

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 522**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 5/02 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2008 E 08836827 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.12.2014 EP 2207874**

54 Título: **Células dendríticas modificadas por ingeniería y usos para el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

08.10.2007 US 978224 P 08.10.2007 US 978394 P
09.10.2007 US 978509 P 12.10.2007 US 979485 P
12.10.2007 US 979480 P 26.11.2007 US 990167 P
28.11.2007 US 990689 P 03.12.2007 US 991807 P
04.01.2008 US 19089 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.03.2015

73 Titular/es:

INTREXON CORPORATION (50.0%)
1750 Kraft Drive, Suite 1400
Blacksburg, VA 24060 , US y
UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE
COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER
EDUCATION (50.0%)

72 Inventor/es:

BRAUGHLER, J., MARK;
KUMAR, PRASANNA;
STORKUS, WALTER, J. y
OKADA, HIDEHO

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 531 522 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

Células dendríticas modificadas por ingeniería y usos para el tratamiento del cáncer

5 Antecedentes de la invención**Campo de la invención**

10 Esta invención se refiere al campo de la terapia génica para el tratamiento del cáncer. En una realización, la invención se refiere a la ingeniería de células dendríticas para expresar condicionalmente interleuquina-12 (IL-12) y el uso de las células para terapéutica. En otra realización, la invención se refiere a la ingeniería de células dendríticas para expresar condicionalmente interleuquina-12 (IL-12) y/o interferón alfa (IFN-alfa) y el uso de las células para terapéutica.

15 Antecedentes

Diversas patentes, solicitudes de patente y publicaciones se citan en este documento. Sin embargo, la mención de cualquier referencia en este documento no debe interpretarse como una admisión de que dicha referencia está disponible como "técnica previa" a la presente solicitud.

20 La interleuquina-12 (IL-12) es un miembro de la familia de citoquinas de tipo I implicada en la contribución a varios procesos biológicos incluyendo, aunque sin limitación, la respuesta inmune protectora y la supresión de la tumorigénesis (Abdi et al., 2006; Adorini, 1999; Adorini, 2001; Adorini et al., 2002; Adorini et al., 1996; Akhtar et al., 2004; Akiyama et al., 2000; Al-Mohanna et al., 2002; Aliberti et al., 1996; Allavena et al., 1994; Alii y Khar, 2004; Alzona et al., 1996; Amemiya et al., 2006; Araujo et al., 2001; Arulanandam et al., 1999; Athie et al., 2000; Athie-Morales et al., 2004; Bertagnolli et al., 1992; Bhardwaj et al., 1996; Biedermann et al., 2006; Brunda y Gately, 1994; Buchanan et al., 1995; Romani et al., 1997; Rothe et al., 1996; Satoskar et al., 2000; Schopf et al., 1999; Thomas et al., 2000; Tsung et al., 1997; Wolf et al., 1994; Yuminamochi et al., 2007). Un creciente conjunto de evidencias sugiere que la IL-12 puede ser una diana prometedor para el control de enfermedades humanas (por ejemplo, cáncer).

35 A pesar de que la IL-12 sigue siendo prometedor como agente terapéutico contra el cáncer basado en su potente actividad de soporte sobre células NK anti-tumorales Tipo-1, células T CD4⁺ y células T CD8⁺ (Trinchieri, 2003), la toxicidad informada de la IL-12 humana recombinante (rhIL-12) en pacientes (Atkins et al., 1997), junto con fuentes limitadas de rhIL-12 de grado GMP para aplicación clínica, ha impedido enfoques terapéuticos satisfactorios basados en IL-12. Por tanto, parece razonable que enfoques de terapia génica puedan representar opciones de tratamiento más seguras, más sostenibles. De hecho, los ensayos clínicos en fase I que aplican suministro intra- o peri-tumoral de ADNc de IL-12 recombinante basado en virus (Sangro et al., 2004; Triozzi et al., 2005) o plásmidos (Heinzerling et al., 2005), o fibroblastos autólogos modificados con genes de IL-12 (Kang et al., 2001) se han encontrado seguros y bien tolerados.

45 Sin embargo, las respuestas clínicas objetivas en pacientes con melanoma o una diversa gama de carcinomas que reciben estas terapias génicas han sido raras, variable, transitorias y en gran parte centradas en el sitio de tratamiento (Heinzerling et al., 2005; Kang et al., 2001; Sangro et al., 2004; Triozzi et al., 2005). En casos en los que la resolución de la enfermedad fue parcial o completa, se han observado frecuencias aumentadas de linfocitos infiltrantes de tumor (Heinzerling et al., 2005; Sangro et al., 2004) y niveles elevados de células T CD8⁺ específicas de tumor en circulación (Heinzerling et al., 2005), en consonancia con el cebado cruzado mejorado de células T específicas de antígeno en estos pacientes.

50 Además, surgieron varias preocupaciones residuales, por ejemplo, toxicidades imprevistas asociadas con la terapia génica con IL-12 basada en DC y limitaciones potenciales dependientes de IL-12 en la migración de DC.IL12 terapéutico después de administración intratumoral. Además, hay preocupaciones adicionales respecto a la cronología de producción de IL-12 en DC transducidas muy importante para la eficacia terapéutica (Murphy et al., 2005)

55 Como el cebado cruzado de células T específicas se logra mejor mediante células dendríticas (DC) que sirven como fuente natural pero regulada de IL-12 (Berard et al., 2000), los últimos informes de la eficacia preclínica superior de terapia génica con IL-12 basada en DC han sido de gran interés (Satoh et al., 2002; Tatsumi et al., 2003; Yamanaka et al., 2002). Por ejemplo, se demostró que la inyección intratumoral (i.t.) de DC modificadas por ingeniería para producir IL-12p70 (mediante infección por adenovirus recombinante) provoca el cebado cruzado mejorado drásticamente de un repertorio ampliamente reactivo de células T CD8⁺ específico de tumor en concierto con el rechazo del tumor en modelos murinos (Tatsumi et al., 2003). Dado el uso previo de un adenovirus recombinante que codifica mL12 bajo un promotor basado en CMV (rAd.cIL12, (Tatsumi et al., 2003)), la producción por DC modificadas por ingeniería de IL-12 fue constitutiva, por tanto, el impacto inmunológico de esta citoquina temprana dentro de la lesión tumoral y más tarde dentro de ganglios linfáticos de drenaje tumoral no se pudo resolver con respecto a los resultados terapéuticos. Se conocen en la técnica sistemas para la expresión génica condicional.

5 Karzenowski et al. (2006). (RheoSwitch® Therapeutic System-Inducible Recombinant AAV Vectors for Tightly Regulated Transgene Expression. *Molecular Therapy*, volumen 13, suplemento 1, página S 194.) describe el uso de vectores de AAV recombinante (vvAAV) para el suministro del sistema terapéutico RheoSwitch® (RTS). Se indica que este sistema permite el control regulador de expresión génica terapéutica a largo plazo *in vivo*. La tecnología de expresión génica RTS permite controlar la cronología y dosis precisas de la proteína terapéutica a través de la administración sistémica de un fármaco activado farmacológicamente inerte altamente específico.

10 Vilaboa et al. (2006). (Regulatable Gene Expression Systems for Gene Therapy. *Current Gene Therapy*, Volumen 6, páginas 421-438.) revisa sistemas de expresión génica regulables para terapia génica. Indica que la regulación temporal de transgenes puede conseguirse mediante conmutadores génicos que se activan mediante un inductor de molécula pequeña apropiado y que la regulación tanto espacial como temporal de la actividad del transgén puede controlarse mediante una nueva generación de conmutadores génicos, que combinan un promotor de gen de proteína de choque térmico y un conmutador génico sensible a molécula pequeña.

15 Lessard et al., (2007). (Characterisation of the RSLI-Dependent Conditional Expression System in LNCaP prostate cancer cells and development of a single vector format Prostate, volumen 67, páginas 808-819), indica que el sistema RheoSwitch es muy adecuado para la expresión génica condicional en células de cáncer de próstata.

20 Vujanovic et al., (2006). (IL-12p70 and IL-18 gene-modified dendritic cells loaded with tumor antigen-derived peptides or recombinant protein effectively stimulate specific Type-1 CD4(+) T-cell responses from normal donors and melanoma patients *in vitro*. *Cancer Gene Therapy*, volumen 13, páginas 798-805) describe células dendríticas humanas modificadas por ingeniería genética que secretan altos niveles de IL-12, mediante infección adenoviral recombinante, para el tratamiento del cáncer.

25 Mazzolini et al. (2005). (Intratatumoral Injection of Dendritic Cells Engineered to Secrete Interleukin-12 by Recombinant Adenovirus in Patients with Metastatic Gastrointestinal Carcinomas. *Molecular Therapy*. Volumen 11, páginas 437-438), describe la inyección intratumoral de células dendríticas modificadas por ingeniería para secretar interleuquina-12 mediante infección adenoviral recombinante para el tratamiento de pacientes con carcinomas gastrointestinales.

30 Katakam et al. (2006). (Retroviral Delivery of the RheoSwitch® Therapeutic System for Precisely Regulated Expression of BMP-2 for Bone Regeneration. *Molecular Therapy*. Volumen 13, página 5422.) describe el suministro retroviral del sistema RheoSwitch para la expresión regulada de forma precisa de BMP-2 para regeneración ósea.

35 El documento US2005/0191659 describe circuitos moleculares que proporciona expresión sostenida de un gen de interés después de una única aplicación de estrés. Generalmente, los circuitos moleculares de la invención comprenden (a) una primera molécula de ácido nucleico que comprende un gen que codifica un factor de transcripción y un primer promotor o un promotor de combinación que se puede activar por estrés y por el factor de transcripción, donde el primer promotor o el promotor de combinación y el gen del factor de transcripción están unidos de forma funcional, y (b) una segunda molécula de ácido nucleico que comprende un gen de interés y un segundo promotor que se puede activar por el factor de transcripción, donde el segundo promotor y el gen de interés están unidos de forma funcional. Por tanto, existe la necesidad de DC modificadas por ingeniería para la expresión condicional de IL-12. La invención proporciona un resultado terapéutico prometedor para el uso de dichas células.

45 **Sumario de la invención**

La invención describe un vector recombinante que codifica una proteína que tiene la función de IL-12 bajo el control de un promotor condicional. El vector puede ser un vector adenoviral que codifica IL-12p70 dirigido por un promotor que puede activarse de forma condicional proporcionan un ligando de molécula pequeña soluble tal como diacilhidrazina, por ejemplo, RG-115819, RG-115830 o RG-115932. Este vector permite el control de la expresión de IL-12 a partir de DC (rAD.RheoIL12).

55 También se describe un vector para expresar de forma condicional una proteína que tiene la función de IL-12 que comprende un polinucleótido que codifica un conmutador génico, comprendiendo dicho conmutador génico al menos una secuencia de factor de transcripción, donde dicha al menos una secuencia de factor de transcripción codifica un factor de transcripción dependiente de ligando, unido de forma funcional a un promotor, y (2) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene la función de IL-12 unido de a un promotor que se activa por dicho factor de transcripción dependiente de ligando. También se describe un vector para expresar de forma condicional proteínas que tienen la función de IL-12 y/o IFN-alfa que comprende un polinucleótido que codifica un conmutador génico, comprendiendo dicho conmutador génico al menos una secuencia de factor de transcripción, donde dicha al menos una secuencia de factor de transcripción codifica un factor de transcripción dependiente de ligando, unido de forma funcional a un promotor, y (2) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene la función de IL-12, y/o un polinucleótido que codifica una proteína que tiene la función de IFN-alfa unido a un promotor que se activa por dicho factor de transcripción dependiente de ligando.

65 Por ejemplo, se describe un vector para expresar de forma condicional una proteína que tiene la función de IL-12 que comprende un polinucleótido que codifica un conmutador génico, donde el polinucleótido comprende (1) al

menos una secuencia de factor de transcripción unida de forma funcional a un promotor, donde dicha al menos una secuencia de factor de transcripción codifica un factor de transcripción dependiente de ligando, y (2) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene la función de IL-12 unido a un promotor que se activa mediante dicho factor de transcripción dependiente de ligando. También se describe un vector para expresar de forma condicional proteínas que tienen la función de IL-12 y/o IFN-alfa que comprende un polinucleótido que codifica un conmutador génico, donde el polinucleótido comprende (1) al menos una secuencia de factor de transcripción unida de forma funcional a un promotor, donde dicha al menos una secuencia de factor de transcripción codifica un factor de transcripción dependiente de ligando, y (2) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene la función de IL-12, y/o un polinucleótido que codifica una proteína que tiene la función de IFN-alfa unido a un promotor que se activa mediante dicho factor de transcripción dependiente de ligando.

La descripción describe adicionalmente un método para producir una población de DC que expresan de forma condicional una proteína que tiene la función de IL-12 modificando la DC con un vector recombinante que expresa de forma condicional una proteína que tiene la función de IL-12, por ejemplo, rAd.RheoIL12. También se describe un método para producir una población de DC que expresan de forma condicional proteínas que tienen la función de IL-12 y/o IFN-alfa modificando la DC con un vector recombinante que expresa de forma condicional proteínas que tienen la función de IL-12 y/o IFN-alfa.

También se describe un método para producir una población de células dendríticas que expresan de forma condicional una proteína que tiene la función de IL-12, que comprende modificar al menos una parte de las células dendríticas introduciendo en dichas células dendríticas un vector que comprende un polinucleótido que codifica un conmutador génico, comprendiendo dicho conmutador génico al menos una secuencia de factor de transcripción, donde dicha al menos una secuencia de factor de transcripción codifica un factor de transcripción dependiente de ligando, unida de forma funcional a un promotor, y (2) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene la función de IL-12 unido a un promotor que se activa por dicho factor de transcripción dependiente de ligando. También se describe un método para producir una población de células dendríticas que expresan de forma condicional proteínas que tienen la función de IL-12 y/o IFN-alfa, que comprende modificar al menos una parte de las células dendríticas introduciendo en dichas células dendríticas un vector que comprende un polinucleótido que codifica un conmutador génico, comprendiendo dicho conmutador génico al menos una secuencia de factor de transcripción, donde dicha al menos una secuencia de factor de transcripción codifica un factor de transcripción dependiente de ligando, unida de forma funcional a un promotor, y (2) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene la función de IL-12, y/o un polinucleótido que codifica una proteína que tiene la función de IFN-alfa unido a un promotor que se activa por dicho factor de transcripción dependiente de ligando.

