir la reacción deseada o el efecto deseado.

45 Las dosis de las composiciones según la invención que se administran pueden depender de diversos parámetros, tales como el modo de administración, la condición del paciente, el periodo deseado de administración, etc. En el caso de que una reacción del paciente resulte insuficiente a una dosis inicial, pueden utilizarse dosis más altas (o dosis efectivamente más altas, las cuales se consiguen mediante otra vía de administración más localizada).

50 Generalmente, para un tratamiento o para producir o incrementar una respuesta inmunológica, preferentemente se formulan y se administran dosis del ARN de entre 1 ng y 700 µg, de entre 1 ng y 500 µg, de entre 1 ng y 300 µg, de entre 1 ng y 200 µg, o de entre 1 ng y 100 µg.

55 Las composiciones farmacéuticas según la invención se administran generalmente en cantidades

farmacéuticamente compatibles y en composiciones farmacéuticamente compatibles. Dichas composiciones habitualmente pueden contener sales, tampones, conservantes, excipientes y opcionalmente sustancias terapéuticas activas. En el caso de que se utilicen médicamente, las sales deberían ser farmacéuticamente compatibles. Sin embargo, las sales que no son farmacéuticamente compatibles pueden utilizarse para la producción de sales farmacéuticamente compatibles de las mismas y se encuentran incluidas según la invención. Entre dichas sales farmacológica y farmacéuticamente compatibles se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, aquéllas producidas a partir de los ácidos siguientes: ácido hidroclórico, hidrobromico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, cítrico, fórmico, malónico, succínico y similares. Las sales farmacéuticamente compatibles también pueden producirse como sales de metales alcalinos o de metales alcalinotérreos, tales como sales de sodio, potasio o calcio.

Una composición farmacéutica según la invención puede comprender un excipiente farmacéuticamente compatible. La expresión "excipiente farmacéuticamente compatible" se refiere según la invención a uno o más rellenos, diluyentes o sustancias encapsuladoras sólidos o líquidos compatibles que resulten adecuadas para la administración en un ser humano. El término "excipiente" se refiere a un constituyente orgánico o inorgánico, natural o sintético, en el que se combina el constituyente activo, con el fin de facilitar la aplicación. Los constituyentes de la composición farmacéutica según la invención habitualmente son tales que no se produce ninguna interacción que perjudique sustancialmente la eficacia farmacéutica deseada.

Preferentemente, los excipientes son líquidos estériles, tales como agua o aceites, incluyendo aquellos derivados del petróleo, de animales o de plantas o que son de origen sintético, por ejemplo el aceite de cacahuete, el aceite de soja, el aceite mineral, el aceite de sésamo, el aceite de girasol y similares. Las soluciones salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y de glicerol también pueden utilizarse como excipientes acuosos.

Son ejemplos de excipientes, los derivados acrílicos y metacrílicos, el ácido algínico, derivados del ácido sórbico tales como el ácido  $\alpha$ -octadecil- $\omega$ -hidroxipoli(oxietilén)-5-sórbico, aminoácidos y derivados de los mismos, en compuestos amino particulares tales como colina, lecitina y fosfatidilcolina, goma arábica, sustancias aromáticas, ácido ascórbico, carbonatos tales como, por ejemplo, carbonatos e hidrogenocarbonatos de sodio, potasio, magnesio y calcio, hidrogenofosfatos y fosfatos de sodio, potasio, calcio y magnesio, carmelosa sódica, dimeticona, colorantes, saborizantes, tampones, conservantes, espesantes, plastificadores, gelatina, jarabes de glucosa, malta, sílice finamente dividido, hidromelosa, benzoatos, en particular benzoato sódico y potásico, macrogol, leche desnatada en polvo, óxido de magnesio, ácidos grasos y derivados de los mismos y sales tales como ácido esteárico y estearatos, en particular estearato de magnesio y de calcio, ésteres de ácidos grasos y monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos comestibles, ceras naturales y artificiales tales como cera de abeja, cera amarilla y cera de glicol montana; cloruros, en particular cloruro sódico, polividona, polietilenglicoles, polivinilpirrolidona, povidona, aceites tales como aceite de ricino, aceite de soja, aceite de coco, aceite de semilla de palma, azúcares y derivados de azúcares, en particular monosacáridos y disacáridos tales como glucosa, fructosa, manosa, galactosa, lactosa, maltosa, xilosa, sacarosa, dextrosa y celulosa y derivados de los mismos, shellac, almidón y derivados de almidón, en particular almidón de maíz, sebo, talco, dióxido de titanio, ácido tartárico, alcoholes de azúcares, tales como glicerol, manitol, sorbitol y xilitol y derivados de los mismos, glicol, etanol y mezclas de los mismos.

Preferentemente, las composiciones farmacéuticas pueden contener además agentes humectantes, emulsionantes y/o agentes tamponadores del pH.

En otra forma de realización, las composiciones farmacéuticas pueden contener un intensificador de la absorción. Estos intensificadores de la absorción pueden, si se desea, sustituir una cantidad equimolar del vehículo en la composición. Entre los ejemplos de dichos intensificadores de la absorción se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, eucaliptol, N,N-dietil-m-toluamida, alcoholes polioxialquilenos (tales como propilenglicol y polietilenglicol), N-metil-2-pirrolidona, miristato de isopropilo, dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilacetamida (DMA), urea, dietanolamina, trietanolamina y similares (ver, por ejemplo, Percutaneous Penetration Enhancers, editores Smith *et al.*, CRC Press, 1995). La cantidad del intensificador de la absorción en la composición puede depender de los efectos que se desea obtener.

Puede incorporarse un inhibidor de proteasa en la composición según la invención, en particular la composición que contiene ligando de Flt3, con el fin de evitar la degradación de un péptido o sustancia proteica activa y de esta manera incrementar la biodisponibilidad. Entre los ejemplos de inhibidores de proteasa se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, aprotinina, leupepsina, pepstatina,  $\alpha$ 2-macroglobulina e inhibidor de tripsina. Estos inhibidores pueden utilizarse solos o en combinación.

Las composiciones farmacéuticas según la invención pueden proporcionarse con uno o más recubrimientos. Preferentemente, las formas de dosificación oral sólidas se proporcionan con un recubrimiento entérico o se encuentran en forma de una cápsula entérica de gelatina blanda endurecida.

Las composiciones farmacéuticas según la invención pueden contener tampones adecuados, tales como ácido acético en una sal, ácido cítrico en una sal, ácido bórico en una sal y ácido fosfórico en una sal.

Las composiciones farmacéuticas también pueden contener opcionalmente conservantes adecuados, tales como cloruro de benzalconio, clorobutanol, parabenes y timerosal.

5 Las composiciones farmacéuticas habitualmente se suministran en una forma de dosificación uniforme y pueden producirse de una manera conocida *per se*. Las composiciones farmacéuticas según la invención pueden encontrarse, por ejemplo, en forma de cápsulas, tabletas, pastillas, soluciones, suspensiones, jarabes, elixires o en forma de emulsión.

10 Las composiciones que resultan adecuadas para la administración parenteral habitualmente comprenden una preparación acuosa o no acuosa estéril, que preferentemente es isotónica respecto a la sangre del receptor. Son vehículos y solventes compatibles, por ejemplo, la solución de Ringer y la solución isotónica de cloruro sódico. Además, habitualmente se utilizan aceites fijados estériles como medio de disolución o de suspensión.

15 La presente invención se explica en detalle con los ejemplos y dibujos siguientes, que se proporcionan exclusivamente a título explicativo y que no deben interpretarse como limitativos. Basándose en la descripción y en los ejemplos, el experto en la materia podrá acceder a formas de realización adicionales que no se aparten del alcance de la invención y del alcance según las reivindicaciones adjuntas.

20 **Breve descripción de los dibujos:**

Figura 1:

25 En ratones C57Bl/6 (n=3 a 9) se administraron 10 µg de Flt3L por vía intraperitoneal en diferentes tiempos (d1 a d3 o d1, d1, d3 o d0, d3). El día 10 se extirparon los nódulos linfáticos (NL) y el bazo y se determinó el recuento celular. Los datos mostrados representan el recuento celular medio + SEM de los nódulos linfáticos. \*: p<0,05 en la prueba de comparaciones múltiples de Tukey .

Figura 2:

30 En ratones C57Bl/6 (n=3) se administraron 10 µg de Flt3L dos veces (d0, d3) por vía intraperitoneal. El día 10, se extirparon los nódulos linfáticos inguinales, las células se tiñeron con los anticuerpos correspondientes y las subpoblaciones de las células dendríticas se cuantificaron mediante citometría de flujo. Los datos mostrados representan el recuento celular medio de la subpoblación + SEM. \*: p<0,05 y \*\*: p<0,001 en la prueba t no pareada de dos colas.

Figura 3:

35 En ratones C57Bl/6 anestesiados (n=5) se administraron dos veces (d0, d3) en cada caso 20 µg de ARN codificante de SIINFEKL en los nódulos linfáticos inguinales. Se administraron diversos adyuvantes en los ratones (MPLA d0 + d3, 20 µg s.c.; poli I:C d0 + d3, 20 µg s.c.; Aldara Creme d0 + d3, 5 µg por vía transcutánea; FEC-GM -d2, -d1, d1-d2, 5 µg s.c.; IL-2 (proleuquina) d1-d6, 80.000 IU s.c.; Flt3-L d-7 + d-4, 10 µg i.p.). El día 8 se extrajo sangre de los ratones y se cuantificó la frecuencia de linfocitos T específicos de epítipo mediante citometría de flujo tras la tinción con un tetrámero SIINKFEKL y anticuerpo anti-CD8. Los datos mostrados representan la frecuencia media de linfocitos T CD8+ positivos para tetrámero + SEM de 2 experimentos. \*: p<0,05 y \*\*: p<0,001 en la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

Figura 4:

50 En ratones C57Bl/6 (n=4) se administraron 10 µg de Flt3L o IgG4 humana dos veces (d0, d3) por vía intraperitoneal. Los días 7 y 10 los ratones anestesiados en cada ocasión recibieron la administración de 20 µg de ARN codificante de SIINFEKL en los nódulos linfáticos inguinales. El día 15, se extirparon el bazo y los nódulos linfáticos inguinales.

(a) Se cuantificó la frecuencia de los linfocitos T específicos de epítipo mediante citometría de flujo tras la tinción con un tetrámero SIINFEKL y anticuerpo anti-CD8. Los datos mostrados representan el número medio y la frecuencia media de linfocitos T CD8+ positivos para tetrámero + SEM.

(b) Para medir los linfocitos T específicos de SIINFEKL productores de IFN-γ, se incubaron células de bazo con péptido SIINFEKL o péptido de control durante 6 horas. Se añadió brefeldina A [10 µg/ml] tras 1,5 horas. Tras la fijación y la permeabilización, las muestras se tiñeron con anticuerpos anti-CD8 y anti-IFNγ. Los datos mostrados representan la frecuencia de linfocitos T CD8+ secretores de IFNγ específicos de SIINFEKL tras restar el fondo no específico + SEM. \*: p<0,05 en la prueba t no pareada de dos colas.

(c) Gráficos representativos de puntos. Los porcentajes mostrados indican la frecuencia respectiva de linfocitos T CD8+ positivos para tetrámero.