Por ejemplo, la descripción describe un método para producir una población de células dendríticas que expresan de forma condicional una proteína que tiene la función de IL-12, que comprende modificar al menos una parte de las células dendríticas introduciendo en dichas células dendríticas un vector que comprende un polinucleótido que codifica un conmutador génico, donde el polinucleótido comprende (1) al menos una secuencia de factor de transcripción unida de forma funcional a un promotor, donde dicha al menos una secuencia de factor de transcripción codifica un factor de transcripción dependiente de ligando, y (2) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene la función de IL-12 unido a un promotor que se activa por dicho factor de transcripción dependiente de ligando. La descripción describe un método para producir una población de células dendríticas que expresan de forma condicional proteínas que tienen la función de IL-12 y/o IFN-alfa, que comprende modificar al menos una parte de las células dendríticas introduciendo en dichas células dendríticas un vector que comprende un polinucleótido que codifica un conmutador génico, donde el polinucleótido comprende (1) al menos una secuencia de factor de transcripción unida de forma funcional a un promotor, donde dicha al menos una secuencia de factor de transcripción codifica un factor de transcripción dependiente de ligando, y (2) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene la función de IL-12, y/o un polinucleótido que codifica una proteína que tiene la función de IFN-alfa unido a un promotor que se activa por dicho factor de transcripción dependiente de ligando.

La descripción también proporciona una población de DC modificadas para expresar de forma condicional una proteína que tiene la función de IL-12 con un vector recombinante que expresa de forma condicional una proteína que tiene la función de IL-12, por ejemplo, el vector rAd.RheoIL12. Se ha descubierto que DC infectadas con rAd.RheoIL12 producían niveles elevados de IL-12 solamente después de proporcionar un ligando activador. También se describe una población de DC modificadas para expresar de forma condicional una proteína que tiene la función de IL-12 y/o una proteína que tiene la función de IFN-alfa con un vector recombinante que expresa de forma condicional una proteína que tiene la función de IL-12 y/o la función de IFN-alfa. Ligandos útiles incluyen, aunque sin limitación RG-115830, RG-115932, RG-115819, RSL1, y otras diacilhidrazinas.

La solicitud describe una célula dendrítica modificada por ingeniería *in vitro* que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica un conmutador génico, comprendiendo dicho conmutador génico al menos una secuencia de factor de transcripción, donde dicha al menos una secuencia de factor de transcripción codifica un factor de transcripción dependiente de ligando, unida de forma funcional a un promotor, y (2) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene la función de IL-12 unido a un promotor que se activa por dicho factor de transcripción dependiente de ligando. También se describe una célula dendrítica modificada por ingeniería *in vitro* que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica un conmutador génico, comprendiendo

dicho conmutador génico al menos una secuencia de factor de transcripción, donde dicha al menos una secuencia de factor de transcripción codifica un factor de transcripción dependiente de ligando, unida de forma funcional a un promotor, y (2) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene la función de IL-12, y/o un polinucleótido que codifica una proteína que tiene la función de IFN-alfa unido a un promotor que se activa por dicho factor de transcripción dependiente de ligando.

Por ejemplo, la invención describe una célula dendrítica modificada por ingeniería *in vitro* que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica un conmutador génico, donde el polinucleótido comprende (1) al menos una secuencia de factor de transcripción unida de forma funcional a un promotor, donde dicha al menos una secuencia de factor de transcripción codifica un factor de transcripción dependiente de ligando, y (2) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene la función de IL-12 unido a un promotor que se activa por dicho factor de transcripción dependiente de ligando. La invención describe una célula dendrítica modificada por ingeniería *in vitro* que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica un conmutador génico, donde el polinucleótido comprende (1) al menos una secuencia de factor de transcripción unida de forma funcional a un promotor, donde dicha al menos una secuencia de factor de transcripción codifica un factor de transcripción dependiente de ligando, y (2) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene la función de IL-12, y/o un polinucleótido que codifica una proteína que tiene la función de IFN-alfa unido a un promotor que se activa por dicho factor de transcripción dependiente de ligando.

La presente invención describe una composición farmacéutica que comprende una población de DC modificadas para expresar de forma condicional una proteína que tiene la función de IL-12 con un vector recombinante que expresa de forma condicional una proteína que tiene la función de IL-12, por ejemplo, el vector rAd.RheoIL12. La invención describe una composición farmacéutica que comprende una población de DC modificadas para expresar de forma condicional una proteína que tiene la función de IL-12 y/o una proteína que tiene la función de IFN-alfa con un vector recombinante que expresa de forma condicional una proteína que tiene la función de IL-12 y/o una proteína que tiene la función de IFN-alfa.

La invención proporciona un tratamiento del cáncer, tal como tumores de melanoma o tumores de glioma. La terapia génica con IL-12 ha demostrado eficacia anti-tumoral en estudios en modelos animales cuando se aplica como un vector de ADNc recombinante (Faure *et al.*, 1998; Sangro *et al.*, 2005), pero incluso más, cuando se aplica en el contexto de DC modificadas con gen (Satoh *et al.*, 2002; Svane *et al.*, 1999; Tatsumi *et al.*, 2003; Yamanaka *et al.*, 2002). Hasta la fecha, sin embargo, los ensayos en fase I en seres humanos de terapia génica con IL-12 que aplican plásmidos o vectores virales no han logrado conseguir respuestas clínicas objetivas y duraderas en el entorno del cáncer (Heinzerling *et al.*, 2005; Kang *et al.*, 2001; Sangro *et al.*, 2004; Triozzi *et al.*, 2005). La terapia génica con IL-12 basada en DC (con o sin IFN-alfa) descrita en este documento proporciona una modalidad terapéutica prometedoras.

En una realización, la invención describe un método para tratar un tumor en un mamífero, que comprende (a) administrar por vía intratumoral a microentornos tumorales una población de células dendríticas modificadas por ingeniería *in vitro*, donde dichas células dendríticas comprenden un vector que comprende un polinucleótido que codifica un conmutador génico, donde el polinucleótido comprende (1) al menos una secuencia de factor de transcripción unida de forma funcional a un promotor, donde dicha al menos una secuencia de factor de transcripción codifica un factor de transcripción dependiente de ligando, y (2) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene la función de IL-12 unido a un promotor que se activa por dicho factor de transcripción dependiente de ligando y (b) administrar a dicho mamífero una cantidad eficaz de un ligando, que activa el factor de transcripción dependiente de ligando; induciendo de este modo la expresión de una proteína que tiene la función de IL-12 y tratando dicho tumor.

Por ejemplo, la invención describe un método para tratar un tumor en un mamífero, que comprende las etapas de:

- (a) modificar por ingeniería células dendríticas *in vitro* para expresar de forma condicional una proteína que tiene la función de IL-12;
- (b) administrar por vía intratumoral a microentornos tumorales dichas células dendríticas modificadas por ingeniería *in vitro*; y
- (c) administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un ligando activador; induciendo de ese modo la expresión de una proteína que tiene la función de IL-12 y tratando dicho tumor.

En otras realizaciones, la invención describe un método para tratar un tumor en un mamífero, que comprende (a) administrar por vía intratumoral a microentornos tumorales células dendríticas modificadas por ingeniería *in vitro*, donde dichas células dendríticas comprenden un vector que comprende un polinucleótido que codifica un conmutador génico, donde el polinucleótido comprende (1) al menos una secuencia de factor de transcripción unida de forma funcional a un promotor, donde dicha al menos una secuencia de factor de transcripción codifica un factor de transcripción dependiente de ligando, y (2) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene la función de IL-12 y/o una proteína que tiene la función de IFN-alfa, unido a un promotor activado por dicho factor de transcripción dependiente de ligando y (b) administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un ligando activador; induciendo de ese modo la expresión de una proteína que tiene la función de IL-12 y/o una proteína que

tiene la función de IFN-alfa y tratando dicho tumor.

Por ejemplo, la invención describe un método para tratar un tumor en un mamífero, que comprende las etapas de:

- 5 (a) modificar por ingeniería células dendríticas *in vitro* para expresar de forma condicional una proteína que tiene la función de IL-12 y/o una proteína que tiene la función de IFN-alfa;
 (b) administrar por vía intratumoral a microentornos tumorales dichas células dendríticas modificadas por ingeniería *in vitro*; y
 10 (c) administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un ligando activador; induciendo de ese modo la expresión de una proteína que tiene la función de IL-12 y/o una proteína que tiene la función de IFN-alfa y tratando dicho tumor.

15 También se describe en este documento, un método para determinar la eficacia de terapia basada en DC modificadas por ingeniería midiendo el nivel de expresión o actividad de IFN- γ en un paciente antes del inicio de la terapia, generando la terapia un nivel de control, seguido de la administración de DC modificadas por ingeniería para expresar de forma condicional una proteína que tiene la función de IL-12 y una cantidad eficaz de un ligando activador y después midiendo el nivel de expresión de IFN- γ para generar un nivel de ensayo, y comparando el nivel de control con el nivel de ensayo para determinar si el régimen terapéutico es eficaz.

20 También se describe en este documento un método para determinar la eficacia de un régimen terapéutico basado en célula dendrítica modificada por ingeniería *in vitro* en un paciente que comprende:

- 25 (a) medir el nivel de expresión o el nivel de actividad o ambos de interferón-gamma (IFN- γ) en una primera muestra biológica obtenida de dicho paciente que lo necesita antes de la administración de células dendríticas modificadas por ingeniería *in vitro*, generando de este modo un nivel de control;
 (b) administrar a un paciente que lo necesita, células dendríticas modificadas por ingeniería *in vitro* modificadas para expresar de forma condicional una proteína que tiene la función de IL-12;
 (c) administrar a dicho paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un ligando activador;
 30 (d) medir el nivel de expresión o el nivel de actividad o ambos de IFN- γ en una segunda muestra biológica obtenida de dicho paciente que lo necesita después de la administración de DC modificadas por ingeniería *in vitro* y ligando activador, generando de este modo un nivel de ensayo; y
 (e) comparar el nivel de control con el nivel de ensayo de IFN- γ , donde un aumento en el nivel de ensayo de expresión, actividad o ambas de IFN- γ respecto al nivel de control indica que el régimen terapéutico es eficaz en dicho paciente que lo necesita.

35 También se describe un método para inducir expresión condicional de una proteína que tiene la función de interleuquina-12 (IL-12) en una célula dendrítica que comprende: (1) administrar a un mamífero que lo necesita una cantidad eficaz de una población de las células dendríticas modificadas por ingeniería *in vitro* de la invención; y (2) administrar a dicho mamífero que lo necesita una cantidad eficaz de un ligando, que activa el factor de transcripción dependiente de ligando.

40 Con antelación a la aplicación clínica, se ampliaron los estudios previos realizados en un modelo de sarcoma CMS4 en ratones BALB/c y se observó que el suministro intratumoral de DC derivadas de médula ósea singénica pre-infectadas con Ad.cIL12 (expresión constitutiva), provocó un rechazo tumoral eficaz (Tatsumi *et al.*, 2003). El rechazo estaba asociado con la inmunidad sistémica mediada por células T CD8⁺ contra tumores CMS4 (Tatsumi *et al.*, 2003). La invención proporciona el uso de células dendríticas modificadas por ingeniería *in vitro* que comprenden un vector para expresar de forma condicional una proteína que tiene la función de IL-12 como se define en las reivindicaciones.

50 **Descripción detallada de los dibujos**

La FIG. 1 muestra la estructura del vector rAd.RheoIL12 en que las regiones E1 y E3 se han deletado y los componentes del sistema terapéutico RheoSwitch® (RTS)-IL-12 reemplazan la región E1. El recuadro marcado "IL12" representa las secuencias codificantes IL-12p40 e IL-12p35 separadas por IRES.

55 Las FIG. 2A-2C muestran que las DC modificadas por ingeniería expresan de forma condicional la proteína IL-12 en presencia de RG-115830.

La FIG. 3A muestra que DC modificadas por ingeniería administradas en microentornos de tumor de melanoma causan regresión tumoral cuando RG-115830 se inyecta por vía intraperitoneal en ratones C57B1/6 que albergan tumores subcutáneos B16 de 7 días establecidos en 24 horas desde la inyección de DC. 3B-3C: la regresión tumoral sucedió cuando RG-115830 se administró de los días 1 a 5, pero no cuando se administró solamente en los días 1 a 2 o 1 a 3 después de la inyección de DC.

60 La FIG. 4 muestra que DC modificadas por ingeniería muestran supervivencia prolongada en tumor y ganglio linfático de drenaje tumoral después de inyección intraperitoneal del ligando activador en 24 horas después de la inyección de DC, mucha menos supervivencia y ausencia de supervivencia de DC por ligando a las 48 horas y 65 72 horas respectivamente.

La FIG. 5A muestra que DC modificadas por ingeniería promueven una fuerte activación periférica de células T CD8⁺ anti-B16 si el ligando activador se proporciona en 24 horas desde la inyección de las DC modificadas por ingeniería. La FIG. 5B muestra que todos los ratones curados previamente de su melanoma mostraron protección específica contra células tumorales B16 pero no contra células de carcinoma de colon MC38 cuando se volvían a exponer animales sin tumor a células de melanoma B16 o células de carcinoma de colon MC38 relevantes en el día 45 (después de la exposición inicial a B16).

La FIG. 6 muestra el beneficio terapéutico inducido por la administración de ligando por vía intraperitoneal u oral. La FIG. 7 muestra los diagramas de Kaplan-Meier de la supervivencia de ratones como resultado de inyección intratumoral de glioma de ratón (GL261) con células dendríticas transducidas con polinucleótidos que codifican IL-12 y/o IFN-alfa bajo el control de RTS. Las abreviaturas en esta figura son las siguientes: Ad-IFNa es vector adenoviral que expresa de forma constitutiva IFN-alfa; Ad-RTS-IFNa es vector adenoviral que codifica IFN-alfa bajo el control de RTS; Ad-RTS-IFNa sin ligando es vector adenoviral que contiene RTS y IFN-alfa donde no estaba presente ligando activador; Ad-IFNa/IL-12 corresponde a DC transducidas con vectores adenovirales que codifican IFN-alfa e IL-12; y Ad-RTS-IFNa/IL-12 corresponde a DC transducidas con dos vectores adenovirales que codifican IFN-alfa e IL-12 bajo el control de RTS.

La FIG. 8 muestra un mapa del vector adenoviral Ad-RTS-hIL-12.

La FIG. 9 muestra la producción de IL-12 por células dendríticas humanas transducidas con vector adenoviral Ad-RTS-mIL-12 a diferente MOI y duración de adsorción viral. La transducción adenoviral de DC humanas de diferente MOI y durante diferente tiempo de adsorción viral mostró una transducción eficaz de estas células por adsorción viral de 3 horas a MOI de 500. El fármaco activador ("AD" o "ligando activador") indujo expresión de IL-12 en estas células dendríticas humanas transducidas.

La FIG. 10 muestra una comparación de los efectos de diferentes vectores adenoviral que contienen IL-12. La variante SP1-RheoIL-12 fue la más eficaz de las variantes que contienen Rheoswitch. Sp1-RheoIL-12 difiere de oldRheoIL-12 en que reemplaza una estructura de vector AdEasy-1 con la estructura de vector RAPAd (ViraQuest). Asimismo, TTR-RheoIL-12 difiere de oldRheoIL-12 en que contiene un promotor mínimo TTR cadena abajo de los sitios de unión Ga14, que reemplaza el promotor mínimo sintético y los sitios de unión Sp1, y la estructura de vector es RAPAd (ViraQuest). Como la FIG. 10 ilustra, Sp1-RheoIL-12 era comparable a oldRheoIL-12 y más eficaz que TTR-RheoIL-12 en la reducción del tamaño de tumor de melanoma B16.

La FIG. 11 muestra la ausencia de formación de tumor de melanoma B16 después de re-exposición de ratones previamente tratados con células dendríticas que contienen IL-12 inducible por Rheoswitch adenoviral recombinante. Esto muestra que se prevenía el crecimiento de tumores de melanoma B16 durante hasta 25 días cuando los ratones inmunes a B16 se volvían a inocular 45 días después de la primera inoculación con células B16. Se generaron células dendríticas murinas generadas a partir de médula ósea de ratones B6 por cultivo de 7 días en medio completo (RPMI-1640, FBS al 10 %) que contenía rmlL-4 más rmGM-CSF. Después se aislaron células dendríticas CD11c positivas usando perlas MACS específicas según el protocolo del fabricante (Miltenyi Biotech) y se infectaron a MOI de 100 usando rAd.IL-12 (RheoIL-12 frente a SP1 frente a TTR) durante 24 horas antes de inyección de 10E6 DC en tumores de melanoma B16 s.c. de 9 días establecidos (5 ratones por grupo, tumor en el flanco derecho). Los ratones se trataron o no con inyecciones i.p. diarias del ligando activador RG-115830 (30 mg/kg en 50 microlitros de DMSO) en los días 0-4 después de la inyección de DC. El tamaño del tumor se controló cada 3-4 días y se presenta en mm² como el producto de diámetros ortogonales. Para evaluar la especificidad de la protección asociada a la terapia, todos los animales libre de tumor se re-expusieron a 10E5 células de melanoma B16 en el flanco izquierdo frente a células de carcinoma de colon MC38 en el flanco derecho en el día 45 después de la exposición inicial a tumor B16. Se formaron tumores MC38 pero no se formaron tumores B16.

La FIG. 12 muestra una comparación entre las cantidades de células dendríticas inyectadas en el tumor B16 (10E5, 10E6, 10E7) y la cantidad de tiempo de administración de ligando (6 días o 13 días) y la regresión tumoral resultante en el modelo de ratón de tumor de melanoma B16. El ligando administrado diariamente durante 13 días en combinación con 10E7 células dendríticas fue más eficaz en causar regresión tumoral sobre un periodo de 25 días.

La FIG. 13 muestra que la terapia descrita en este documento no estaba asociada con pérdida adversa en el peso del animal debido a debilitación. La debilitación y pérdida de peso a menudo están asociadas con altos niveles de interferón-gamma y TNF-alfa que se sabe que están regulados positivamente en respuesta a IL-12.

La FIG. 14 muestra la ausencia de formación de tumor de melanoma B16 después de re-exposición de ratones previamente tratados con células dendríticas que contienen IL-12 inducible por RheoSwitch® adenoviral recombinante y ligando activador RG-115932. Se establecieron melanomas B16 s.c. durante 7 días en los flancos derechos de 5 ratones B6 singénicos. En el día 7, se inyectó por vía intratumoral (i.t.) DC.SP1-IL-12 (DC derivadas de médula ósea infectadas a una MOI de 100 usando el conmutador óptimo SP1) a dosis de 10⁵, 10⁶ o 10⁷. RG-115932 se proporcionó por inyección i.p. empezando en el día de inyección de DC (y diariamente después de ello durante 6 días o 13 días). Cada cohorte contenía 5 animales, con crecimiento tumoral controlado cada 3-4 días y presentando en tamaño medio (mm cuadrados basado en producto de mediciones ortogonales). También se evaluaron los pesos de los animales individuales en el momento de las mediciones del tumor (FIG. 13). Todos los animales que había quedado libres de enfermedad por cualquier terapia se re-expusieron en el día 50 (después de la inoculación inicial de tumor B16) con 10⁵ células de melanoma B16 en el flanco opuesto (flanco izquierdo) del tumor original y con 10⁵ células de carcinoma de colon MC38 en el flanco derecho. El crecimiento del tumor se controló cada 3-4 días y se comparó frente al crecimiento observado en animales vírgenes (no tratados) (véase la FIG. 12). La FIG. 14 por lo tanto muestra que se prevenía el crecimiento de

tumores de melanoma B16 durante hasta 24 días cuando se volvía a inocular a ratones inmunes a B16 con células B16. La FIG. 14 también ilustra que ratones vírgenes a B16 no estaban protegidos de la formación de tumores, como con ratones inmunes a MC38 y ratones vírgenes a MC38. MC38 es un carcinoma colon conocido en la técnica. Esto demuestra la especificidad de inmunización causada por la inyección original en tumor B16 de

5 células dendríticas que contienen IL-12 inducible por Rheoswitch® adenoviral recombinante. La FIG. 15 muestra la expresión de IL-12 dependiente de dosis de fármaco activador (RG-115932) en células dendríticas de ratón transducidas con Ad-RTS-mIL-12.

La FIG. 16 muestra la respuesta de activación/desactivación de la expresión de mIL-12 a la presencia o ausencia de RG-115932 en células HT1080 transducidas con Ad-RTS-mIL-12.

10 La FIG. 17 muestra que la respuesta de células T CD8⁺ a la inmunización por inyección intratumoral de DC transducidas con adenovirus en presencia o ausencia del fármaco activador (AD) corresponde con la respuesta antitumoral.

La FIG. 18 muestra la inducción de IL-12 humana en DC humanas de tres voluntarios transducidos con el vector adenoviral que codifica la IL-12 humana bajo el control de RTS.

15 Descripción detallada de las secuencias

La SEC ID N° 1 es una secuencia de nucleótidos de longitud completa del gen p35 de IL-12 de ratón de tipo silvestre.

20 La SEC ID N° 2 es una secuencia de nucleótidos de longitud completa del gen p40 de IL-12 de ratón de tipo silvestre.

La SEC ID N° 3 es una secuencia de nucleótidos de longitud completa del gen p35 de IL-12 humana de tipo silvestre.

25 La SEC ID N° 4 es una secuencia de nucleótidos de longitud completa del gen p40 de IL-12 humana de tipo silvestre.

La SEC ID N° 5 es una secuencia polipeptídica de longitud completa de la proteína p35 de IL-12 de ratón de tipo silvestre.

30 La SEC ID N° 6 es una secuencia de aminoácidos de longitud completa de la proteína p40 de IL-12 de ratón de tipo silvestre.

La SEC ID N° 7 es una secuencia de aminoácidos de longitud completa de la proteína p35 de IL-12 humana de tipo silvestre.

La SEC ID N° 8 es una secuencia de aminoácidos de longitud completa de la proteína p40 de IL-12 humana de tipo silvestre.

35 La SEC ID N° 9 es una secuencia de ADN de un elemento de respuesta a ecdisona encontrado en *Drosophila*.

La SEC ID N° 10 es una secuencia de ADN de un elemento de respuesta a ecdisona encontrado en *Drosophila melanogaster*.

La SEC ID N° 11 es una secuencia de ADN de un elemento de respuesta a ecdisona encontrado en *Drosophila melanogaster*.

40 La SEC ID N° 12 es el sitio de restricción I-SceI en una enzima endonucleasa constitutiva (HE).

La SEC ID N° 13 es una secuencia de ADN de vector adenoviral que comprende la secuencia codificante de IL-12 humana: Ad-RTS-hIL-12 (SP1-RheoIL-12).

45 La secuencia de aminoácidos de interferón alfa (IFN-alfa) está disponible en bases de datos públicas con el número de acceso AAA52724.

Véase también Capon et al., Mol. Cell. Biol. 5, 768-779 (1985).

Descripción detallada de la invención

50 Salvo que se define de otro modo, todos los términos de técnica, anotaciones y otros términos científicos o terminología usada en este documento pretenden tener los significados habitualmente comprendidos por los especialistas en la técnica a la que pertenece esta invención. En algunos casos, se definen términos con significados comprendidos habitualmente por motivos de claridad y/o para una fácil referencia y comprensión, y no debe interpretarse necesariamente que la inclusión de dichas definiciones en este documento indique una diferencia sustancial sobre lo comprendido generalmente en la técnica. Las definiciones habitualmente comprendidas de

55 términos de biología molecular y/o métodos y/o protocolos pueden encontrarse en Rieger et al., Glossary of Genetics: Classical and Molecular, 5ª edición, Springer-Verlag: Nueva York, 1991; Lewin, Genes V, Oxford University Press: Nueva York, 1994; Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3ª ed. 2001) y Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (1994). Según sea apropiado, los procedimientos que implican el uso de kits y/o reactivos disponibles en el mercado generalmente se realizan de acuerdo con las directrices y/o protocolos y/o parámetros del fabricante salvo que se indique otra cosa.

60

65 El término "aislado" para los propósitos de la invención indica un material biológico (célula, ácido nucleico o proteína) que se ha retirado de su entorno original (el entorno en el que está presente de forma natural). Por ejemplo, un polinucleótido presente en el estado natural en una planta o un animal no está aislado, sin embargo el mismo polinucleótido separado de los ácidos nucleicos adyacentes en que está presente de forma natural, se considera

"aislado."

El término "purificado", aplicado a materiales biológicos no requiere que el material esté presente en una forma que muestra pureza absoluta, exclusiva de la presencia de otros compuestos. En más bien una definición relativa.

"Ácido nucleico", "molécula de ácido nucleico", "oligonucleótido", y "polinucleótido" se usan de forma intercambiable y se refieren a la forma polimérica de éster de fosfato de ribonucleósidos (adenosina, guanosina, uridina o citidina; "moléculas de ARN") o desoxirribonucleósidos (desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxitimidina, o desoxicitidina; "moléculas de ADN"), o cualquier análogo fosfoéster de los mismos, tales como fosforotioatos y tioésteres, en forma monocatenaria, o hélice bicatenaria. Son posibles hélices bicatenarias ADN-ADN, ADN-ARN y ARN-ARN. La expresión molécula de ácido nucleico, y en particular molécula de ADN o ARN, se refiere solamente a la estructura primaria y secundaria de la molécula, y no se limita a ninguna forma terciaria particular. Por tanto, esta expresión incluye ADN bicatenario encontrado, *inter alia*, en moléculas de ADN lineales o circulares (por ejemplo, fragmentos de restricción), plásmidos, ADN superenrollado y cromosomas. Al analizar la estructura de moléculas particulares de ADN bicatenario, las secuencias pueden describirse en este documento de acuerdo con la convención normal que da la secuencia solamente en la dirección 5' a 3' a lo largo de la hebra no transcrita de ADN (es decir, la hebra que tiene una secuencia homóloga al ARNm). Una "molécula de ADN recombinante" es una molécula de ADN que ha experimentado manipulación por biología molecular. El ADN incluye, aunque sin limitación, ADNc, ADN genómico, ADN plasmídico, ADN sintético, y ADN semi-sintético.

El término "fragmento", aplicado a secuencias polinucleotídicas, se refiere a una secuencia de nucleótidos de longitud reducida respecto al ácido nucleico de referencia y que comprende, sobre la parte común, una secuencia de nucleótidos idéntica al ácido nucleico de referencia. Dicho fragmento de ácido nucleico de acuerdo con la invención puede estar incluido, cuando sea apropiado, en un polinucleótido más grande del cual es un constituyente. Dichos fragmentos comprenden, o como alternativa consisten en, oligonucleótidos que varían en longitud de al menos 6, 8, 9, 10, 12, 15, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 39, 40, 42, 45, 48, 50, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 70, 75, 78, 80, 90, 100, 105, 120, 135, 150, 200, 300, 500, 720, 900, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000, o más nucleótidos consecutivos de un ácido nucleico de acuerdo con la invención.

Como se usa en este documento, un "fragmento de ácido nucleico aislado" se refiere a un polímero de ARN o ADN que es mono o bicatenario, que contiene opcionalmente bases nucleotídicas sintéticas, no naturales o alteradas. Un fragmento de ácido nucleico aislado en forma de un polímero de ADN puede estar compuesto por uno o más segmentos de ADNc, ADN genómico o ADN sintético.