## Figura 5:

5 (a) En ratones Balb/c (n=5) se inyectaron por vía intranodal 10 µg de ARN marcado con fluoróforo Cy3 (rojo) o con ribonucleótido Cy3 puro (control). Se extirparon los nódulos linfáticos tras 5 y 30 minutos, se fijaron con paraformaldehído y se realizaron secciones. Mientras que los nódulos linfáticos de control mostraban un fondo mínimo, en los demás podía observarse una señal celular de ARN de claridad creciente entre los 5 y los 30 minutos. Lo anterior puede atribuirse a la destrucción del ARN intercelular.

10 (b) Se coincubaron CD inmaduras humanas (CDi) *in vitro* con ARN marcado con fluoróforo Cy3 (5 µg, rojo) y FITC-dextrano (1 µg/µl, verde) durante 10 minutos, se fijaron con paraformaldehído y se contratiñeron (Hoechst 33342, azul). La cinética temporal muestra, al igual que en la colocalización máxima con FITC-dextrano, que el ARN se localiza inicialmente en la periferia de la célula, después las vesículas pueden observarse en todo el citoplasma y finalmente se fusionan formando estructuras de mayor tamaño.

## 15 Figura 6:

(a) Se coincubaron CDi (n=3) humanas *in vitro* a diversas temperaturas con ARN de luciferasa (20 µg) durante 15 minutos. Tras 24 horas, se cuantificó la señal de luciferasa en un ensayo de luminiscencia estándar. El resultado indica un proceso activo consumidor de energía.

20 (b-c) Se pretrataron CDi humanas con diversos inhibidores (dimetil-amilorida, citocalasina D, LY294002, rotlerina) y después se coincubaron durante 15 minutos con ARN de luciferasa o ARN de Cy3. Tras 24 horas, se cuantificó la señal de luciferasa en un ensayo estándar de luminiscencia. Se encontró que con el inhibidor altamente específico de macropinocitosis rotlerina se producía la inhibición de la incorporación del ARN en más del 90%.

25 (d) Los nódulos linfáticos inguinales de ratones C57Bl/6 se pretrataron *in vivo* con rotlerina (10 µl [10 µM]) y después se inyectó por vía intranodal ARN de luciferasa (10 µg). Tras la inhibición *in vivo* de la macropinocitosis, se redujo drásticamente la incorporación del ARN en los nódulos linfáticos.

30 (e) Se inmunizaron intranodalmente ratones C57Bl/6 (n=3) en d0 y en d3 con ARN codificante de SIINFEKL (20 µg). En ambos días se pretrataron los nódulos linfáticos con rotlerina tal como se ha indicado anteriormente. El día 8 se cuantificó el éxito de la inmunización mediante medición del tetrámero en la sangre periférica. El éxito de la inmunización intranodal con ARN se correlacionaba directamente con la capacidad de las células de incorporar ARN mediante macropinocitosis. \*, P<0,05; \*\*, P<0,01; \*\*\*, P<0,001 (ANOVA con prueba de comparaciones múltiples de Tukey).

## 35 Figura 7:

40 (a-d) Se maduraron CD humanas (a, c) y murinas (b, d) durante 40 horas con diversos agentes (poli I:C (50 µg/ml), CD40L (1,0 µg/ml), LPS (20 ng/ml), Mat. Mix (TNF-α) (10 ng/ml), IL1b (10 ng/ml), PGE (1 µg/ml), IL6 (1.000 U/ml)). Después, las células se coincubaron durante 15 minutos con ARN de luciferasa o ARN de Cy3. Tras 24 horas, se cuantificó la señal de luciferasa en un ensayo de luminiscencia estándar. Para cuantificar la incorporación del ARN de Cy3, las células se lavaron y se fijaron 30 minutos después de la incubación con el ARN. A continuación, la fluorescencia mediada por Cy3 pudo cuantificarse en el microscopio de inmunofluorescencia (software Till Vision 4.0, Till Photonics). Tras la maduración de las CDi, se redujo la incorporación del ARN en más del 90%.

45 (e) Efecto de poli I:C sobre la incorporación de ARN. En ratones C57Bl/6 (n=4) se inyectó s.c. PBS o poli I:C (20 µg) y tras 2 o 24 horas, se aplicó intranodalmente ARN de luciferasa. Tras 24 horas, la señal de luciferasa se cuantificó en un ensayo de bioluminiscencia estándar. Se produjo una reducción drástica de la incorporación de ARN, dependiente del intervalo de tiempo después de la administración de adyuvante. \*, P<0,05; \*\*, P<0,01; \*\*\*, P<0,001 (ANOVA con prueba de comparaciones múltiples de Tukey).

50 (f) Efecto de Flt3-L sobre la incorporación del ARN. Se trataron ratones C57Bl/6 (n=8) i.p. los días 0 y 3 con 10 µg de Flt3-L, o no se trataron en el grupo de control. El día 10, los ratones recibieron la inyección intranodal de 20 µg de ARN de luciferasa. Tras 24 horas se midió la señal de luciferasa mediante bioluminiscencia *in vivo*. La administración de Flt3-L no presentó un efecto inhibitorio de la incorporación de ARN en los nódulos linfáticos.

## 55 Figura 8:

60 En ratones C57Bl/6 (n=5) se inyectaron por vía intraperitoneal el día 0 Flt3L-IgG4, Flt3L (Humanzyme), Flt3L (Peprotech) o IgG4 humana en una cantidad de 0,4 moles. El día 10 se extirparon los nódulos linfáticos de los ratones y se caracterizaron mediante citometría de flujo. Células dendríticas (CD (marcador: CD11c<sup>+</sup>/NK1.1<sup>-</sup>), células T auxiliares CD4<sup>+</sup> (marcador: CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup>/NK1.1<sup>-</sup>), células T CD8<sup>+</sup> (marcador: CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup>/NK1.1<sup>-</sup>), células B CD19<sup>+</sup> (marcador: CD19<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>/NK1.1<sup>-</sup>).

Figura 9:

En ratones C57Bl/6 no expuestos (n=7) se inyectaron por vía intraperitoneal el día 0, +3 Flt3L (Flt3L-IgG4, Flt3L (Humanzyme), Flt3L (Preprotech)) o IgG4 humana en una cantidad de 0,4 moles. Estos ratones se inmunizaron intralinfáticamente el día +7, +10 con 20 µg de ARN codificante de SIINFEKL. El grupo de control siguió sin tratar (n=2). El día +15 se midió la frecuencia de linfocitos T CD8+ específicos de antígeno en sangre periférica mediante la medición de los multímeros de CMH.

Figura 10: cinética temporal de Flt3L-IgG4 en suero de ratones.

(a) Se administraron por vía i.p. en ratones Balb/c (n=3) 20 µg de Flt3L-IgG4. En tiempos definidos (previamente a la administración, 3 h, 24 h, 48 h, 3 d, 5 d, 7 d, 9 d, 14 d, 21 d) se conservaron muestras de suero de los ratones. Estas muestras se utilizaron en un ensayo ELISA para cuantificar la IgG humana. La vida media era de 2,14 días (=51 horas).

(b) En ratones Balb/c (n=3) se administraron i.p. 50 µg de Flt3L-IgG4. En tiempos definidos (previamente a la administración, 3 h, 24 h, 48 h, 3 d, 5 d, 7 d, 9 d, 14 d, 21 d) se conservaron muestras de suero de los ratones. Estas muestras se utilizaron en un ensayo ELISA para cuantificar la IgG humana. La vida media era de 1,667 días (=40 horas).

Figura 11: vacunación terapéutica contra tumores B16 Ova.

Para examinar la sinergia de combinar la administración de Flt3L con la vacunación con ARN, se llevó a cabo un experimento tumoral terapéutico. Con este fin, se formaron 4 grupos (n=10) de ratones C57Bl/6. Todos los ratones recibieron el día 0 una inyección s.c. de células B16 Ova (2x10<sup>5</sup>). De ellos un grupo de control sólo se trató mediante inyección de IgG4 (10 µg; d3, d7, d14, d17). Un segundo grupo de control recibió únicamente inyecciones de Flt3L-IgG4 (15 µg; d3, d7, d14, d17). El primer grupo de terapia se trató mediante inyección intranodal de ARN codificante de SIINFEKL (20 µg; d11, d14, d17, d24) en combinación con la administración de IgG4 y el segundo grupo de terapia recibió Flt3L-IgG4 tal como se ha indicado anteriormente para la inmunización con ARN. Se muestra el gráfico de Kaplan-Meier de la tasa de supervivencia de los ratones. Los ratones fueron sacrificados en el caso de que presentasen un diámetro tumoral >1,5 cm en un eje.

Figura 12: vacunación terapéutica contra los tumores B16 Ova.

Examen del crecimiento tumoral. Con este fin, se formaron cuatro grupos (n=10) de ratones C57Bl/6. Todos los ratones recibieron el día 0 una inyección s.c. de células tumorales B16 Ova (2x10<sup>5</sup>). De entre ellos un grupo de control se trató únicamente con una inyección de IgG4 (15 µg; d3, d7, d14, d18). Un segundo grupo de control recibió únicamente inyecciones de Flt3L-IgG4 (15 µg; d3, d7, d14, d18). El primer grupo de terapia se trató mediante inyección intranodal de ARN codificante de SIINFEKL (20 µg; d10, d14, d18, d21) en combinación con la administración de IgG4 y el segundo grupo de terapia recibió Flt3L-IgG4 tal como se ha indicado anteriormente para la inmunización con ARN. Se determinó el volumen tumoral tras la inoculación de tumor de modo regular (d7, d10, d13, d16, d19, d22). Se muestra el volumen tumoral medio [mm<sup>3</sup>] los días después de la inoculación tumoral [día].

## Ejemplos

### Ejemplo 1

El ligando de Flt3 humano recombinante utilizado en el presente ejemplo y en los ejemplos siguientes se prepararon en forma de una proteína de fusión con IgG4 y presentaba la secuencia mostrada en SEC ID n° 6. Con este fin, la secuencia de ácidos nucleicos codificante para la proteína de fusión Flt3L-IgG4 se clonó en un vector de expresión. El plásmido resultante se transfectó en células HEK293 (ATCC n° CRL-1573) mediante lipofección. Se recogió el sobrenadante y se purificó por una columna de proteína A (Ge HiTrap MabSelect SuRe, GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto se dializó frente a PBS, se dividió en alícuotas y se congeló hasta la utilización.

Para someter a ensayo los efectos de la aplicación de ligando de Flt3 humano sobre la eficiencia de las inmunizaciones basadas en ARN, en primer lugar se investigaron en el modelo de ratón los cambios en la composición celular de nódulos linfáticos y bazo. Para ello, se aplicaron intraperitonealmente diversos esquemas de aplicación (2x, 3x, 5x 10 µg) de Flt3-L recombinante y se determinó la celularidad 10 a 12 días después de la primera inyección. Tal como se describe en la literatura para el sistema de ratón, los presentes inventores pudieron demostrar (figura 1) que se producía un incremento de la celularidad en el bazo y en los nódulos linfáticos (Lyman S.D. *et al.*, Blood 83:2795-2801, 1994; Hannum C. *et al.*, Nature 368:643-648, 1994; Maraskovsky E. *et al.*, Journal of Experimental Medicine 184:1953-1962, 1996). Además, la aplicación de Flt3-L a diversas dosis condujo a un incremento en las células dendríticas (Maraskovsky E. *et al.*, Journal of Experimental Medicine 184:1953-1962, 1996; McNeel D.G. *et al.*, Journal of Clinical Immunology 23:62-72, 2003; Freedman R.S. *et al.*, Clinical Cancer

Research 9:5228-5237, 2003; Maraskovsky E. *et al.*, Blood 96:878-884, 2000). Este incremento pudo demostrarse para todas las subpoblaciones relevantes de células dendríticas en el bazo y en los nódulos linfáticos (figura 2).

### Ejemplo 2

5 A continuación, los presentes inventores investigaron los efectos de diversos adyuvantes conocidos (Aldara, monofosforil-lípido A, FEC-GM, poli I:C, IL2) y Flt3-L sobre la sensibilización de células T no expuestas y su frecuencia en la sangre periférica tras la inmunización intranodal con ARN. Con este fin se aplicaron los adyuvantes s.c. o i.p. (ver la leyenda de la figura 3 para más detalles) y los ratones se inmunizaron dos veces, con un intervalo de 3 días, con un ARN codificante del epítipo SIINFEKL restringido a H-2Kb. Cinco días después de la segunda inmunización se cuantificó la frecuencia de las células T CD8+ específicas de epítipo mediante medición de tetrámero en la sangre. Inesperadamente, el análisis mostró que todos los adyuvantes excepto Flt3-L condujeron a una reducción de la eficiencia de sensibilización de las células T (figura 3). Para la utilización de adyuvantes en el contexto de la aplicación de ARN-TIV, hasta el momento sólo se ha publicado la referencia anteriormente indicada, en la que se demostró que sólo la administración de FEC-GM tras la inyección intradérmica de ARN, en contraste con la administración previa, ofrece una ventaja sobre la inyección de ARN únicamente (Carralot J.P. *et al.*, Cell Mol. Life Sci. 61:2418-2424, 2004). Estos datos concuerdan con los experimentos de los presentes inventores, en los que se aplicó FEC-GM antes de la inmunización con ARN (-48 h, -24 h). Además, los datos de los presentes inventores demuestran por primera vez que los adyuvantes establecidos tienden a conducir a una reducción de la eficiencia de sensibilización de las células T, mientras que Flt3-L induce un incremento significativo (figura 3). Los análisis de tetrámero adicionales de sangre periférica 7 días después de la última inmunización mostraron resultados similares (datos no mostrados).

### Ejemplo 3

25 En experimentos adicionales, los presentes inventores pudieron demostrar que la administración de Flt3-L humano también conducía a un incremento significativo de la frecuencia de células T funcionales específicas de antígeno tras la inmunización intranodal de ARN en otros órganos (bazo). Para ello, en los ratones se inyectaron por vía intraperitoneal los días 0 y 3 en cada caso 10 µg de Flt3-L o IgG4 humano. A continuación, se llevó a cabo la inmunización intranodal con ARN codificante de SIINFEKL los días 7 y 10. El día 15 se cuantificó la frecuencia de células T CD8+ codificantes de SIINFEKL mediante medición de tetrámero y al determinación de las citoquinas intracelulares (figura 4). La cuantificación de tetrámero mostró una frecuencia significativamente incrementada de células T CD8+ específicas de epítipo en el grupo pretratado con Flt3-L (bazo: 8,2% frente a 2,5%). En el nivel funcional, se demostró que estas células también podían secretar IFN $\gamma$  (figura 4). Unas investigaciones posteriores demostraron que los incrementos de la dosis de Flt3-L a niveles superiores a la dosis de 2x10 µg no se encontraban correlacionados con un refuerzo adicional de la respuesta inmunológica (datos no mostrados).

### Ejemplo 4

40 En ratones Balb/c (n=5) se inyectaron intranodalmente 10 µg de ARN marcado con fluoróforo Cy3 o con Cy3-ribonucleótido puro (control). Tras 5 o 30 minutos, se extirparon los nódulos linfáticos y se evaluaron secciones criostáticas mediante microscopía de inmunofluorescencia tras la fijación con paraformaldehído. Las secciones representativas mostradas en la figura 5 muestran un nivel de fondo mínimo en los nódulos linfáticos de control y una señal de ARN celular (rojo) que gana en claridad entre los 5 y los 30 minutos. Lo anterior puede atribuirse a la destrucción del ARN intercelular.

Además, las CD inmaduras humanas se coincubaron *in vitro* con ARN marcado con fluoróforo Cy3 (5 µg, rojo) y FITC-dextrano (1 µg/µl, verde) durante 10 minutos, se fijaron con paraformaldehído y se contratiñeron (Hoechst 33342, azul). La cinética temporal muestra, tal como en la colocalización máxima con FITC-dextrano, el ARN se localizaba inicialmente en la periferia de la célula, posteriormente las vesículas podían observarse en todo el citoplasma y finalmente se fusionaron formando estructuras de mayor tamaño.

Por lo tanto, se demostró que el ARN desnudo se incorpora en células tanto *in vitro* como *in vivo*.

### Ejemplo 5

Se investigó en mayor detalle el fenómeno de la falta de acción adyuvante de algunos adyuvantes conocidos.

60 Los presentes inventores encontraron que el ARN desnudo (es decir, disuelto en líquido, por ejemplo PBS) tras la inyección en, por ejemplo, nódulos linfáticos es incorporado casi exclusivamente por las células dendríticas. La incorporación es extraordinariamente eficiente. A continuación el ARN incorporado es traducido.

Para una caracterización más detallada del proceso de incorporación para el ARN desnudo, se coincubaron CDi humanas (n=3) *in vitro* a diversas temperaturas con ARN de luciferasa (20 µg) durante 15 minutos. Tras el cultivo a 37°C durante 22 horas adicionales, se cuantificó la incorporación del ARN en un ensayo de luciferasa. Se muestra la media + SEM. El resultado mostrado en la figura 6(a) indica un proceso activo consumidor de energía.

Para verificar si la macropinocitosis constitutivamente activa en las CDi resulta relevante para la incorporación del ARN desnudo, se pretrataron CDi humanas con diversos inhibidores (dimetil-amilorida, citocalasina D, LY294002, rotlerinina) y después se coincubaron durante 15 minutos con ARN de luciferasa o ARN de Cy3. Tras el cultivo durante 22 horas adicionales. Se cuantificó la incorporación del ARN en un ensayo de luciferasa. Se muestra la media + SEM. Las CDi coincubadas con ARN de Cy3 (rojo) se fijaron con paraformaldehído y se contratiñeron (Hoechst 33342, azul). Se encontró que con el inhibidor de macropinocitosis altamente específico rotlerinina, se producía la inhibición de la incorporación del ARN en más de un 90%; ver la figura 6(b-c).

Para clarificar si la macropinocitosis también es el mecanismo de incorporación relevante *in vivo* para el ARN en el nódulo linfático, los nódulos linfáticos inguinales de ratones C57/Bl6 se pretrataron con rotlerinina (n=4, 10  $\mu$ M) y después se inyectó intranodalmente ARN de luciferasa (10  $\mu$ g). Tras 24 horas, se midió la señal *in vivo* de bioluminiscencia. Se muestra la media + SEM en la figura 6(d). Los presentes inventores pudieron demostrar que tras la inhibición *in vivo* de la macropinocitosis, se reducía drásticamente la incorporación de ARN en el nódulo linfático.

Para verificar si la inhibición *in vivo* de la macropinocitosis presentaba un efecto sobre la eficiencia de sensibilización de las células T tras la inmunización intranodal con ARN, se inmunizaron ratones C57/Bl6 (n=3) intranodalmente los días d0 y d3 con ARN codificante de SIINFEKL (20  $\mu$ g). En ambos días los nódulos linfáticos se pretrataron con rotlerinina tal como se ha indicado anteriormente. Se muestra la media + SEM de la frecuencia de linfocitos T CD8+ específicos de antígeno. Los presentes inventores pudieron demostrar que el éxito de la inmunización intranodal con ARN se correlacionaba directamente con la capacidad de las células de incorporar ARN mediante macropinocitosis; ver la figura 6(e).

El mecanismo principal de incorporación del ARN es la macropinocitosis. La inhibición de la macropinocitosis, por ejemplo por productos químicos que inhiben la macropinocitosis (por ejemplo la rotlerinina), conduce a una pérdida prácticamente completa de la acción de la vacuna.

### Ejemplo 6

A continuación, los presentes inventores investigaron en qué grado la maduración de las CDi, que se relaciona con una regulación negativa de la macropinocitosis, conduce a una reducción de la incorporación del ARN. Se muestran los resultados en la figura 7.

Los presentes inventores maduraron CD humanas (figura 7(a, c)) y murinas (figura 7(b, d)) con diversos agentes (poli I:C (50  $\mu$ g/ml), CD40L (1,0  $\mu$ g/ml), LPS (20 ng/ml), Mat. Mix (TNF $\alpha$  (10 ng/ml)), IL1b (10 ng/ml), PGE (1  $\mu$ g/ml), IL6 (1.000 U/ml)) durante 40 horas. A continuación, las células se coincubaron durante 15 minutos con ARN de luciferasa o ARN de Cy3. Tras el cultivo durante 22 horas adicionales, se cuantificó la incorporación del ARN en un ensayo de luciferasa. Se muestra la media + SEM. Las CDi coincubadas con ARN de Cy3 (rojo) se fijaron con paraformaldehído y se contratiñeron (Hoechst 33342, azul). Se encontró que, tanto en la cuantificación de la fluorescencia de Cy3 como en el ensayo de luciferasa, tras la maduración de las CDi, la incorporación del ARN se reducía en más del 90%. Estos datos concuerdan con los datos publicados, que demuestran que la maduración de las CD conducen a la regulación negativa de la macropinocitosis.

Con el fin de verificar en qué grado los adyuvantes en maduración también pueden conducir *in vivo* a una reducción de la incorporación del ARN, los presentes inventores sometieron a ensayo el efecto de poli I:C sobre la incorporación del ARN; ver la figura 7(e). Para ello, en ratones C57/Bl6 (n=4) se inyectó s.c. PBS o poli I:C (20  $\mu$ g) y tras 2 o 24 horas, se aplicó intranodalmente ARN de luciferasa. Se midió la bioluminiscencia *in vivo* tras 24 horas adicionales. Se muestra la media + SEM. Se demostró que se producía una reducción acusada de la incorporación de ARN, dependiendo del intervalo de tiempo posterior a la administración del adyuvante. Estos datos concuerdan con la observación de que la maduración completa de las CD requiere aproximadamente 24 horas.

En contraste, la administración de Flt3-L no presenta un efecto inhibitor sobre la incorporación de ARN en los nódulos linfáticos. Se trataron los ratones C57BL/6 (n=8) i.p. los días 0 y 3 con 10  $\mu$ g de Flt3-L o no se trataron, en el grupo de control. El día 10, los ratones recibieron una inyección intranodal de 20  $\mu$ g de ARN de luciferasa. Tras 24 horas, se midió la señal de luciferasa mediante bioluminiscencia *in vivo*. El gráfico en la figura 7(f) muestra los resultados medidos para cada ratón individual. Las columnas proporcionan el valor medio de todos los valores medidos para un grupo. El experimento es representativo para 3 experimentos independientes. Estadísticas: prueba t de Student.