Un "gen" se refiere a un polinucleótido que comprende nucleótidos que codifican una molécula funcional, incluyendo moléculas funcionales producidas por transcripción solamente (por ejemplo, una especie de ARN bioactivo) o por transcripción y traducción (por ejemplo, un polipéptido). El término "gen" abarca ácidos nucleicos de ADNc y ADN genómico. "Gen" también se refiere a un fragmento de ácido nucleico que expresa un ARN, proteína o polipéptido específico, incluyendo secuencias reguladoras que preceden (secuencias no codificantes 5') y siguen (secuencias no codificantes 3') la secuencia codificante. "Gen nativo" se refiere a un gen encontrado en la naturaleza con sus propias secuencias reguladoras. "Gen quimérico" se refiere a cualquier gen que no es un gen nativo, que comprenden secuencias reguladoras y/o codificantes que no se encuentran juntas en la naturaleza. Por consiguiente, un gen quimérico puede comprender secuencias reguladoras y secuencias codificantes que se obtienen de diferentes fuentes, o secuencias reguladoras y secuencias codificantes derivadas de la misma fuente, pero dispuestas de un modo diferente al encontrado en la naturaleza. Un gen quimérico puede comprender secuencias codificantes derivadas de diferentes fuentes y/o secuencias reguladoras derivadas de diferentes fuentes. "Gen endógeno" se refiere a un gen nativo en su localización natural en el genoma de un organismo. Un gen "foráneo" o gen "heterólogo" se refiere a un gen no encontrado normalmente en el organismo hospedador, pero que se introduce en el organismo hospedador por transferencia génica. Los genes foráneos pueden comprender genes nativos insertados en un organismo no nativo, o genes quiméricos. Un "transgén" es un gen que se ha introducido en el genoma mediante un procedimiento de transformación. Por ejemplo, el gen de la interleuquina-12 (IL-12) codifica la proteína IL-12. La IL-12 es un heterodímero de una subunidad de 35-kD (p35) y una subunidad de 40-kD (p40) unidas a través de un enlace disulfuro para crear IL-12p70 completamente funcional. El gen de IL-12 codifica ambas subunidades p35 y p40.

"ADN heterólogo" se refiere a ADN no localizado de forma natural en la célula, o en un sitio cromosómico de la célula. El ADN heterólogo puede incluir un gen foráneo para la célula.

El término "genoma" incluye ADN o ARN cromosómico así como mitocondrial, cloroplástico y viral.

Una molécula de ácido nucleico "puede hibridar" con otra molécula de ácido nucleico, tal como un ADNc, ADN genómico, o ARN, cuando una forma monocatenaria de la molécula de ácido nucleico puede hibridar con la otra molécula de ácido nucleico en las condiciones apropiadas de temperatura y fuerza iónica de la solución. Las condiciones de hibridación y lavado son bien conocidas y se ejemplifican en Sambrook et al. en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1989), particularmente Capítulo 11 y Tabla 11.1 en el mismo. Las condiciones de temperatura y fuerza iónica determinan la

"rigurosidad" de la hibridación.

Las condiciones de rigurosidad pueden ajustarse para seleccionar fragmentos moderadamente similares, tales como secuencias homólogas de organismos lejanamente relacionados, hasta fragmentos muy similares, tales como genes que duplican enzimas funcionales de organismos muy relacionados. Para la selección preliminar de ácidos nucleicos homólogos, pueden usarse condiciones de hibridación de baja rigurosidad, correspondientes a una T_m de 55°, por ejemplo, SSC 5X, SDS al 0,1 %, leche al 0,25 %, y ausencia de formamida; o formamida al 30 %, SSC 5X, SDS al 0,5 %. Las condiciones de hibridación de rigurosidad moderada corresponden a una mayor T_m , por ejemplo, formamida al 40 %, con SSC 5X o 6X. Las condiciones de hibridación de alta rigurosidad corresponden a la mayor T_m , por ejemplo, formamida al 50 %, SSC 5X o 6X.

La hibridación requiere que los dos ácidos nucleicos contengan secuencias complementarias, aunque dependiendo de la rigurosidad de la hibridación, son posibles desapareamientos entre bases. El término "complementario" se usa para describir la relación entre bases nucleotídicas que son capaces de hibridar entre sí. Por ejemplo, con respecto al ADN, la adenosina es complementaria a timina y la citosina es complementaria a guanina. Por consiguiente, la invención también describe fragmentos de ácido nucleico aislados que son complementarios a las secuencias completas descritas o usadas en este documento así como aquellas secuencias de ácido nucleico sustancialmente similares.

Como se describe en este documento, los polinucleótidos se detectan empleando condiciones de hibridación que comprenden una etapa de hibridación a T_m de 55 °C y utilizando condiciones expuestas anteriormente. Como alternativa la T_m es de 60 °C, 63 °C, o 65 °C.

Los lavados post-hibridación también determinan las condiciones de rigurosidad. Una serie de condiciones usa una serie de lavados partiendo con SSC 6X, SDS al 0,5 % a temperatura ambiente durante 15 minutos (min), después se repite con SSC 2X, SDS al 0,5 % a 45 °C durante 30 min, y después se repite dos veces con SSC 0,2X, SDS al 0,5 % a 50 °C durante 30 min. Una serie preferida de condiciones rigurosas usa temperaturas mayores en que los lavados son idénticos a los anteriores excepto por la temperatura de los dos lavados finales de 30 min en SSC 0,2X, SDS al 0,5 % se aumentan hasta 60 °C. Otra serie preferida de condiciones altamente rigurosas usa dos lavados finales en SSC 0,1X, SDS al 0,1 % a 65 °C.

La rigurosidad apropiada para hibridar ácidos nucleicos depende de la longitud de los ácidos nucleicos y el grado de complementación, variables bien conocidas en la técnica. Cuando mayor sea el grado de similitud u homología entre dos secuencias de nucleótidos, mayor será el valor de T_m para híbridos de ácidos nucleicos que tienen esas secuencias. La estabilidad relativa (correspondiente a mayor T_m) de hibridaciones de ácidos nucleicos disminuye en el siguiente orden: ARN:ARN, ADN:ARN, ADN:ADN. Para híbridos de más de 100 nucleótidos de longitud, se han derivado ecuaciones para calcular la T_m (véase Sambrook *et al.*, *supra*, 9,50-0,51). Para la hibridación con ácidos nucleicos más cortos, es decir, oligonucleótidos, la posición de los desapareamientos se vuelve más importante, y la longitud del oligonucleótido determina su especificidad (véase Sambrook *et al.*, *supra*, 11,7-11,8).

Como se describe en este documento, los polinucleótidos se detectan empleando condiciones de hibridación que comprenden una etapa de hibridación en menos de 500 mM de sal y al menos 37 °C, y una etapa de lavado en SSPE 2X a una temperatura de al menos 63 °C. Como alternativa, las condiciones de hibridación comprenden menos de 200 mM de sal y al menos 37 °C para la etapa de hibridación. Como alternativa, las condiciones de hibridación comprenden SSPE 2X y 63 °C tanto para la etapa de hibridación como la de lavado.

Como se describe en este documento, la longitud de un ácido nucleico que puede hibridar es de al menos aproximadamente 10 nucleótidos. Preferiblemente una longitud mínima para un ácido nucleico que puede hibridar es de al menos aproximadamente 15 nucleótidos; por ejemplo, al menos aproximadamente 20 nucleótidos; por ejemplo, al menos 30 nucleótidos. Además, los especialistas en la técnica reconocerán que la temperatura y la concentración salina de la solución de lavado pueden ajustarse según lo necesario de acuerdo con factores tales como la longitud de la sonda.

El término "sonda" se refiere a una molécula de ácido nucleico monocatenaria que puede aparear con un ácido nucleico diana monocatenario complementario para formar una molécula bicatenaria.

Como se usa en este documento, el término "oligonucleótido" se refiere a un ácido nucleico corto que puede hibridar con una molécula de ADN genómico, una molécula de ADNc, un ADN plasmídico o una molécula de ARNm. Los oligonucleótidos pueden marcarse, por ejemplo, con ³²P-nucleótidos o nucleótidos a los que se ha conjugado covalentemente un marcador, tal como biotina. Un oligonucleótido marcado puede usarse como sonda para detectar la presencia de un ácido nucleico. Los oligonucleótidos (uno o ambos cuales pueden estar marcados) pueden usarse como cebadores de PCR, para clonar la longitud completa o un fragmento de un ácido nucleico, para secuenciación de ADN, o para detectar la presencia de un ácido nucleico. Un oligonucleótido también puede usarse para formar una triple hélice con una molécula de ADN. Generalmente, los oligonucleótidos se preparan de forma sintética, preferiblemente en un sintetizador de ácidos nucleicos. Por consiguiente, los oligonucleótidos pueden prepararse con enlaces análogos de fosfoéster de origen no natural, tales como enlaces tioéster, *etc.*

Un "cebador" se refiere a un oligonucleótido que hibrida con una secuencia de ácido nucleico diana para crear una región de ácido nucleico bicatenario que puede servir como punto de inicio para la síntesis de ADN en condiciones adecuadas de síntesis. Dichos cebadores pueden usarse en una reacción en cadena de la polimerasa o para la secuenciación de ADN.

5 La "reacción en cadena de la polimerasa" se abrevia PCR y se refiere a un método *in vitro* para amplificar enzimáticamente secuencias específicas de ácido nucleico. La PCR implica una serie repetitiva de ciclos de temperatura comprendiendo cada ciclo tres fases: desnaturalización del ácido nucleico molde para separar las hebras de la molécula diana, hibridación de un cebador oligonucleotídico de PCR monocatenario con el ácido nucleico molde, y extensión del cebador o cebadores hibridados por ADN polimerasa. La PCR proporciona un medio para detectar la presencia de una molécula diana y, en condiciones cuantitativas o semi-cuantitativas, para determinar la cantidad relativa de esa molécula diana dentro de la combinación de partida de ácidos nucleicos.

15 La "reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa" se abrevia RT-PCR y se refiere a un método *in vitro* para producir enzimáticamente una molécula o moléculas diana de ADNc a partir de una molécula o moléculas de ARN, seguido de amplificación enzimática de una secuencia o secuencias específicas de ácido nucleico dentro de la molécula o moléculas diana de ADNc como se ha descrito anteriormente. La RT-PCR también proporciona un medio para detectar la presencia de la molécula diana y, en condiciones cuantitativas o semi-cuantitativas, para determinar la cantidad relativa de la molécula diana dentro de la combinación de partida de ácidos nucleicos.

20 Una "secuencia codificante" de ADN se refiere a una secuencia de ADN bicatenaria que codifica un polipéptido y puede transcribirse y traducirse en un polipéptido en una célula *in vitro* o *in vivo* cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras adecuadas. "Secuencias reguladoras adecuadas" se refiere a secuencias de nucleótidos localizadas cadena arriba (secuencias no codificantes 5'), dentro, o cadena abajo (secuencias no codificantes 3') de una secuencia codificante, y que influyen en la transcripción, procesamiento o estabilidad del ARN, o traducción de la secuencia codificante asociada. Las secuencias reguladoras pueden incluir promotores, secuencias líder de la transcripción, intrones, secuencias de reconocimiento de poliadenilación, sitios de procesamiento de ARN, sitios de unión de efectores y estructuras tronco-bucle. Los límites de la secuencia codificante se determinan mediante un codón de inicio en el extremo 5' (amino) y un codón de parada de la traducción en el extremo 3' (carboxilo). Una secuencia codificante puede incluir, aunque sin limitación, secuencias procariotas, ADNc de ARNm, secuencias de ADN genómico, e incluso secuencias de ADN sintético. Si la secuencia codificante está pretendida para su expresión en una célula eucariota, una señal de poliadenilación y secuencia de terminación de la transcripción estarán habitualmente localizadas 3' a la secuencia codificante.

35 "Fase de lectura abierta" se abrevia ORF y se refiere a una longitud de secuencia de ácido nucleico, ya sea ADN, ADNc o ARN, que comprenden una señal de inicio de la traducción o codón de inicio, tal como un ATG o AUG, y un codón de terminación y puede traducirse potencialmente en una secuencia polipeptídica.

40 La expresión "cabeza con cabeza" se usa en este documento para describir la orientación de dos secuencias polinucleotídicas en relación entre sí. Dos polinucleótidos se posicionan en una orientación cabeza con cabeza cuando el extremo 5' de la hebra codificante de un polinucleótido está adyacente al extremo 5' de la hebra codificante del otro polinucleótido, mediante lo cual la dirección de transcripción de cada polinucleótido avanza desde el extremo 5' del otro polinucleótido. La expresión "cabeza con cabeza" puede abreviarse (5')-con-(5') y puede también indicarse por los símbolos ($\leftarrow \rightarrow$) o ($3' \leftarrow 5' 5' \rightarrow 3'$).

45 La expresión "cola con cola" se usa en este documento para describir la orientación de dos secuencias polinucleotídicas en relación entre sí. Dos polinucleótidos se posicionan en una orientación cola con cola cuando el extremo 3' de la hebra codificante de un polinucleótido está adyacente al extremo 3' de la hebra codificante del otro polinucleótido, mediante lo cual la dirección de transcripción de cada polinucleótido avanza hacia el otro polinucleótido. La expresión "cola con cola" puede abreviarse (3')-con-(3') y también puede indicarse por los símbolos ($\rightarrow \leftarrow$) o ($5' \rightarrow 3' 3' \leftarrow 5'$).

50 La expresión "cabeza con cola" se usa en este documento para describir la orientación de dos secuencias polinucleotídicas en relación entre sí. Dos polinucleótidos se posicionan en una orientación cabeza con cola cuando el extremo 5' de la hebra codificante de un polinucleótido está adyacente al extremo 3' de la hebra codificante del otro polinucleótido, mediante lo cual la dirección de transcripción de cada avanza en la misma dirección que la del otro polinucleótido. La expresión "cabeza con cola" puede abreviarse (5')-con-(3') y también puede indicarse por los símbolos ($\rightarrow \rightarrow$) o ($5' \rightarrow 3' 5' \rightarrow 3'$).