Además, en ratones C57Bl/6 (n=3 a 7) se administró Flt3L dos veces (días 0 y 3, 10  $\mu$ g cada vez). El día 10, se extrajeron los nódulos linfáticos y se determinó mediante citometría de flujo el estado de activación (CD86, CD80, MHC-II, CD40) de las células dendríticas. Los presentes inventores pudieron demostrar que la administración de Flt3L no conducía a la maduración de las células dendríticas en el nódulo linfático.

**Ejemplo 7: Efectos de diferentes Flt3L sobre la composición celular en los nódulos linfáticos**

En el presente experimento se comparó el ligando de Flt3 (Flt3-IgG4) con preparaciones de Flt3 disponibles comercialmente con respecto al efecto sobre diferentes poblaciones celulares del nódulo linfático murino. Un producto expresado recombinantemente en bacterias (Flt3LP de Preprotech; Preprotech, Hamburg, Alemania) y un producto expresado en células HEK293 humanas (Flt3L de Humanzyme; Humanzyme, Chicago, IL, U.S.A.) se utilizaron como preparaciones de Flt3 disponibles comercialmente. La IgG4 humana (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Alemania) sirvió como control.

En ratones C57Bl/6 (n=5) se inyectaron intraperitonealmente el día 0, Flt3L-IgG4, Flt3L (Humanzyme), Flt3L (Preprotech) o IgG4 humana (Sigma-Aldrich) en una cantidad de 0,4 moles. El día 10, se extirparon ambos nódulos linfáticos inguinales de los ratones, se determinó el recuento celular mediante una cámara de Neubauer y se caracterizaron las poblaciones celulares mediante citometría de flujo.

Las diferentes poblaciones celulares se definieron mediante las combinaciones de marcadores siguientes: células dendríticas (CD (marcador: CD11c<sup>+</sup>/NK1.1<sup>-</sup>), células T auxiliares CD4<sup>+</sup> (marcador: CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup>/NK1.1<sup>-</sup>), células T CD8<sup>+</sup> (marcador: CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup>/NK1.1<sup>-</sup>), células B CD19<sup>+</sup> (marcador: CD19<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>/NK1.1<sup>-</sup>). Los anticuerpos para detectar los marcadores de superficie se obtuvieron de Becton Dickinson. La figura 8 muestra la frecuencia de células dendríticas (todas las CD), células CD4-positivas, CD8-positivas y CD19-positivas, en relación al número total de células preparado a partir del nódulo linfático.

Se demostró que los efectos inducidos por Flt3L-IgG4 eran similares a los inducidos con los productos de Flt3L disponibles comercialmente. Flt3L-IgG4 y Flt3L de Humanzyme presentaban una fuerte similitud con respecto a la expansión de las células dendríticas, mientras que Preprotech Flt3L sólo era ligeramente potente en este aspecto. Flt3L-IgG4 tendía a ser más fuerte con respecto a sus efectos sobre la expansión de las poblaciones de linfocitos.

**Ejemplo 8: Efectos de diferentes Flt3L sobre la estimulación de las células T no expuestas**

En el presente experimento se investigó en qué grado la función adyuvante de Flt3L-IgG4 era equivalente a la de los productos de Flt3L disponibles comercialmente. Con este fin, se utilizó un producto expresado recombinantemente en bacterias (Flt3L de Preprotech) y un producto expresado en células HEK293 humanas (Flt3L de Humanzyme); ver el Ejemplo 7. La IgG4 humana sirvió de control.

En ratones C57Bl/6 no expuestas (n=7) se inyectaron intraperitonealmente el día 0, +3 Flt3L (Flt3L-IgG4 o Flt3L (Humanzyme) o Flt3L (Preprotech) o IgG4 humana (Sigma) en una cantidad de 0,4 moles. Estos ratones se inmunizaron intralinfáticamente el día +7, +10 con 20 µg de ARN codificante de SIINFEKL. El grupo de control siguió sin tratar (n=2). El día +15 se midió la frecuencia de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos de antígeno mediante citometría de flujo en sangre periférica por medio de la medición de multímeros de CMH (Beckman Coulter).

En los ratones se administró peritonealmente Flt3L en cantidades equimolares (día 0, +3). Además, los ratones se inmunizaron intranodalmente dos veces con ARN codificante de SIINFEKL (+7, +10). Se cuantificó el éxito de la inmunización mediante citometría de flujo el día +15 mediante tinción de tetrámeros.

Se demostró que Flt3L-IgG4, así como los productos de Flt3L disponibles comercialmente, presentaban un efecto adyuvante significativo. El grupo de control, que no había sido inmunizado, no mostró ninguna frecuencia relevante de células T positivas para tetrámeros. En comparación con los ratones que habían sido inmunizados sin aplicación de FltL, la frecuencia de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos de antígeno se incrementó en un factor de 2-3. La utilización de Flt3L-IgG4 tendía a proporcionar el efecto más fuerte (figura 9).

**Ejemplo 9: Determinación de la vida media de Flt3L-IgG4 en suero**

Para determinar la vida media de Flt3L-IgG4 en suero, en dos grupos de ratones Balb/c (n=3) se administraron 20 µg y 50 µg, respectivamente, de Flt3L-IgG4. Se conservaron muestras de suero obtenidas de los ratones, en tiempos definidos (previamente a la administración, 3 h, 24 h, 48 h, 3 d, 5 d, 7 d, 9 d, 14 d, 21 d). Se cuantificó la IgG humana en estas muestras mediante un ensayo ELISA. Debido a que la IgG4 humana se encuentra fusionada con Flt3L en este constructo, la concentración de Flt3L puede determinarse a partir de la cuantificación de la IgG humana en el suero de los ratones. Los datos demuestran que, tras un máximo inicial, Flt3L resulta detectable tras la inyección en suero de ratones durante hasta 5 días. La vida media calculada para 50 µg de Flt3L-IgG4 era de 40 horas; la vida media (VM) para 20 µg era de 51 horas.

En vista del valor publicado de vida media de Flt3L, de 5 horas (Robinson *et al.*, BMT 31:361-369, 2003), estos valores demuestran una estabilidad incrementada de Flt3L-IgG4 en comparación con Flt3L sin fusión de IgG4 (figura 10).

**Ejemplo 10: Vacunación terapéutica contra los tumores B16 Ova**

5 Para investigar la sinergia de la combinación de la administración de Flt3L con la vacunación con ARN, se llevó a cabo un experimento tumoral terapéutico. Con este fin, se formaron cuatro grupos (n=10) de ratones C57Bl/6. Todos los ratones recibieron el día 0 una inyección s.c. de  $2 \times 10^5$  células tumorales B16 Ova (Bellone *et al.*, J. Immunol. 165:2651-2656, 2000). De entre ellos, un grupo de control se trató únicamente con la inyección de IgG4 (10 µg; d3, d7, d14, d17). Un segundo grupo de control recibió únicamente la inyección de Flt3L-IgG4 (15 µg; d3, d7, d14, d17). El primer grupo de terapia se trató mediante la inyección intranodal de ARN codificante de SIINFEKL (20 µg; d11, d14, d17, d24) en combinación con la administración de IgG4 y el segundo grupo de terapia recibió Flt3L-IgG4 tal como se ha indicado anteriormente para la inmunización con ARN.

15 Se demostró que la combinación de Flt3L-IgG4 y la vacunación intranodal con ARN presentaba un efecto sinérgico. Aunque en el caso de la vacunación con ARN sin Flt3L-IgG4 únicamente 1/3 de los ratones sobrevivieron a largo plazo, la combinación con Flt3L-IgG4 pudo incrementar la proporción de ratones que sobrevivieron a largo plazo hasta aproximadamente el 80%. Flt3L-IgG4 sin vacunación de ARN demostró un efecto terapéutico mínimo sobre el crecimiento tumoral, que sin embargo sólo resultó en una supervivencia a largo plazo de 10% de los animales (figura 11).

**20 Ejemplo 11: Vacunación terapéutica contra tumores B16 Ova**

Para confirmar el efecto sinérgico de una administración combinada de Flt3L y una vacuna de ARN, se llevó a cabo un experimento tumoral terapéutico adicional. Con este fin, se formaron cuatro grupos (n=10) de ratones C57Bl/6. Todos los ratones recibieron el día 0 una inyección s.c. de  $2 \times 10^5$  células tumorales B16 Ova (Bellone *et al.*, J. Immunol. 165:2651-2656, 2000). De entre ellos, un grupo de control sólo se trató mediante la inyección de IgG4 (15 µg; d3, d7, d14, d18). Un segundo grupo de control sólo recibió una inyección de Flt3L-IgG4 (15 µg; d3, d7, d14, d18). Un primer grupo de terapia se trató mediante la inyección intranodal de ARN codificante de SIINFEKL (20 µg; d10, d14, d18 y d21) en combinación con la administración de IgG4 y el segundo grupo de terapia recibió Flt3L-IgG4 (Flt3L) para la inmunización con ARN tal como se ha indicado anteriormente. Se determinó el volumen tumoral los días siguientes posteriores a la inoculación tumoral: d7, d10, d13, d16, d19 y d22 (d=día).

35 Se demostró que la combinación de Flt3L-IgG4, conjuntamente con una vacunación intranodal de ARN, presentaba un efecto sinérgico. Sólo se determinó un ligero retardo del crecimiento tumoral en el caso de que se administrase únicamente Flt3L y también en el caso de vacunación de ARN únicamente se observó un crecimiento tumoral progresivo que, sin embargo, se había decelerado. Una suspensión completa del crecimiento tumoral sólo se observó en el caso de que la administración de Flt3L se combinase con la vacunación de ARN (figura 12).