60 El término "cadena abajo" se refiere a una secuencia de nucleótidos que está localizada 3' a una secuencia de nucleótidos de referencia. En particular, las secuencias de nucleótidos cadena abajo generalmente se refieren a secuencias que siguen al punto de inicio de la transcripción. Por ejemplo, el codón de inicio de la traducción de un gen está localizado cadena abajo del sitio de inicio de la transcripción.

65 El término "cadena arriba" se refiere a una secuencia de nucleótidos que está localizada 5' a una secuencia de nucleótidos de referencia. En particular, las secuencias de nucleótidos cadena arriba generalmente se refieren

secuencias que están localizadas en el lado 5' de una secuencia codificante o punto de inicio de la transcripción. Por ejemplo, la mayoría de los promotores están localizados cadena arriba del sitio de inicio de la transcripción.

Las expresiones "endonucleasa de restricción" y "enzima de restricción" se usan de forma intercambiable y se refieren a enzimas que se unen y cortan dentro de una secuencia específica de nucleótidos dentro de ADN bicatenario.

"Recombinación homóloga" se refiere a la inserción de una secuencia foránea de ADN en otra molécula de ADN, por ejemplo, inserción de un vector en un cromosoma. Preferiblemente, el vector está dirigido a un sitio cromosómico específico para recombinación homóloga. Para recombinación homóloga específica, el vector contendrá regiones suficientemente largas de homología con secuencias del cromosoma para permitir la unión complementaria e incorporación del vector en el cromosoma. Regiones más largas de homología, y grados mayores de similitud de secuencia, pueden aumentar la eficacia de recombinación homóloga.

Pueden usarse varios métodos conocidos en la técnica para propagar un polinucleótido. Una vez establecido un sistema hospedador adecuado y las condiciones de crecimiento, los vectores de expresión recombinante pueden propagarse y prepararse en cantidad. Como se describe en este documento, los vectores de expresión que pueden usarse incluyen, aunque sin limitación, los siguientes vectores o sus derivados: virus humanos o animales tales como virus vaccinia o adenovirus; virus de insecto tales como baculovirus; vectores de levadura; vectores bacteriófagos (por ejemplo, lambda), y vectores de ADN plasmídicos y cósmidos, por nombrar unos pocos.

Un "vector" se refiere a cualquier vehículo para la clonación de y/o transferencia de un ácido nucleico en una célula hospedadora. Un vector puede ser un replicón al cual puede unirse otro segmento de ADN para conseguir la replicación del segmento unido. Un "replicón" se refiere a cualquier elemento genético (por ejemplo, plásmido, fago, cósmido, cromosoma, virus) que funciona como unidad autónoma de replicación de ADN *in vivo*, es decir, con capacidad de replicación bajo su propio control. El término "vector" incluye tanto vehículos viral como no virales para introducir el ácido nucleico en una célula *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Puede usarse una gran cantidad de vectores conocidos en la técnica para manipular ácido nucleicos, incorporar elementos de respuesta y promotores en genes, etc. Los posibles vectores incluyen, por ejemplo, plásmidos o virus modificados incluyendo, por ejemplo bacteriófagos tales como derivados de lambda, o plásmidos tales como pBR322 o derivados del plásmido pUC, o el vector Bluescript. Otro ejemplo de vectores que son útiles en la invención es el sistema de producción UltraVector™ (Intrexon Corp., Blacksburg, VA) como se describe en el documento WO 2007/038276. Por ejemplo, la inserción de los fragmentos de ADN correspondientes a elementos de respuesta y promotores en un vector adecuado puede realizarse ligando los fragmentos apropiados de ADN en un vector elegido que tiene extremos cohesivos complementarios. Como alternativa, los extremos de las moléculas de ADN pueden modificarse enzimáticamente o puede producirse cualquier sitio ligando secuencias de nucleótidos (enlazadores) en los extremos del ADN. Dichos vectores pueden modificarse por ingeniería para que contengan genes marcadores de selección que proporcionan selección de células que ha incorporado el marcador en el genoma celular. Dichos marcadores permiten la identificación y/o selección de células hospedadoras que incorporar y expresan las proteínas codificadas por el marcador.

Se han usado vectores virales, y particularmente vectores retrovirales, en una amplia diversidad de aplicaciones de suministro de genes en células, así como sujetos animales vivos. Los vectores virales que pueden usarse incluyen, aunque sin limitación, vectores de retrovirus, virus adeno-asociado, poxvirus, baculovirus, vaccinia, virus del herpes simple, Epstein-Barr, adenovirus, geminivirus, y caulimovirus. Los vectores no virales incluyen plásmidos, liposomas, lípidos cargados eléctricamente (citofectinas), complejos ADN-proteína, y biopolímeros. Además de un ácido nucleico, un vector también puede comprender una o más regiones reguladoras, y/o marcadores de selección útiles en la selección, medición, y control de los resultados de transferencia del ácido nucleico (transferencia a cuales de los tejidos, duración de expresión, etc.).

El término "plásmido" se refiere a un elemento extra-cromosómico que porta a menudo un gen que no es parte del metabolismo central de la célula, y habitualmente en forma de moléculas circulares de ADN bicatenario. Dichos elementos pueden ser secuencias de replicación autónoma, secuencias de integración en el genoma, secuencias de fago o nucleótidos, ADN o ARN mono o bicatenario lineal, circular, o superenrollado, derivado de cualquier fuente, en que varias secuencias de nucleótidos se han unido o recombinado en una única construcción que es capaz de introducir un fragmento promotor y secuencia de ADN para un producto génico seleccionado junto con secuencia apropiada no traducida 3' en una célula.

Un "vector de clonación" se refiere a un "replicón", que es una longitud unitaria de un ácido nucleico, preferiblemente ADN, que se replica secuencialmente y que comprende un origen de replicación, tal como un plásmido, fago o cósmido, al que puede unirse otro segmento de ácido nucleico para conseguir la replicación del segmento unido. Los vectores de clonación pueden tener capacidad de replicación en un tipo celular y de expresión en otro ("vector lanzadera"). Los vectores de clonación pueden comprender una o más secuencias que pueden usarse para la selección de células que comprenden el vector y/o uno o más sitios de clonación múltiple para la inserción de secuencias de interés.

El término "vector de expresión" se refiere a un vector, plásmido o vehículo diseñado para posibilitar la expresión de una secuencia insertada de ácido nucleico después de su transformación en el hospedador. El gen clonado, es decir, la secuencia insertada de ácido nucleico, habitualmente se coloca bajo el control de elementos de control tales como un promotor, un promotor mínimo, un potenciador, o similares. Las regiones de control del inicio o promotores, que son útiles para dirigir la expresión de un ácido nucleico en la célula hospedadora deseada son numerosos y familiares para los especialistas en la técnica. Puede usarse casi cualquier promotor capaz de dirigir la expresión de estos genes en un vector de expresión, incluyendo aunque sin limitación, promotores virales, promotores bacterianos, promotores animales, promotores de mamífero, promotores sintéticos, promotores constitutivos, promotores específicos de tejido, promotores relacionados con patogénesis o enfermedad, promotores específicos del desarrollo, promotores inducibles, promotores regulados por la luz; *CYC1*, *HIS3*, *GAL1*, *GAL4*, *GAL10*, *ADH1*, *PGK*, *PHO5*, *GAPDH*, *ADC1*, *TRP1*, *URA3*, *LEU2*, *ENO*, *TPI*, promotores de fosfatasa alcalina (útiles para la expresión en *Saccharomyces*); promotor *AOXI* (útil para la expresión en *Pichia*); promotores de β -lactamasa, *lac*, *ara*, *tet*, *trp*, *IP_L*, *IP_R*, *T7*, *tac*, y *trc* (útiles para la expresión en *Escherichia coli*); del virus del mosaico de la coliflor 35S regulado por la luz, específico de semillas, específico de polen, específico de ovario, mínimo de CMV 35S, virus del mosaico de la vena de la yuca (CsVMV), de proteína de unión a clorofila a/b, ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa, específico de brotes, específico de raíces, quitinasa, inducible por estrés, virus baciliforme del tungro del arroz, súper-promotor de plantas, de leucina aminopeptidasa de patata, de nitrato reductasa, manopina sintasa, nopalina sintasa, ubiquitina, proteína zeína, y promotores de antocianina (útiles para la expresión en células vegetales); promotores animales y de mamífero conocidos en la técnica incluyendo, aunque sin limitación, la región promotora temprana de SV40 (SV40e), el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' (LTR) del virus del sarcoma de Rous (RSV), los promotores del E1A o promotor tardío principal (MLP) de genes de adenovirus (Ad), el promotor temprano de citomegalovirus (CMV), el promotor de la timidina quinasa (TK) del virus del herpes simple (HSV), un promotor IE1 de baculovirus, un promotor del factor de elongación 1 alfa (EF1), un promotor de fosfoglicerato quinasa (PGK), un promotor de ubiquitina (Ubc), un promotor de albúmina, las secuencias reguladoras del promotor de la metalotioneína-L de ratón y regiones de control transcripcional, los promotores ubicuos (HPRT, vimentina, α -actina, tubulina y similares), los promotores de los filamentos intermedios (desmina, neurofilamentos, queratina, GFAP, y similares), los promotores de genes terapéuticos (de MDR, CFTR o tipo factor VIII, y similares), promotores relacionados con patogénesis o enfermedad, y promotores que muestran especificidad de tejido y se han utilizado en animales transgénicos, tales como la región de control del gen de la elastasa I que es activa en células acinares pancreáticas; región de control del gen de la insulina activa en células beta pancreáticas, región de control del gen de inmunoglobulina activa en células linfoides, región de control del virus del tumor mamario en ratón activa en células testiculares, de mama, linfoides y mastocitos; regiones de control del gen de la albúmina, Apo AI y Apo AII activas en hígado, región de control del gen de la alfa-fetoproteína activa en hígado, región de control del gen de la alfa 1-antitripsina activa en el hígado, región de control del gen de la beta-globina activa en células mieloides, región de control del gen de la proteína básica mielina activa en células oligodendrocitos en el cerebro, región de control del gen de la cadena-2 ligera de miosina activa en músculo esquelético, y región de control del gen de la hormona liberadora gonadotrópica activa en el hipotálamo, promotor de la piruvato quinasa, promotor de la villina, promotor de la proteína intestinal de unión a ácido graso, promotor de la α -actina de células de músculo liso, y similares. Además, estas secuencias de expresión pueden modificarse mediante la adición de potenciadores o secuencias reguladoras y similares.

Los vectores pueden introducirse en las células hospedadoras deseadas por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, transfección, electroporación, microinyección, transducción, fusión celular, DEAE dextrano, precipitación con fosfato de calcio, lipofección (fusión de lisosomas), uso de una pistola génica, o un transportador de vector de ADN (véase, por ejemplo, Wu et al., J. Biol. Chem. 267:963 (1992); Wu et al., J. Biol. Chem. 263:14621 (1988); y Hartmut *et al.*, solicitud de patente canadiense N° 2.012.311).

Un polinucleótido también puede introducirse *in vivo* por lipofección. Durante la pasada década ha ido creciendo el uso de liposomas para la encapsulación y transfección de ácidos nucleicos *in vitro*. Pueden usarse lípidos catiónicos sintéticos diseñados para limitar las dificultades y peligros encontrados con la transfección mediada por liposomas para preparar liposomas para la transfección *in vivo* de un gen que codifica un marcador (Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84:7413 (1987); Mackey et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8027 (1988); y Ulmer et al., Science 259:1745 (1993)). El uso de lípidos catiónicos puede promover la encapsulación de ácidos nucleicos cargados negativamente, y también promover la fusión con membranas celulares cargadas negativamente (Felgner et al., Science 337:387 (1989)). Los compuestos y composiciones lipídicos particularmente útiles para la transferencia de ácidos nucleicos se describen en los documentos WO95/18863, WO96/17823 y U.S. 5.459.127. El uso de lipofección para introducir genes exógenos en los órganos específicos *in vivo* tiene ciertas ventajas prácticas. El direccionamiento molecular de liposomas a células específicas representa un área de beneficio. Está claro que el direccionamiento de la transfección a tipos celulares particulares se preferiría particularmente en un tejido con heterogeneidad celular, tal como páncreas, hígado, riñón, y cerebro. Los lípidos pueden acoplarse químicamente a otras moléculas con fines de direccionamiento (Mackey *et al.* 1988, *supra*). Los péptidos diana, por ejemplo, hormonas o neurotransmisores, y proteínas tales como anticuerpos, o moléculas no peptídicas podrían acoplarse a liposomas químicamente.

Otras moléculas también son útiles para facilitar la transfección de un ácido nucleico *in vivo*, tal como un oligopéptido catiónico (por ejemplo, documento WO95/21931), péptidos derivados de proteínas de unión a ADN (por ejemplo,

documento WO96/25508), o un polímero catiónico (por ejemplo, documento WO95/21931).

También es posible introducir un vector *in vivo* como plásmido de ADN desnudo (véanse las patentes de Estados Unidos N° 5.693.622, 5.589.466 y 5.580.859). También pueden usarse enfoques de suministro de ADN mediado por receptor (Curiel et al., Hum. Gene Ther. 3:147 (1992); y Wu et al., J. Biol. Chem. 262:4429 (1987)).

El término "transfección" se refiere a la captación de ARN o ADN exógeno o heterólogo por una célula. Una célula se ha "transfectado" por ARN o ADN exógeno o heterólogo cuando dicho ARN o ADN se ha introducido dentro de la célula. Una célula se ha "transformado" por ARN o ADN exógeno o heterólogo cuando el ARN o ADN transfectado realiza un cambio fenotípico. El ARN o ADN transformante puede integrarse (unirse covalentemente) en el ADN cromosómico que compone el genoma de la célula.

"Transformación" se refiere a la transferencia de un fragmento de ácido nucleico en el genoma de un organismo hospedador, que provoca herencia genéticamente estable. Los organismos hospedadores que contienen los fragmentos transformados de ácido nucleico se mencionan como organismos "transgénicos" o "recombinantes" o "transformados".

Además, el vector recombinante que comprende un polinucleótido como se describe en este documento puede incluir uno o más orígenes para la replicación en los hospedadores celulares en que se busca su amplificación o su expresión, marcadores o marcadores de selección.