**Listado de secuencias**

- 5 <110> BioNTech AG, Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- <120> Utilización de ligando de Flt3 para reforzar las respuestas inmunológicas en la inmunización con ARN
- <130> 410-9 PCT
- 10 <150> DE 10 2008 061 522.6
- <151> 2008-12-10
- <160> 6
- 15 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 235
- <212> PRT
- 20 <213> Homo sapiens
- <400> 1

```

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

Leu Leu Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Gly Thr Gln Asp Cys Ser Phe
 20          25          30

Gln His Ser Pro Ile Ser Ser Asp Phe Ala Val Lys Ile Arg Glu Leu
 35          40          45

Ser Asp Tyr Leu Leu Gln Asp Tyr Pro Val Thr Val Ala Ser Asn Leu
 50          55          60

Gln Asp Glu Glu Leu Cys Gly Gly Leu Trp Arg Leu Val Leu Ala Gln
 65          70          75          80

Arg Trp Met Gln Arg Leu Lys Thr Val Ala Gly Ser Lys Met Gln Gly
 85          90          95

Leu Leu Glu Arg Val Asn Thr Glu Ile His Phe Val Thr Lys Cys Ala
 100         105         110

Phe Gln Pro Pro Pro Ser Cys Leu Arg Phe Val Gln Thr Asn Ile Ser
 115         120         125

Arg Leu Leu Gln Glu Thr Ser Glu Gln Leu Val Ala Leu Lys Pro Trp
 130         135         140

Ile Thr Arg Gln Asn Phe Ser Arg Cys Leu Glu Leu Gln Cys Gln Pro
 145         150         155         160

Asp Ser Ser Thr Leu Pro Pro Pro Trp Ser Pro Arg Pro Leu Glu Ala
 165         170         175

Thr Ala Pro Thr Ala Pro Gln Pro Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu

```

ES 2 407 994 T3

180 185 190

Pro Val Gly<sub>195</sub> Leu Leu Leu Leu Ala<sub>200</sub> Ala Ala Trp Cys Leu<sub>205</sub> His Trp Gln

Arg Thr<sub>210</sub> Arg Arg Arg Thr Pro<sub>215</sub> Arg Pro Gly Glu Gln<sub>220</sub> Val Pro Pro Val

Pro Ser<sub>225</sub> Pro Gln Asp Leu<sub>230</sub> Leu Leu Val Glu His<sub>235</sub>

<210> 2  
 <211> 232  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

5

<400> 2

Met Thr Val Leu Ala<sub>5</sub> Pro Ala Trp Ser Pro<sub>10</sub> Asn Ser Ser Leu Leu Leu<sub>15</sub>

Leu Leu Leu Leu<sub>20</sub> Leu Ser Pro Cys Leu<sub>25</sub> Arg Gly Thr Pro Asp<sub>30</sub> Cys Tyr

Phe Ser His<sub>35</sub> Ser Pro Ile Ser Ser<sub>40</sub> Asn Phe Lys Val Lys<sub>45</sub> Phe Arg Glu

Leu Thr<sub>50</sub> Asp His Leu Leu Lys<sub>55</sub> Asp Tyr Pro Val Thr<sub>60</sub> Val Ala Val Asn

Leu Gln Asp Glu Lys His<sub>70</sub> Cys Lys Ala Leu Trp<sub>75</sub> Ser Leu Phe Leu Ala<sub>80</sub>

Gln Arg Trp Ile Glu<sub>85</sub> Gln Leu Lys Thr Val<sub>90</sub> Ala Gly Ser Lys Met<sub>95</sub> Gln

Thr Leu Leu Glu<sub>100</sub> Asp Val Asn Thr Glu<sub>105</sub> Ile His Phe Val Thr<sub>110</sub> Ser Cys

Thr Phe Gln<sub>115</sub> Pro Leu Pro Glu Cys<sub>120</sub> Leu Arg Phe Val Gln<sub>125</sub> Thr Asn Ile

Ser His<sub>130</sub> Leu Leu Lys Asp Thr<sub>135</sub> Cys Thr Gln Leu Leu<sub>140</sub> Gly Leu Lys Pro

Cys Ile Gly Lys Ala Cys<sub>150</sub> Gln Asn Phe Ser Arg<sub>155</sub> Cys Leu Glu Val Gln<sub>160</sub>

Cys Gln Pro Asp Ser<sub>165</sub> Ser Thr Leu Leu Pro<sub>170</sub> Pro Arg Ser Pro Ile<sub>175</sub> Ala

10 Leu Glu Ala Thr<sub>180</sub> Glu Leu Pro Glu Pro<sub>185</sub> Arg Pro Arg Gln Leu<sub>190</sub> Leu Leu  
 Leu Leu Leu<sub>195</sub> Leu Leu Pro Leu Thr Leu Val Leu Leu Ala<sub>205</sub> Ala Ala

Trp Gly<sub>210</sub> Leu Arg Trp Gln Arg<sub>215</sub> Ala Arg Arg Arg Gly<sub>220</sub> Glu Leu His Pro

Gly Val<sub>225</sub> Pro Leu Pro Ser<sub>230</sub> His Pro

<210> 3  
 <211> 1056  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

15

<400> 3



ES 2 407 994 T3

tctctggtg tcacccggct tggccccttc cacaccaac tggggcaagc ctgaccggc 60  
gacaggaggc atgaggggccc cccggccgaa atgacagtgc tggcgcagc ctggagccca 120  
acaacctatc tcctcctgct gctgctgctg agctcgggac tcagtgggac ccaggactgc 180  
tccttccaac acagcccatc ctccctcgac ttcgctgtca aaatccgtga gctgtctgac 240  
tacctgcttc aagattacce agtcaccgtg gcctccaacc tgcaggacga ggagctctgc 300  
gggggcctct ggcggctggt cctggcacag cgctggatgg agcggctcaa gactgtcgct 360  
gggtccaaga tgcaaggctt gctggagcgc gtgaacacgg agatacactt tgtcaccaaa 420  
tgtgcctttc agccccccc cagctgtctt cgcttcgtcc agaccaacat ctcccgcctc 480  
ctgcaggaga cctccgagca gctggtggcg ctgaagccct ggatcactcg ccagaacttc 540  
tcccggtgcc tggagctgca gtgtcagccc gactcctcaa ccctgccacc cccatggagt 600  
ccccggcccc tggaggccac agccccgaca gccccgcagc cccctctgct cctcctactg 660  
ctgctgcccg tgggcctcct gctgctggcc gctgcctggt gcctgactg gcagaggacg 720  
cggcggagga caccctgccc tggggagcag gtgcccccg tccccagtcc ccaggacctg 780  
ctgcttggg agcactgacc tggccaaggc ctcatcctgg ggaggatact gaggcacaca 840  
gaggggagtc accagccaga ggatgcatag cctggacaca gaggaagtgg gctagaggcc 900  
ggtcccttcc ttgggcccc ctcatctcct cccagaatg gaggcaacgc cagaatccag 960  
caccggcccc atttaccxaa ctctgtacaa agcccttgtc cccatgaaat tgtatataaa 1020  
tcctcctttt ctaccaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 1056

<210> 4  
5 <211> 1152  
<212> ADN  
<213> Mus musculus

<400> 4

10 gaattcgcgg ccgctcgcac attctgggga cgtcggctcg ggttcttaga agaggagatg 60  
acttttcaca gtactgagg ctctgagcag aagcctgggg gagcaggagg cggaaaccga 120  
cccacatcaa gggcggcagg gccggggcgg ggggtacagg ggttgggggg gaaggggctg 180  
cagggatgga gcccagacc tgccctcctg tcaacttcaa gaacctgtca caggcatgag 240  
gggtccccgg cagagatgac agtgcctggc ccagcctgga gcccaaatc ctccctgttg 300  
ctgctgttgc tgctgctgag tccttgccctg cgggggacac ctgactgtta cttcagccac 360  
agtcccatct cctccaactt caaagtgaag tttagagagt tgactgacca cctgcttaaa 420  
gattaccag tcactgtggc cgtaaatctt caggacgaga agcactgcaa ggccttggg 480  
agcctcttcc tagcccagcg ctggatagag caactgaaga ctgtggcagg gtctaagatg 540  
caaacgcttc tggaggacgt caacaccgag atacattttg tcacctcatg taccttccag 600  
cccctaccag aatgtctgcg attcgtccag accaacatct cccacctcct gaaggacacc 660  
tgcacacagc tgcttggctt gaagccctgt atcgggaagg cctgccagaa tttctctcgg 720  
tgcctggagg tgcagtgcc gcccggactcc tccacctgc tgcaccaag gaggccata 780  
gccttagaag ccacggagct cccagagcct cggcccaggc agctgttgct cctgctgctg 840  
ctgctgctgc ctctcact ggtgctgctg gcagccgctt ggggccttgc ctggcaaagg 900  
gcaagaagga ggggggagct ccacctggg gtgcccctcc cctccatcc ctaggatgag 960  
agccttgtgc atcgttgact cagccagggt cttatctcga tgaggctca atatgttggc 1020  
caaactgact ttgaaaacct cgatgcacct tcctgcccc caaacttcca aacagctggg 1080  
cttacgggca tgctatatac aacaaggctt tcttttcttc tttcttggg cttagattgg 1140  
gaaccaaacc aa 1152

<210> 5  
15 <211> 224

ES 2 407 994 T3

<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 5

5

Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser  
1 5 10 15  
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
20 25 30  
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro  
35 40 45  
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
50 55 60  
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
65 70 75 80  
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
85 90 95  
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr  
100 105 110  
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
115 120 125  
Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
130 135 140  
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
145 150 155 160  
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
165 170 175  
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser  
180 185 190  
Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
195 200 205  
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
210 215 220

<210> 6  
<211> 411  
<212> PRT  
<213> Artificial

10

<220>  
<223> Proteína de fusión

15

<400> 6

ES 2 407 994 T3

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

Leu Leu Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Gly Thr Gln Asp Cys Ser Phe  
20 25 30

Gln His Ser Pro Ile Ser Ser Asp Phe Ala Val Lys Ile Arg Glu Leu  
35 40 45

Ser Asp Tyr Leu Leu Gln Asp Tyr Pro Val Thr Val Ala Ser Asn Leu  
50 55 60

Gln Asp Glu Glu Leu Cys Gly Gly Leu Trp Arg Leu Val Leu Ala Gln  
65 70 75 80

Arg Trp Met Glu Arg Leu Lys Thr Val Ala Gly Ser Lys Met Gln Gly  
85 90 95

Leu Leu Glu Arg Val Asn Thr Glu Ile His Phe Val Thr Lys Cys Ala  
100 105 110  
Phe Gln Pro Pro Pro Ser Cys Leu Arg Phe Val Gln Thr Asn Ile Ser  
115 120 125

Arg Leu Leu Gln Glu Thr Ser Glu Gln Leu Val Ala Leu Lys Pro Trp  
130 135 140

Ile Thr Arg Gln Asn Phe Ser Arg Cys Leu Glu Leu Gln Cys Gln Pro  
145 150 155 160