El término "marcador de selección" se refiere a un factor de identificación, habitualmente un gen de resistencia a antibiótico o agente químico, que es capaz de seleccionarse basado en efecto del gen marcador, es decir, resistencia a un antibiótico, resistencia a un herbicida, marcadores colorimétricos, enzimas, marcadores fluorescentes, y similares, donde el efecto se usa para rastrear la herencia de un ácido nucleico de interés y/o para identificar una célula u organismo que ha heredado el ácido nucleico de interés. Ejemplos de genes marcadores de selección conocidos y usados en la técnica incluyen: genes que proporcionan resistencia a ampicilina, estreptomycin, gentamicina, kanamicina, higromicina, herbicida bialaphos, sulfonamida, y similares; y genes que se usan como marcadores fenotípicos, es decir, genes reguladores de antocianina, gen de isopentasil transferasa, y similares.

El término "gen informador" se refiere a un ácido nucleico que codifica un factor de identificación que se puede identificar basándose en el efecto del gen informador, donde el efecto se usa para rastrear la herencia de un ácido nucleico de interés, para identificar una célula u organismo que ha heredado el ácido nucleico de interés, y/o para medir la inducción de expresión génica o transcripción. Ejemplos de genes informadores conocidos y usados en la técnica incluyen: luciferasa (Luc), proteína fluorescente verde (GFP), cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), β -galactosidasa (LacZ), β -glucuronidasa (Gus), y similares. Los genes marcadores de selección también pueden considerarse genes informadores.

"Promotor" y "secuencia promotora" se usan de forma intercambiable y se refieren a una secuencia de ADN capaz de controlar la expresión de una secuencia codificante o ARN funcional. En general, una secuencia codificante está localizada 3' a una secuencia promotora. Los promotores pueden obtenerse en su totalidad de un gen nativo, o pueden estar compuestos por diferentes elementos derivados de diferentes promotores encontrados en la naturaleza, o incluso comprender segmentos de ADN sintético. Los especialistas en la técnica entienden que diferentes promotores pueden dirigir la expresión de un gen en diferentes tejidos o tipos celulares, o en diferentes fases de desarrollo, o en respuesta a diferentes condiciones ambientales o fisiológicas. Los promotores que causan que un gen se exprese en la mayoría de tipos celulares la mayor parte del tiempo se mencionan comúnmente como "promotores constitutivos". Los promotores que causan que un gen se exprese en un tipo celular específico se mencionan comúnmente como "promotores específicos de célula" o "promotores específicos de tejido". Los promotores que causan que un gen se exprese en una fase específica de desarrollo o diferenciación celular se mencionan comúnmente como "promotores específicos del desarrollo" o "promotores específicos de diferenciación celular". Los promotores que se inducen y causan que un gen se exprese después de exposición o tratamiento de la célula con un agente, molécula biológica, agente químico, ligando, luz, o similares que induce a ese promotor se mencionan comúnmente como "promotores inducibles" o "promotores regulables". Se reconocerá adicionalmente que como en la mayoría de los casos los límites exactos de las secuencias reguladoras no se han definido completamente, fragmentos de ADN de diferentes longitudes pueden tener actividad promotora idéntica.

La secuencia promotora está normalmente limitada en su extremo 3' por el sitio de inicio de la transcripción y se extiende cadena arriba (dirección 5') para incluir la cantidad mínima de bases o elementos necesarios para iniciar la transcripción a niveles detectable por encima de los de fondo. Dentro de la secuencia promotora se encontrará un sitio de inicio de la transcripción (convenientemente definido por ejemplo, por mapeo con nucleasa S1), así como dominios de unión a proteína (secuencias consenso) responsables de la unión de la ARN polimerasa.

Una secuencia codificante está "bajo el control" de secuencias de control de la transcripción y la traducción en una célula cuando la ARN polimerasa transcribe la secuencia codificante en ARNm, que después sufre corte y ajuste de trans-ARN (si la secuencia codificante contiene intrones) y se traduce en la proteína codificada por la secuencia

codificante.

"Secuencias de control de la transcripción y la traducción" se refiere a secuencias reguladoras de ADN, tales como promotores, potenciadores, terminadores, y similares, que proporcionan la expresión de una secuencia codificante en una célula hospedadora. En células eucariotas, las señales de poliadenilación son secuencias de control.

El término "elemento de respuesta" se refiere a uno o más elementos de ADN de acción en cis que confieren sensibilidad en un promotor mediada a través de la interacción con los dominios de unión a ADN de un factor de transcripción. Este elemento de ADN puede ser palindrómico (perfecto o imperfecto) en su secuencia o puede estar compuesto por motivos de secuencia o semi-sitios separados por una cantidad variable de nucleótidos. Los semi-sitios pueden ser similares o idénticos y pueden estar dispuestos como repeticiones directas o invertidas o como un único semi-sitio o múltiplos de semi-sitios adyacentes en tándem. El elemento de respuesta puede comprender un promotor mínimo aislado de diferentes organismos dependiendo de la naturaleza de la célula u organismo en que se incorporará el elemento de respuesta. El dominio de unión a ADN del factor de transcripción se une, en presencia o ausencia de un ligando, a la secuencia de ADN de un elemento de respuesta para iniciar o suprimir la transcripción de uno o más genes cadena abajo bajo la regulación de este elemento de respuesta. Ejemplos de secuencias de ADN para elementos de respuesta del receptor de ecdisona natural incluyen: RGGG/TTCANTGAC/ACY (SEC ID N° 9) (véase Cherbas et al., Genes Dev. 5:120 (1991)); AGGTCAN_(n)AGGTCA, donde N_(n) puede ser uno o más nucleótidos espaciadores (SEC ID N° 10) (véase D'Avino et al., Mol. Cell. Endocrinol. 113:1 (1995)); y GGGTTGAATGAATTT (SEC ID N° 11) (véase Antoniewski et al., Mol. Cell Biol. 14:4465 (1994)).

La expresión "unido de forma funcional" se refiere a la asociación de secuencias de ácido nucleico en un único fragmento de ácido nucleico de modo que la función de una esté afectada por la otra. Por ejemplo, un promotor está unido de forma funcional con una secuencia codificante cuando es capaz de afectar a la expresión de esa secuencia codificante (es decir, que la secuencia codificante está bajo el control transcripcional del promotor). Las secuencias codificantes pueden unirse de forma funcional a secuencias reguladoras en orientación con sentido o antisentido.

El término "expresión" como se usa en este documento se refiere a la transcripción y acumulación estable de ARN con sentido (ARNm) o antisentido derivado de un ácido nucleico o polinucleótido. Expresión también puede hacer referencia a la traducción de ARNm en una proteína o polipéptido.

Las expresiones "casete", "casete de expresión" y "casete de expresión génica" se refieren a un segmento de ADN que puede insertarse en un ácido nucleico o polinucleótido en sitios específicos de restricción o por recombinación homóloga. El segmento de ADN comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés, y el casete y los sitios de restricción se diseñan para asegurar la inserción del casete en la fase de lectura apropiada para su transcripción y traducción. "Casete de transformación" se refiere a un vector específico que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés y que tiene elementos además del polinucleótido que facilitan la transformación de una célula hospedadora particular. Los casetes, casetes de expresión, casetes de expresión génica y casetes de transformación de la invención también pueden comprender elementos que permiten la expresión potenciada de un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés en una célula hospedadora. Estos elementos pueden incluir, aunque sin limitación: un promotor, un promotor mínimo, un potenciador, un elemento de respuesta, una secuencia terminadora, una secuencia de poliadenilación, y similares.

Como se usa en este documento, la expresión "conmutador génico" se refiere a la combinación de un elemento de respuesta asociado con un promotor, y un sistema basado en factor de transcripción dependiente de ligando que, en presencia de uno o más ligandos, modula la expresión de un gen en que el elemento de respuesta y el promotor están incorporados. La expresión "un polinucleótido que codifica un conmutador génico" se refiere a la combinación de un elemento de respuesta asociado con un promotor, y un polinucleótido que codifica un sistema basado en factor de transcripción dependiente de ligando que, en presencia de uno o más ligandos, modula la expresión de un gen en que el elemento de respuesta y el promotor están incorporados.

La expresión "basado en receptor de ecdisona", con respecto a un conmutador génico, se refiere a un conmutador génico que comprende al menos una parte funcional de un dominio de unión a ligando del receptor de ecdisona de origen natural o sintético y que regula la expresión génica en respuesta a un ligando que se une al dominio de unión a ligando del receptor de ecdisona. Ejemplos de sistemas sensibles a ecdisona se describen en las patentes de Estados Unidos N° 7.091.038 y 6.258.603. En una realización, el sistema es el sistema terapéutico RheoSwitch® (RTS), que contiene dos proteínas de fusión, los dominios DEF de un receptor de ecdisona mutagenizado (EcR) fusionado con un dominio de unión a ADN Gal4 y los dominios EF de un RXR químico fusionado con un dominio de activación de la transcripción VP16, expresados bajo un promotor constitutivo como se ilustra en la FIG. 1.

Los términos "modular" y "modula" significan inducir, reducir o inhibir la expresión de ácido nucleico o génica, provocando la respectiva inducción, reducción o inhibición de la producción de proteína o polipéptido.

Los polinucleótidos o vectores descritos en este documento pueden comprender adicionalmente al menos un promotor adecuado para dirigir la expresión de un gen en una célula hospedadora.

Los potenciadores que pueden usarse en este documento incluyen aunque sin limitación: un potenciador de SV40, un potenciador de citomegalovirus (CMV), un potenciador del factor de elongación 1 (EF1), potenciadores de levadura, potenciadores de genes virales, y similares.

5 Las regiones de control de la terminación, es decir, el terminador o secuencias de poliadenilación, también pueden obtenerse de diversos genes nativos para los hospedadores preferidos. Opcionalmente, un sitio de terminación puede ser innecesario, sin embargo, es más preferido incluirlo.

10 La región de control de la terminación puede estar compuesta o puede obtenerse a partir de una secuencia sintética, señal de poliadenilación sintética, una señal de poliadenilación tardía de SV40, una señal de poliadenilación de SV40, una señal de poliadenilación de hormona de crecimiento bovina (BGH), secuencias terminadoras virales, o similares.

15 Las expresiones "secuencias no codificantes 3'" o "región no traducida 3' (UTR)" se refieren a secuencias de ADN localizadas cadena abajo (3') de una secuencia codificante y pueden comprender secuencias de reconocimiento de poliadenilación [poli(A)] y otras secuencias que codifican señales reguladoras capaces de afectar al procesamiento del ARNm o la expresión génica. La señal de poliadenilación se caracteriza habitualmente porque afecta a la adición de extensiones de ácido poliadenílico al extremo 3' del precursor de ARNm.

20 "Región reguladora " se refiere a una secuencia de ácido nucleico que regula la expresión de una segunda secuencia de ácido nucleico. Una región reguladora puede incluir secuencias que son responsables de forma natural de expresar un ácido nucleico particular (una región homóloga) o pueden incluir secuencias de un origen diferente que son responsables de expresar diferentes proteínas o incluso proteínas sintéticas (una región heteróloga). En particular, las secuencias pueden ser secuencias de genes procariontes, eucariontes, o virales u obtenidas de
25 secuencias que estimulan o reprimen la transcripción de un gen de un modo específico o no específico y de un modo inducible o no inducible. Las regiones reguladoras incluyen orígenes de replicación, sitios de corte y ajuste de ARN, promotores, potenciadores, secuencias de terminación de la transcripción, y secuencias señal que dirigen el polipéptido a las vías secretoras de la célula diana.

30 Una región reguladora de una "fuente heteróloga" se refiere a una región reguladora que no está asociada de forma natural con el ácido nucleico expresado. Se incluyen entre las regiones reguladoras heterólogas las regiones reguladoras de una especie diferente, regiones reguladoras de un gen diferente, secuencias reguladoras híbridas, y secuencias reguladoras que no existen en la naturaleza, pero que las diseñan los especialistas en la técnica.

35 "Transcrito de ARN" se refiere al producto resultante de la transcripción catalizada por la ARN polimerasa de una secuencia de ADN. Cuando el transcrito de ARN es una copia complementaria perfecta de la secuencia de ADN, se menciona como transcrito primario o puede ser una secuencia de ARN derivada de procesamiento post-transcripcional del transcrito primario y se menciona como ARN maduro. "ARN mensajero (ARNm)" se refiere al ARN que no tiene intrones y que puede traducirse en proteína por la célula. "ADNc" se refiere a un ADN bicatenario que
40 es complementario a y derivado de ARNm. ARN "con sentido" se refiere a un transcrito de ARN que incluye el ARNm y así puede traducirse en proteína por la célula. ARN "antisentido" se refiere a un transcrito de ARN que es complementario a todo o parte de un transcrito primario diana o ARNm y que bloquea la expresión de un gen diana. La complementariedad de un ARN antisentido puede ser con cualquier parte del transcrito génico específico, es decir, en la secuencia no codificante 5', secuencia no codificante 3', o la secuencia codificante. "ARN funcional" se
45 refiere a ARN antisentido, ARN ribozima, u otro ARN que no se tradujo pero tiene un efecto sobre los procesos celulares.

"Polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan de forma intercambiable y se refieren a un compuesto polimérico compuesto por restos de aminoácido unidos covalentemente.

50 Un "polipéptido aislado", "péptido aislado" o "proteína aislada" se refieren a un polipéptido o proteína que está sustancialmente libre de aquellos compuestos que se encuentran normalmente asociados con el mismo en su estado natural (por ejemplo, otras proteínas o polipéptidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos). "Aislado" no indica la exclusión de mezclas artificiales o sintéticas con otros compuestos, o la presencia de impurezas que no
55 interfieren con la actividad biológica, y que pueden estar presentes, por ejemplo, debido a purificación incompleta, adición de estabilizadores, o composición en una preparación farmacéuticamente aceptable.

Se entenderá que un "polipéptido mutante de sustitución" o un "mutante de sustitución" indica un polipéptido mutante que comprende una sustitución de al menos un amino de tipo silvestre o de origen natural con un aminoácido
60 diferente respecto al polipéptido de tipo silvestre o de origen natural. Un polipéptido mutante de sustitución puede comprender solamente una sustitución de aminoácido de tipo silvestre o de origen natural y puede mencionarse como polipéptido "mutante puntual" o "mutante puntual sencillo". Como alternativa, un polipéptido mutante de sustitución puede comprender una sustitución de dos o más aminoácidos de tipo silvestre o de origen natural con dos o más aminoácidos respecto al polipéptido de tipo silvestre o de origen natural. De acuerdo con la invención, un
65 polipéptido de dominio de unión a ligando de receptor nuclear Grupo H que comprende una mutación de sustitución comprende una sustitución de al menos un aminoácido de tipo silvestre o de origen natural con un aminoácido

diferente respecto al polipéptido de dominio de unión a ligando de receptor nuclear Grupo H de tipo silvestre o de origen natural.

5 Cuando el polipéptido mutante de sustitución comprende una sustitución de dos o más aminoácidos de tipo silvestre o de origen natural, esta sustitución puede comprender cualquier cantidad equivalente de aminoácidos de tipo silvestre o de origen natural delecionados para la sustitución, es decir, 2 aminoácidos de tipo silvestre o de origen natural reemplazados con 2 aminoácidos no de tipo silvestre o no de origen natural, o una cantidad no equivalente de aminoácidos de tipo silvestre delecionados para la sustitución, es decir, 2 aminoácidos de tipo silvestre reemplazados con 1 aminoácido no de tipo silvestre (una mutación de sustitución+delección), o 2 aminoácidos de tipo silvestre reemplazados con 3 aminoácidos no de tipo silvestre (una mutación de sustitución+inserción).

15 Los mutantes de sustitución pueden describirse usando un sistema de nomenclatura abreviado para indicar el resto de aminoácido y número reemplazado dentro de la secuencia polipeptídica de referencia y el nuevo resto de aminoácido sustituido. Por ejemplo, un mutante de sustitución en que el vigésimo (20º) resto de aminoácido de un polipéptido está sustituido puede abreviarse como "x20z", donde "x" es el aminoácido a reemplazar, "20" es la posición o número del resto de aminoácido dentro del polipéptido, y "z" es el nuevo aminoácido sustituido. Por lo tanto, un mutante de sustitución abreviado de forma intercambiable como "E20A" o "Glu20Ala" indica que el mutante comprende un resto de alanina (comúnmente abreviado en la técnica como "A" o "Ala") en lugar del ácido glutámico (comúnmente abreviado en la técnica como "E" o "Glu") en la posición 20 del polipéptido.

20 Una mutación de sustitución puede hacerse por cualquier técnica de mutagénesis conocida en la técnica, incluyendo aunque sin limitación, mutagénesis dirigida al sitio *in vitro* (Hutchinson et al., J. Biol. Chem. 253:6551 (1978); Zoller et al., DNA 3:479 (1984); Oliphant et al., Gene 44:177 (1986); Hutchinson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:710 (1986)), uso de enlazadores TAB® (Pharmacia), digestión con endonucleasa de restricción/delección y sustitución de fragmentos, mutagénesis mediada por PCR/ dirigida por oligonucleótido, y similares. Se prefieren técnicas basadas en PCR para mutagénesis dirigida al sitio (véase Higuchi, 1989, "Using PCR to Engineer DNA", en PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, H. Erlich, ed., Stockton Press, Capítulo 6, pág. 61-70).

30 El término "fragmento", aplicado a un polipéptido, se refiere a un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos es más corta que la del polipéptido de referencia y que comprende, sobre la parte completa con estos polipéptidos de referencia, una secuencia de aminoácidos idéntica. Dichos fragmentos puede, cuando sea apropiado, incluirse en un polipéptido más grande del cual son una parte. Dichos fragmentos de un polipéptido de acuerdo con la invención pueden tener una longitud de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 25, 26, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 200, 240, o 300 o más aminoácidos.

35 Una "variante" de un polipéptido o proteína se refiere a cualquier análogo, fragmento, derivado, o mutante que se obtiene de un polipéptido o proteína y que retiene al menos una propiedad biológica del polipéptido o proteína. Pueden existir diferentes variantes del polipéptido o proteína en la naturaleza. Estas variantes pueden ser variaciones alélicas caracterizadas por diferentes en las secuencias de nucleótidos del gen estructural que codifica la proteína, o pueden implicar corte y ajuste diferencial o modificación post-traduccional. Los especialistas en la técnica pueden producir variantes que tienen una o múltiples sustituciones, delecciones, adiciones, o reemplazos de aminoácido. Estas variantes pueden incluir, *inter alia*: (a) variantes en que uno o más restos de aminoácido están sustituidos con aminoácidos conservativos o no conservativos, (b) variantes en que uno o más aminoácidos están añadidos al polipéptido o proteína, (c) variantes en que uno o más de los aminoácidos incluye un grupo sustituyente, y (d) variantes en que el polipéptido o proteína está fusionado con otro polipéptido tal como albúmina sérica. Las técnicas para obtener estas variantes, incluyendo técnicas genéticas (supresiones, delecciones, mutaciones, etc.), químicas, y enzimáticas, son conocidas para los especialistas en la técnica. En una realización, un polipéptido variante comprende al menos aproximadamente 14 aminoácidos.

50 El término "homología" se refiere al porcentaje de identidad entre dos restos de polinucleótido o dos de polipéptido. La correspondencia entre la secuencia de un resto con otro puede determinarse por técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, la homología puede determinarse por comparación directa de la información de secuencia entre dos moléculas de polipéptido alineando la información de secuencia y usando programas informáticos fácilmente disponibles. Como alternativa, la homología puede determinarse por hibridación de polinucleótidos en condiciones que forman dúplex estables entre regiones homólogas, seguido de digestión con nucleasas específicas de una hebra y determinación del tamaño de los fragmentos digeridos.

60 Como se usa en este documento, el término "homólogo" en todas sus formas gramaticales y variaciones ortográficas se refiere a la relación entre proteínas que tienen un "origen evolutivo común", incluyendo proteínas de superfamilias (por ejemplo, la superfamilia de inmunoglobulina) y proteínas homólogas de diferentes especies (por ejemplo, cadena ligera de miosina, etc.) (Reeck *et al.*, *Cell* 50:667 (1987)). Dichas proteínas (y sus genes codificantes) tienen homología de secuencia, según refleja su elevado grado de similitud de secuencia. Sin embargo, en uso común y en la solicitud, el término "homólogo," cuando está modificado con un adverbio tal como "altamente", puede referirse a la similitud de secuencia y no a un origen evolutivo común.

65

Por consiguiente, la expresión "similitud de secuencia" en todas sus formas gramaticales se refiere al grado de identidad o correspondencia entre secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos de proteínas que pueden compartir o no un origen evolutivo común (véase Reeck et al., Cell 50:667 (1987)). Como se usa en este documento, dos secuencias de ADN son "sustancialmente homólogas" o "sustancialmente similares" cuando al menos aproximadamente el 50 % (por ejemplo, al menos aproximadamente el 75 %, 90 %, o 95 %) de los nucleótidos coinciden sobre la longitud definida de las secuencias de ADN. Las secuencias que son sustancialmente homólogas pueden identificarse comparando las secuencias usando software convencional disponible en bancos de datos de secuencias, o en un experimento de hibridación de Southern en, por ejemplo, condiciones rigurosas definidas para ese sistema particular. Definir las condiciones de hibridación apropiadas pertenece a las habilidades de la técnica (véase por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).

Como se usa en este documento, "sustancialmente similares" se refiere a fragmentos de ácido nucleico donde cambios en una o más bases nucleotídicas provoca la sustitución de uno o más aminoácidos, pero no afecta a las propiedades funcionales de la proteína codificada por la secuencia de ADN. "Sustancialmente similar" también se refiere a fragmentos de ácido nucleico donde cambios en una o más bases nucleotídicas no afectan a la capacidad del fragmento de ácido nucleico de mediar la alteración de la expresión génica por tecnología antisentido o co-supresión. "Sustancialmente similar" también se refiere a modificaciones de los fragmentos de ácido nucleico de la invención tales como delección o inserción de una o más bases nucleotídicas que no afectan sustancialmente a las propiedades funcionales del transcrito resultante. Por lo tanto se entiende que la invención abarca más de las secuencias ejemplares específicas. Cada una de las modificaciones propuestas pertenece a las habilidades de la técnica, como también la determinación de la retención de la actividad biológica de los productos codificados.

Además, los especialistas en la técnica reconocen que las secuencias sustancialmente similares abarcadas por esta invención también se definen por su capacidad de hibridar, en condiciones rigurosas (SSC 0,1X, SDS al 0,1 %, 65 °C y lavado con SSC 2X, SDS al 0,1 % seguido de SSC 0,1X, SDS al 0,1 %), con las secuencias ejemplificadas en este documento. Los fragmentos de ácido nucleico sustancialmente similares son aquellos fragmentos de ácido nucleico cuyas secuencias de ADN son al menos aproximadamente un 70 %, 80 %, 90 % o 95 % idénticas a la secuencia de ADN de los fragmentos de ácido nucleico presentados en este documento.

Dos secuencias de aminoácidos son "sustancialmente homólogas" o "sustancialmente similares" cuando más de aproximadamente el 40 % de los aminoácidos son idénticos, o más del 60 % son similares (funcionalmente idénticas). Preferiblemente, las secuencias similares u homólogas se identifican por alineación usando, por ejemplo, el programa de acumulación GCG (Genetics Computer Group, Program Manual for the GCG Package, Versión 7, Madison, Wisconsin).

La expresión "correspondiente a" se usa en este documento para hacer referencia a secuencias similares u homólogas, independientemente de si la posición exacta es idéntica o diferente de la molécula con la cual se mide la similitud u homología. Una alineación de secuencia de ácido nucleico o aminoácidos puede incluir espacios. Por tanto, la expresión "correspondiente a" se refiere a la similitud de secuencia, y no a la numeración de los restos de aminoácido o bases nucleotídicas.

Una "parte sustancial" de una secuencia de aminoácidos o nucleótidos comprende suficiente de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido o la secuencia de nucleótidos de un gen para identificar de forma putativa ese polipéptido o gen, por evaluación manual de la secuencia por un especialista en la técnica, o por comparación de secuencia automatizada por ordenador e identificación usando algoritmos tales como BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403 (1993)); disponible en ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). En general, una secuencia de diez o más aminoácidos contiguos o treinta o más nucleótidos es necesaria para identificar de forma putativa un polipéptido o secuencia de ácido nucleico como homóloga a una proteína o gen conocido. Además, con respecto a secuencias de nucleótidos, pueden usarse sondas oligonucleotídicas específicas de gen que comprenden 20-30 nucleótidos contiguos en métodos dependientes de secuencia de identificación de genes (por ejemplo, hibridación de Southern) y aislamiento (por ejemplo, hibridación *in situ* de colonias bacterianas o placas de bacteriófago). Además, pueden usarse oligonucleótidos cortos de 12-15 bases como cebadores de amplificación en PCR para obtener un fragmento particular de ácido nucleico que comprenda los cebadores. Por consiguiente, una "parte sustancial" de una secuencia de nucleótidos comprende suficiente de la secuencia para identificar específicamente y/o aislar un fragmento de ácido nucleico que comprende la secuencia.

La expresión "porcentaje de identidad", como se sabe en la técnica, es una relación entre dos o más secuencias polipeptídicas o dos o más secuencias polinucleotídicas, determinada por comparación de las secuencias. En la técnica, "identidad" también significa el grado de vinculación de secuencia entre secuencias polipeptídicas o polinucleotídicas, según pueda ser el caso, determinado por la coincidencia entre series de dichas secuencias. La "identidad" y la "similitud" pueden calcularse fácilmente por métodos conocidos, incluyendo aunque sin limitación los descritos en: Computational Molecular Biology (Lesk, A. M., ed.) Oxford University Press, Nueva York (1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects (Smith, D. W., ed.) Academic Press, Nueva York (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Parte I (Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds.) Humana Press, Nueva Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology (von Heinje, G., ed.) Academic Press (1987); y Sequence Analysis Primer (Gibbskov, M. y Devereux, J., eds.) Stockton Press, Nueva York (1991). Hay métodos preferidos para determinar la

identidad para dar la mejor coincidencia entre las secuencias ensayadas. Los métodos para determinar la identidad y similitud están codificados en programas informáticos disponibles al público. Las alineaciones de secuencia y los cálculos de porcentaje de identidad pueden realizarse usando software de análisis de secuencia tales como el programa Megalign del grupo de cálculo bioinformático LASERGENE (DNASTAR Inc., Madison, WI). Pueden realizarse múltiples alineaciones de las secuencias usando el método Clustal de alineación (Higgins et al., CABIOS. 5:151 (1989)) con los parámetros por defecto (PENALIZACIÓN POR HUECO=10, PENALIZACIÓN POR LONGITUD DE HUECO=10). Pueden seleccionarse los parámetros por defecto para alineaciones por pares usando el método Clustal: KTUPLE 1, PENALIZACIÓN POR HUECO=3, VENTANA=5 y DIAGONALES SALVADAS=5.

La expresión "software de análisis de secuencia" se refiere a cualquier algoritmo informático o programa de software que es útil para el análisis de secuencias de nucleótidos o aminoácidos. El "software de análisis de secuencia" puede estar disponible en el mercado o desarrollarse independientemente. Software de análisis de secuencia típicos incluyen, aunque sin limitación, el grupo GCG de programas (Wisconsin Package Versión 9.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI), BLASTP, BLASTN, BLASTX (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403 (1990)), y DNASTAR (DNASTAR, Inc. 1228 S. Park St. Madison, WI 53715 EEUU). Dentro del contexto de esta solicitud se entenderá que cuando el software de análisis de secuencia se usa para el análisis, los resultados del análisis se basarán en los "valores por defecto" del programa referenciado, salvo que se indique otra cosa. Como se usa en este documento "valores por defecto" significará cualquier conjunto de valores o parámetros que se cargaron originalmente con el software cuando se inició por primera vez.