Asp Ser Ser Thr Leu Pro Pro Pro Trp Ser Pro Arg Pro Leu Glu Ala  
165 170 175

Thr Ala Pro Thr Ala Pro Gln Pro Pro Arg Ser Pro Pro Cys Pro Ser  
180 185 190

Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro  
195 200 205

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr  
210 215 220

Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn  
225 230 235 240

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg  
245 250 255

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val  
260 265 270

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser  
275 280 285

Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys  
290 295 300

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu  
305 310 315 320

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe  
325 330 335

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu  
340 345 350

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe  
355 360 365

Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly  
370 375 380

ES 2 407 994 T3

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr  
385 390 395 400

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
405 410

**REIVINDICACIONES**

1. Preparación inmunogénica, que comprende ARN, que codifica por lo menos un antígeno, y ligando de Flt3.
- 5 2. Preparación inmunogénica según la reivindicación 1, en la que el ARN es ARNm.
3. Preparación inmunogénica según la reivindicación 1 o 2, en la que el ARN se obtuvo mediante transcripción *in vitro*.
- 10 4. Preparación inmunogénica según una de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además por lo menos un factor estabilizador del ARN.
5. Composición farmacéutica, que comprende una preparación inmunogénica según una de las reivindicaciones 1 a 4.
- 15 6. Composición farmacéutica según la reivindicación 5 en forma de una formulación como vacuna.
7. Ligando de Flt3 para su utilización en un procedimiento para producir o intensificar una respuesta inmunológica en un individuo, que comprende la administración de ARN que codifica por lo menos un antígeno, contra el cual debe dirigirse la respuesta inmunológica y una administración de ligando de Flt3.
- 20 8. Ligando de Flt3 según la reivindicación 7, en el que la respuesta inmunológica comprende una respuesta inmunológica de células T específicas de antígeno.
- 25 9. Ligando de Flt3 para su utilización en un procedimiento destinado a incrementar la cantidad de células efectoras específicas de antígeno en un individuo, que comprende la administración de ARN que codifica el antígeno, y una administración de ligando de Flt-3.
- 30 10. Ligando de Flt3 según la reivindicación 9, en el que las células efectoras específicas de antígeno son células T citotóxicas CD8+ y/o células T auxiliares CD4+.
11. Ligando de Flt3 para su utilización en un procedimiento destinado a la prevención y/o al tratamiento del cáncer en un individuo, que comprende una administración de ARN, que codifica un antígeno tumoral, contra el cual debe dirigirse la respuesta inmunológica y una administración de ligando de Flt3.
- 35 12. Ligando de Flt3 para su utilización en un procedimiento destinado a la prevención y/o al tratamiento de una infección vírica en un individuo, que comprende una administración de ARN, que codifica un antígeno vírico, contra el cual debe dirigirse la respuesta inmunológica, y una administración de ligando de Flt3.
- 40 13. Ligando de Flt3 para su utilización en un procedimiento destinado a la prevención y/o al tratamiento de una infección bacteriana en un individuo, que comprende una administración de ARN, que codifica un antígeno bacteriano, contra el cual debe dirigirse la respuesta inmunológica, y una administración de ligando de Flt3.
- 45 14. Ligando de Flt3 para su utilización en un procedimiento destinado a la prevención y/o al tratamiento de una alergia en un individuo, que comprende la administración de ARN, que codifica un alérgeno relevante para la alergia, y una administración de ligando de Flt3.
15. Ligando de Flt3 según una de las reivindicaciones 7 a 14, en el que el individuo es un ser humano.
- 50 16. Utilización de ligando de Flt3 para la preparación de una composición farmacéutica para incrementar la inmunogenicidad de una vacuna de ARN.

Fig. 1

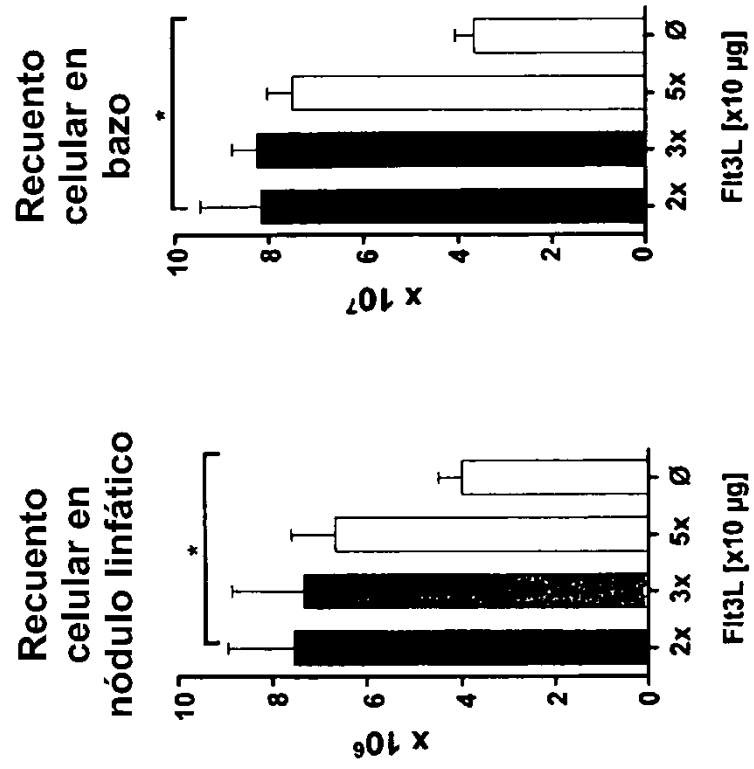
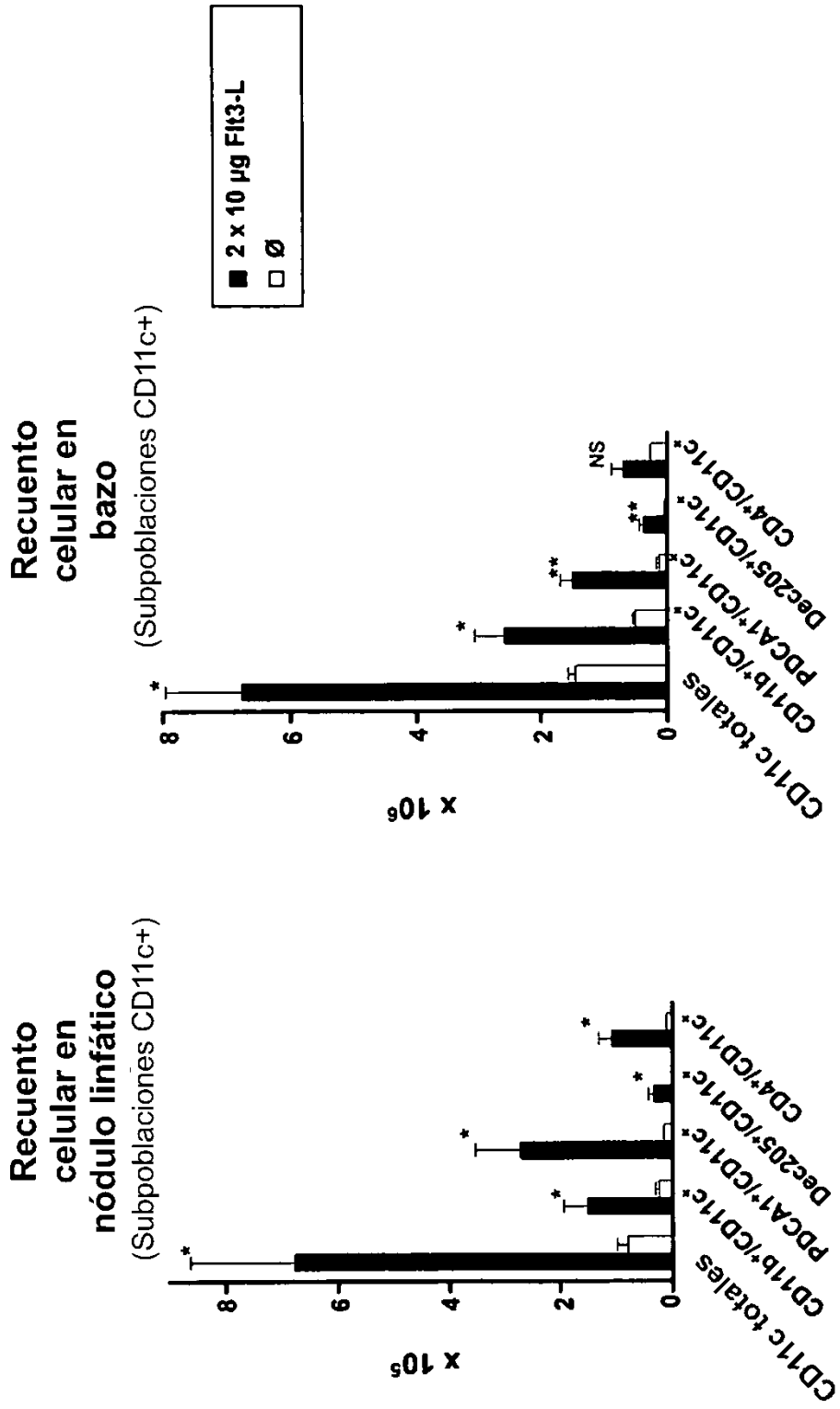


Fig. 2



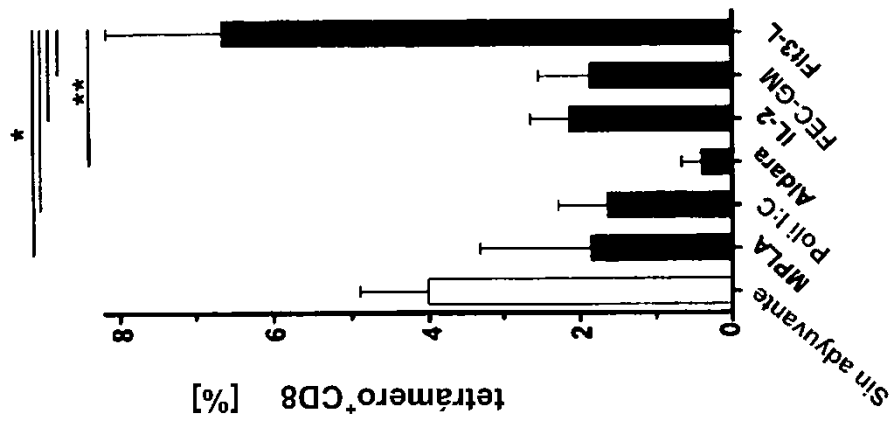
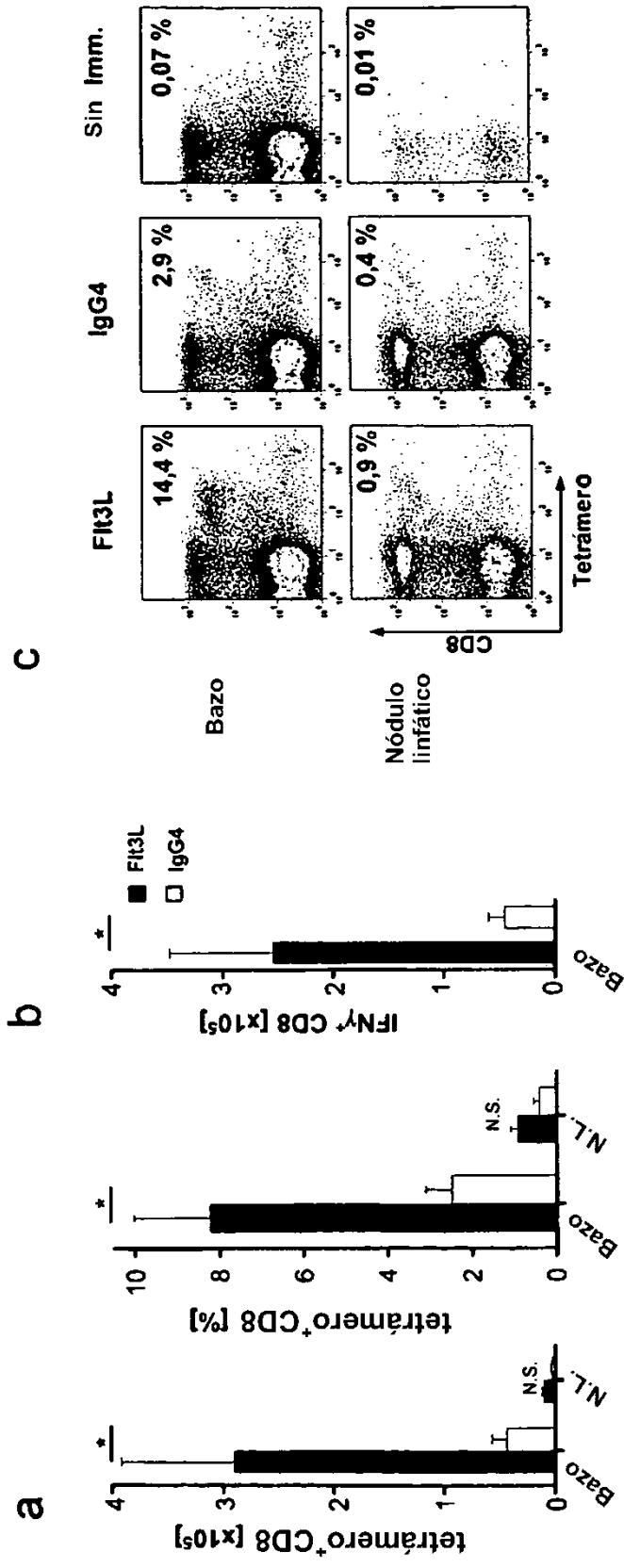


Fig. 3

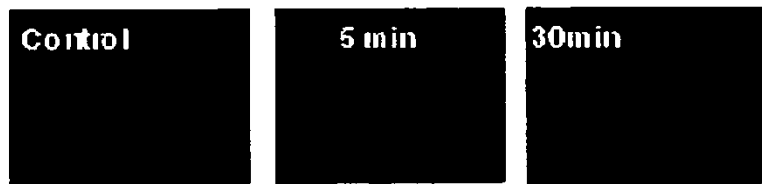


Fig. 4



**Fig. 5**

**a**



**b**

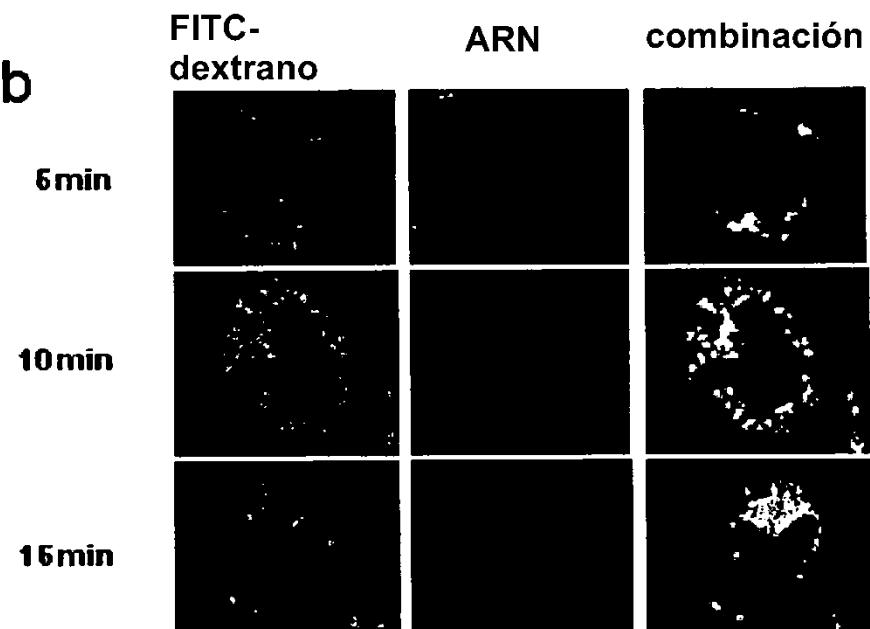


Fig. 6

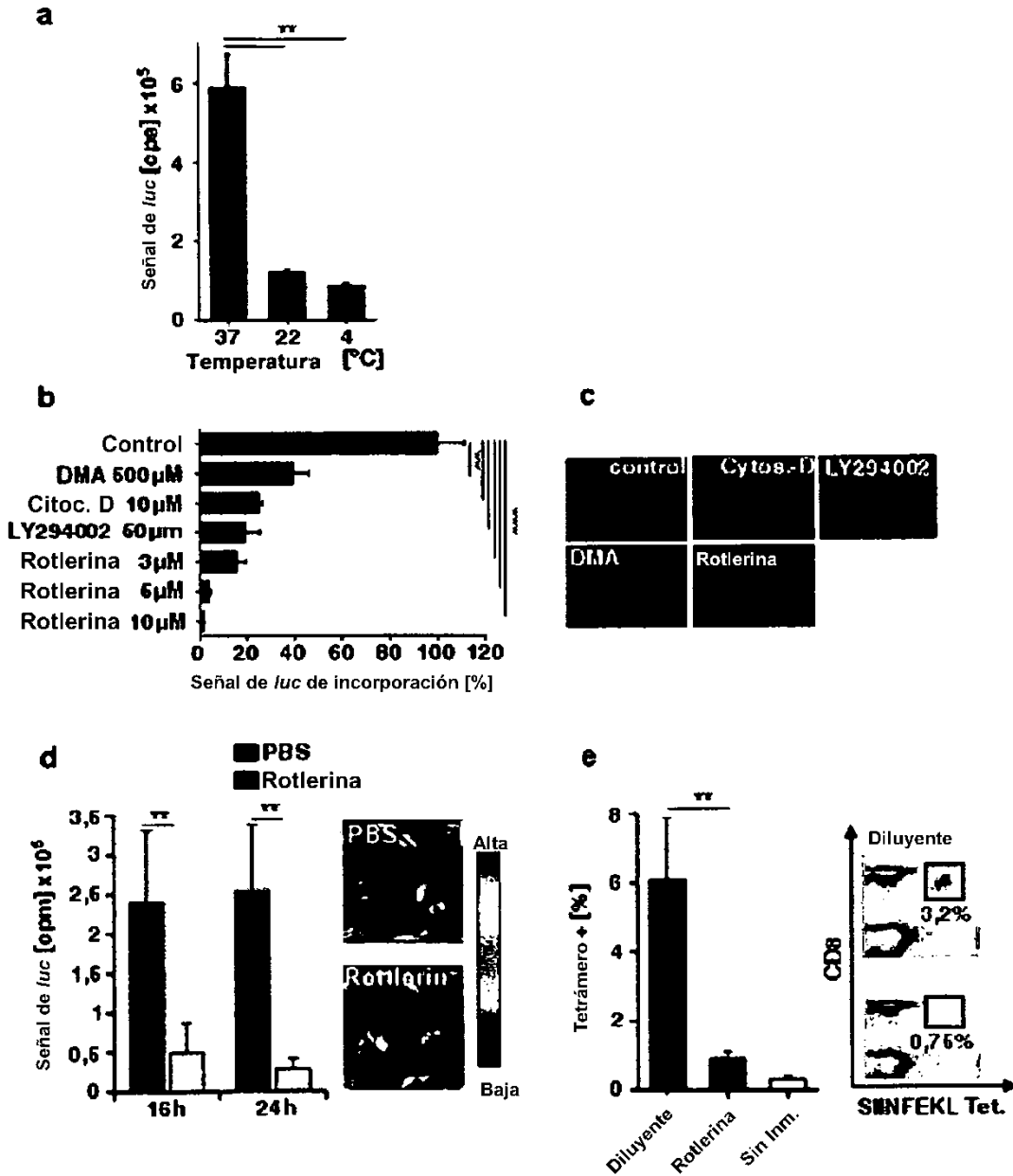


Fig. 7

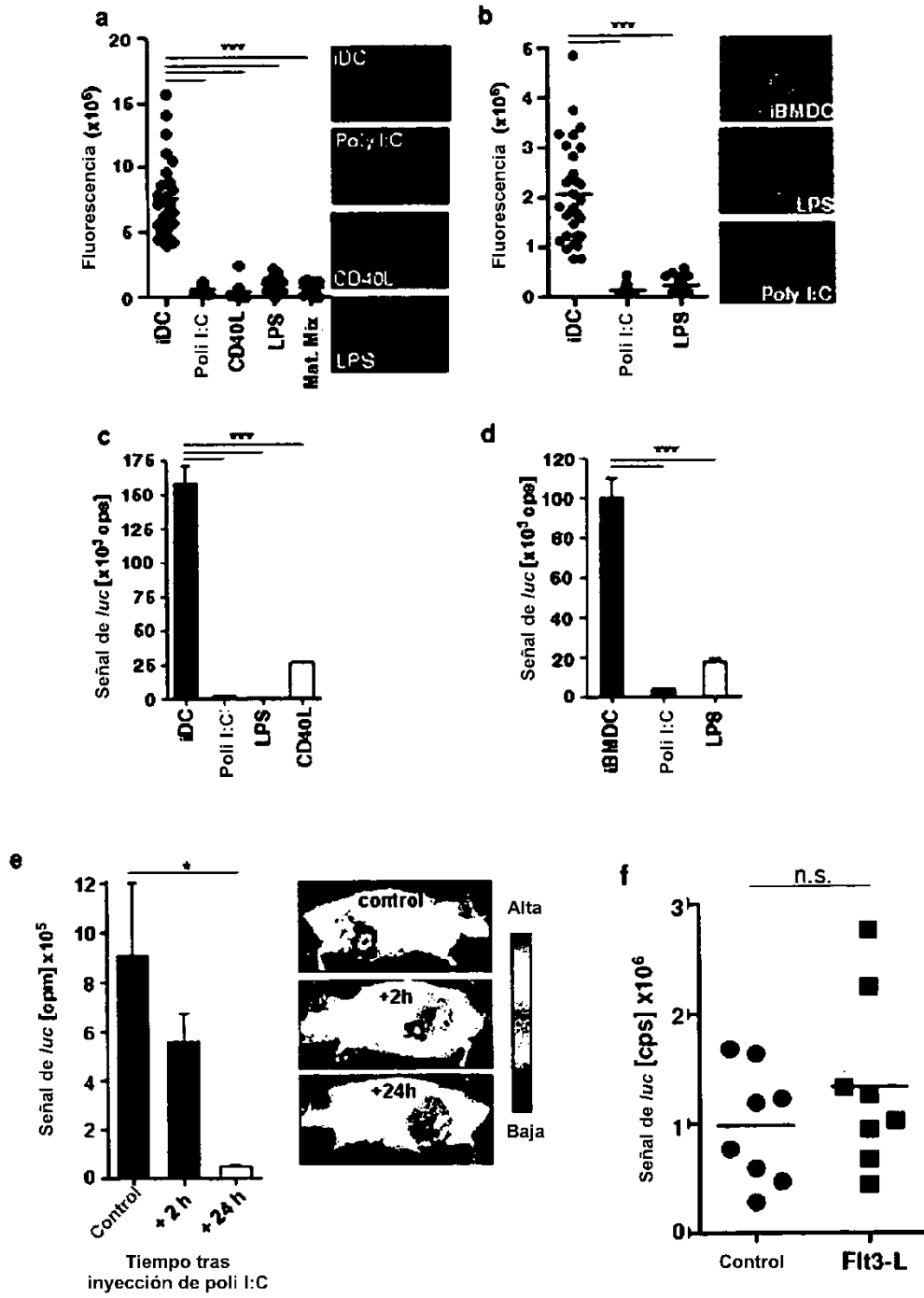
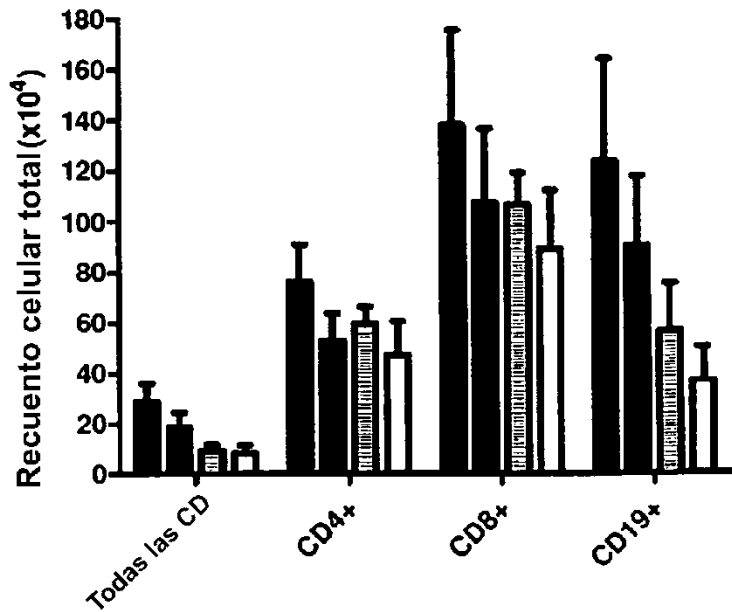
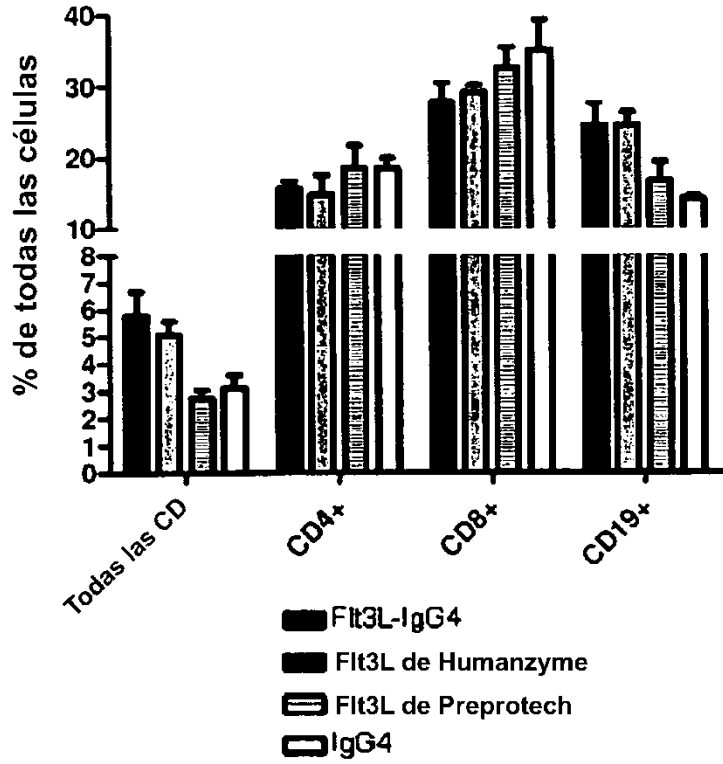


Fig. 8



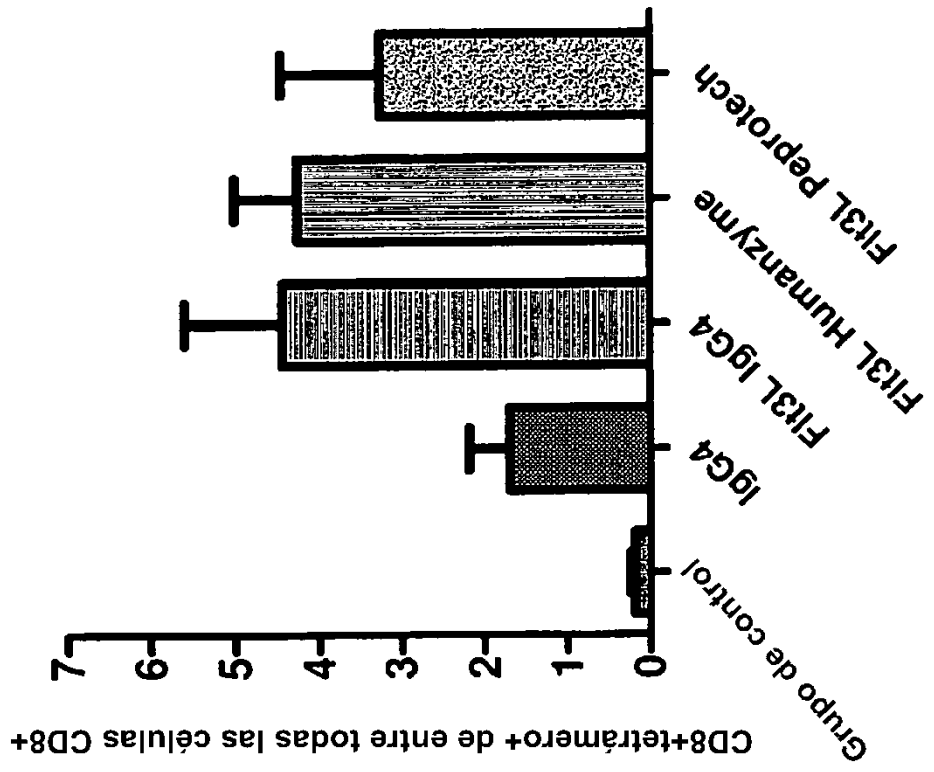


Fig. 9

Fig. 10

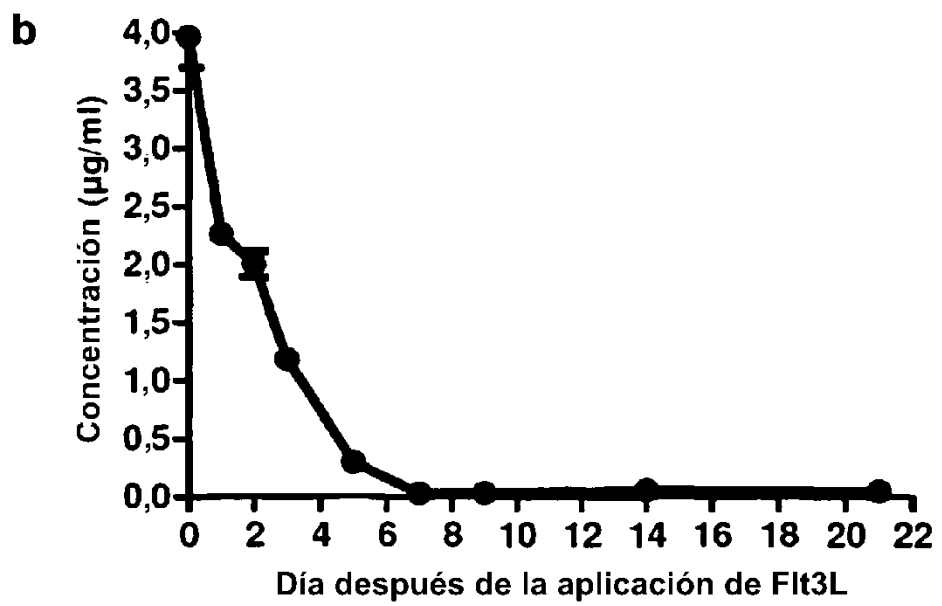
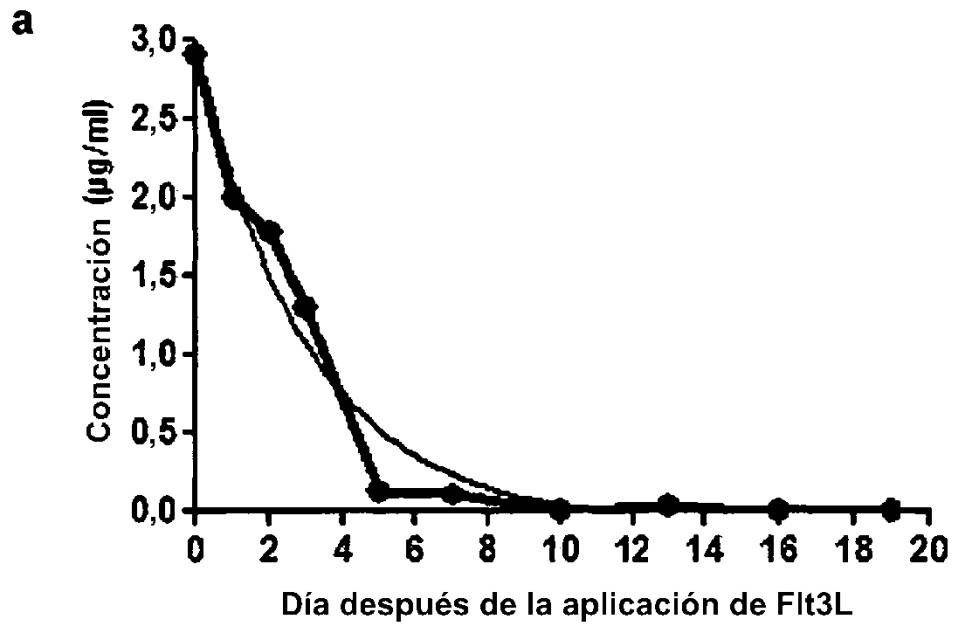


Fig. 11

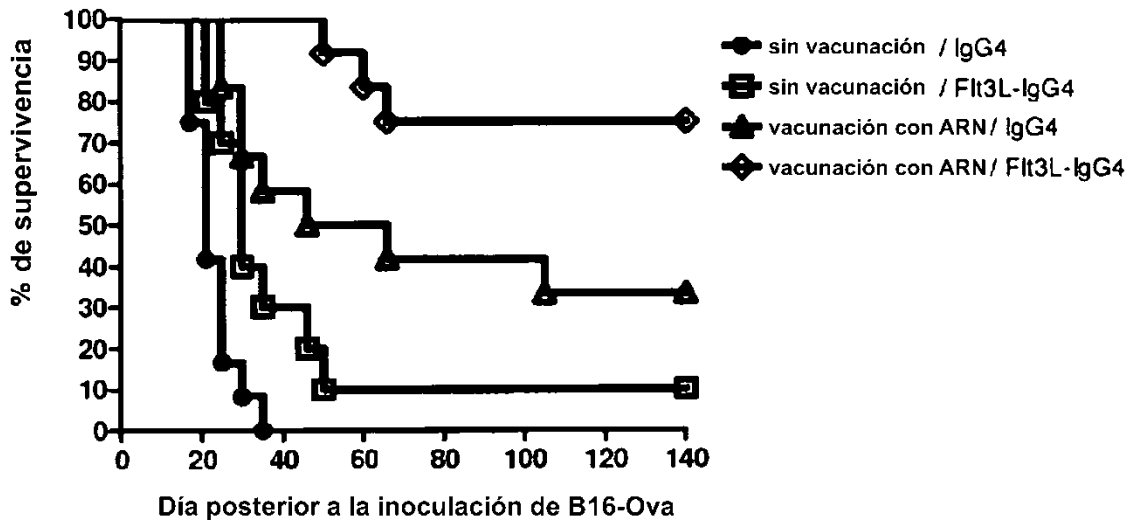


Fig. 12