"Químicamente sintetizado", referido a una secuencia de ADN, significa que los nucleótidos componentes se ensamblan *in vitro*. La síntesis química manual de ADN puede conseguirse usando procedimientos bien establecidos, o puede realizarse síntesis química automatizada usando una de varias máquinas disponibles en el mercado. Por consiguiente, los genes pueden adaptarse para expresión génica óptima basándose en la optimización de secuencia de nucleótidos para reflejar la desviación de codones de la célula hospedadora. Los especialistas en la técnica aprecian la probabilidad de la expresión génica satisfactoria si el uso de codones está desviado hacia aquellos codones favorecidos por el hospedador. La determinación de codones preferidos puede basarse en informe de genes derivados de la célula hospedadora donde está disponible la información de secuencia.

Como se usa en este documento, se dice que dos o más sistemas de regulación génica individualmente funcionales son "ortogonales" cuando: a) la modulación de cada uno de los sistemas dados por su ligando respectivo, a una concentración elegida, provoca un cambio medible en la magnitud de la expresión del gen de ese sistema, y b) el cambio es significativamente diferente estadísticamente del cambio en la expresión de todos los demás sistemas simultáneamente funcionales en la célula, tejido, u organismo, independientemente de la simultaneidad o secuencialmente de la modulación real. Preferiblemente, la modulación de cada sistema de regulación génica individualmente funcional realiza un cambio en la expresión génica a menos 2 veces mayor que todos los demás sistemas funcionales en la célula, tejido, u organismo, por ejemplo, al menos 5 veces, 10 veces, 100 veces, o 500 veces mayor. De forma ideal, la modulación de cada uno de los sistemas dados por su respectivo ligando a una concentración elegida provoca un cambio medible en la magnitud de la expresión del gen de ese sistema y ausencia de cambio medible en la expresión de todos los demás sistemas funcionales en la célula, tejido, u organismo. En dichos casos, se dice que el sistema de regulación génica inducible múltiple es "completamente ortogonal". Se describen ligandos ortogonales útiles y sistemas de expresión génica basados en receptor ortogonal en el documento US 2002/0110861 A.

La expresión "gen exógeno" significa un gen foráneo al sujeto, es decir, un gen que se introduce en el sujeto a través de un proceso de transformación, una versión no mutada de un gen mutado endógeno o una versión mutada de un gen no mutado endógeno. El método de transformación no es crítico para esta invención y puede ser cualquier método adecuado para el sujeto conocido por los especialistas en la técnica. Los genes exógenos pueden ser genes naturales o sintéticos que se introducen en el sujeto en forma de ADN o ARN que pueden funcionar a través de un intermedio de ADN tal como por transcriptasa inversa. Dichos genes pueden introducirse en células diana, introducirse directamente en el sujeto, o introducirse indirectamente mediante la transferencia de células transformadas al sujeto.

La expresión "producto terapéutico" se refiere a un polipéptido terapéutico o polinucleótido terapéutico que confiere una función beneficiosa a la célula hospedadora en la que se expresa dicho producto. Los polipéptidos terapéuticos pueden incluir, sin limitación, péptidos tan pequeños como de tres aminoácidos de longitud, proteínas de cadena sencilla o múltiple, y proteínas de fusión. Los polinucleótidos terapéuticos pueden incluir, sin limitación, oligonucleótidos antisentido, ARN pequeños de interferencia, ribozimas, y secuencias guía externas de ARN. El producto terapéutico puede comprender una secuencia de origen natural, una secuencia sintética o una combinación de secuencias naturales y sintéticas.

La expresión "complejo receptor de ecdisona" generalmente se refiere a un complejo de proteína heterodimérica que tiene al menos dos miembros de la familia de receptores nucleares, receptor de ecdisona ("EcR") y proteínas ultraespiráculo ("USP") (véase Yao et al., Nature 366:476 (1993)); Yao et al., Cell 71:63 (1992)). El complejo EcR funcional puede también incluir una o más proteínas adicionales tales como inmunofilinas. Miembros adicionales de la familia de receptores nucleares de proteínas, conocidos como factores de transcripción (tales como DHR38,

betaFTZ-1 u otros homólogos de insecto), también pueden ser compañeros dependientes o independientes de ligando para EcR y/o USP. El complejo EcR también puede ser un heterodímero de proteína EcR y el homólogo de vertebrado de proteína ultraespiráculo, proteína receptor X de ácido retinoico ("RXR") o una quimera de USP y RXR. La expresión complejo EcR también abarca complejos homodiméricos de la proteína EcR o USP.

Un complejo EcR puede activarse por un ecdisteroide activo o ligando no esteroideo unido a una de las proteínas del complejo, inclusive de EcR, pero sin excluir otras proteínas del complejo. Como se usa en este documento, el término "ligando", aplicado a conmutadores génicos basados en EcR, describe moléculas pequeñas y solubles que tienen la capacidad de activar un conmutador génico para estimular la expresión de un polipéptido codificado en el mismo. Ejemplos de ligandos incluyen, sin limitación, un ecdisteroide, tal como ecdisona, 20-hidroxiecdisona, ponasterona A, muristerona A, y similares, ácido 9-cis-retinoico, análogos sintéticos de ácido retinoico, N,N'-diacilhidrazinas tales como las descritas en las patentes de Estados Unidos Nº 6.013.836; 5.117.057; 5.530.028; y 5.378.726 y las solicitudes publicadas de Estados Unidos Nº 2005/0209283 y 2006/0020146; oxadiazolinas como las descritas en la solicitud publicada de Estados Unidos Nº 2004/0171651; dibenzoilalquil cianohidrazinas tales como las descritas en la solicitud europea Nº 461.809; N-alkil-N,N'-diarilhidrazinas tales como las descritas en la patente de Estados Unidos Nº 5.225.443; N-acyl-N-alkilcarbonilhidrazinas tales como las descritas en la solicitud europea Nº 234.994; N-aril-N-alkil-N'-arilhidrazinas tales como las descritas en la patente de Estados Unidos Nº 4.985.461; amidocetonas tales como las descritas en la solicitud publicada de Estados Unidos Nº 2004/0049037; y otros materiales similares incluyendo 3,5-di-terc-butil-4-hidroxi-N-isobutil-benzamida, 8-O-acetilharpárido, oxiesteroles, 22(R) hidroxicoesterol, 24(S) hidroxicoesterol, 25-epoxicoesterol, T0901317, 5-alfa-6-alfa-epoxicoesterol-3-sulfato (ECHS), 7-cetocolesterol-3-sulfato, farnesol, ácidos biliares, ésteres de 1,1-bifosfonato, hormona juvenil III, y similares. Ejemplos de ligandos diacilhidrazina útiles en la invención incluyen RG-115819 (N-(1-etil-2,2-dimetil-propil)-N'-(2-metil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico), RG-115932 (N-(1-terc-butil-butil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido (R)-3,5-dimetil-benzoico), y RG-115830 (N-(1-terc-butil-butil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico). Véase la solicitud de Estados Unidos 12/155.111, presentada el 29 de mayo de 2008, y el documento PCT/US2008/006757 presentado el 29 de mayo de 2008, para diacilhidrazinas adicionales que son útiles en la práctica de la invención.

El complejo EcR incluye proteínas que son miembros de la superfamilia de receptores nucleares donde todos los miembros se caracterizan por la presencia de un dominio de transactivación ("TA") amino-terminal, un dominio de unión a ADN ("DBD"), y un dominio de unión a ligando ("LBD") separados por una región bisagra. Algunos miembros de la familia también pueden tener otro dominio de transactivación en el extremo carboxi-terminal del LBD. El DBD se caracteriza por la presencia de dos dedos de zinc de cisteína entre los que hay dos motivos de aminoácido, la caja P y la caja D, que confieren especificidad por elementos de respuesta a ecdisona. Estos dominios pueden ser nativos, modificados, o quimeras de diferentes dominios de proteínas receptoras heterólogas.

Las secuencias de ADN que componen el gen exógeno, el elemento de respuesta, y el complejo EcR pueden incorporarse en arqueobacterias, células procariontas tales como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, u otras enterobacterias, o células eucariotas tales como células vegetales o animales. Sin embargo, como muchas de las proteínas expresadas por el gen se procesan incorrectamente en bacterias, se prefieren células eucariotas. Las células pueden estar en forma de células individuales u organismos multicelulares. Las secuencias de nucleótidos para el gen exógeno, el elemento de respuesta, y el complejo receptor también pueden incorporarse como moléculas de ARN, preferiblemente en forma de ARN virales funcionales tales como virus del mosaico del tabaco. De las células eucariotas, se prefieren células de vertebrado porque carecen de forma natural de las moléculas que confieren respuestas a los ligandos de esta invención para el EcR. Como resultado, son "sustancialmente insensibles" a los ligandos de esta invención. Por tanto, los ligandos útiles en esta invención tendrán efectos fisiológicos y otros efectos despreciables sobre las células transformadas, o el organismo completo. Por lo tanto, las células pueden crecer y expresar el producto deseado, sustancialmente sin verse afectadas por la presencia del propio ligando.

Los ligandos de EcR, cuando se usan con el complejo EcR que a su vez se une al elemento de respuesta unido a un gen exógeno (por ejemplo, IL-12), proporciona el medio para la regulación temporal externa de la expresión del gen exógeno. El orden en que los diversos componentes se unen entre sí, es decir, ligando a complejo receptor y complejo receptor a elemento de respuesta, no es crítico. Normalmente, la modulación de la expresión del gen exógeno es en respuesta a la unión del complejo EcR a un elemento de ADN regulador o de control específico. La proteína EcR, como otros miembros de la familia de receptores nucleares, posee al menos tres dominios, un dominio de transactivación, un dominio de unión a ADN, y un dominio de unión a ligando. Este receptor, como un subconjunto de la familia de receptores nucleares, también posee regiones peor definidas responsables de las propiedades de heterodimerización. La unión del ligando al dominio de unión a ligando de la proteína EcR, después de la heterodimerización con la proteína USP o RXR, posibilita que los dominios de unión a ADN de las proteínas heterodiméricas se unen al elemento de respuesta en una forma activada, provocando de este modo la expresión o supresión del gen exógeno. Este mecanismo no excluye el potencial del ligando de unirse a EcR o USP, y la formación resultante de complejos homodiméricos activos (por ejemplo, EcR+EcR o USP+USP). Uno o más de los dominios receptores puede variarse produciendo un conmutador génico quimérico. Normalmente, uno o más de los tres dominios puede elegirse entre una fuente diferente de la fuente de los otros dominios de modo que el receptor quimérico esté optimizado en la célula hospedadora u organismo elegido para la actividad de transactivación, unión

complementaria del ligando, y reconocimiento de un elemento de respuesta específico. Además, el propio elemento de respuesta puede modificarse o sustituirse con elementos de respuesta por otros dominios de proteína de unión a ADN tales como la proteína GAL-4 de levadura (véase Sadowski et al., Nature 335:563 (1988) o la proteína LexA de *E. coli* (véase Brent et al., Cell 43:729 (1985)) para acomodar complejos EcR quiméricos. Otra ventaja de los sistemas quiméricos es que permiten la elección de un promotor usado para dirigir el gen exógeno de acuerdo con un resultado final deseado. Dicho doble control puede ser particularmente importante en áreas de terapia génica, especialmente cuando se producen proteínas citotóxicas, porque puede controlarse tanto de la cronología de expresión así como de las células donde sucede la expresión. Cuando se introducen genes exógenos, unidos de forma funcional a un promotor adecuado, en las células del sujeto, se controla la expresión de los genes exógenos mediante la presencia del ligando de esta invención. Los promotores pueden regularse de forma constitutiva o inducible o pueden ser específicos de tejido (es decir, se expresan solamente en un tipo particular de célula) o específicos para ciertas fases de desarrollo del organismo.

Son bien conocidas en la técnica numerosas secuencias de ácido nucleico genómicas y de ADNc que codifican una diversidad de polipéptidos, tales como factores de transcripción y proteínas informadoras. Los especialistas en la técnica tienen acceso a la información de secuencia de ácido nucleico para casi todos los genes conocidos y pueden obtener la molécula de ácido nucleico directamente de un depósito público, la institución que publicó la secuencia, o emplear métodos rutinarios para preparar la molécula. Véase por ejemplo la descripción de los números de acceso de secuencia, *infra*.

El conmutador génico puede ser cualquier sistema conmutador génico que regule la expresión génica mediante la adición o retirada de un ligando específico. En una realización, el conmutador génico es uno en que el nivel de expresión génica depende del nivel de ligando que está presente. Ejemplos de factores de transcripción dependientes de ligando que pueden usarse en conmutadores génicos incluyen, miembros de la superfamilia de receptores nucleares activados por sus respectivos ligandos (por ejemplo, glucocorticoides, estrógenos, progesterona, retinoides, ecdisona, y análogos y miméticos de los mismos) y rTTA activado por tetraciclina. En un aspecto de la invención, el conmutador génico es un conmutador génico basado en EcR. Ejemplos de dichos sistemas incluyen, sin limitación, los sistemas descritos en las patentes de Estados Unidos Nº 6.258.603, 7.045.315, solicitudes de patente publicada de Estados Unidos Nº 2006/0014711, 2007/0161086, y solicitud publicada internacional Nº WO 01/70816. Ejemplos de sistemas quiméricos de receptor de ecdisona se describen en la patente de Estados Unidos Nº 7.091.038, las solicitudes de patente publicada de Estados Unidos Nº 2002/0110861, 2004/0033600, 2004/0096942, 2005/0266457, y 2006/0100416, y las solicitudes publicadas internacionales Nº WO 01/70816, WO 02/066612, WO 02/066613, WO 02/066614, WO 02/066615, WO 02/29075, y WO 2005/108617. Un ejemplo de un sistema regulado por agonista de ecdisona no esteroideo es el sistema de expresión inducible en mamífero RheoSwitch® (New England Biolabs, Ipswich, MA).

Como se describe en este documento, un polinucleótido que codifica el conmutador génico comprende una única secuencia de factor de transcripción que codifica un factor de transcripción dependiente de ligando bajo el control de un promotor. La secuencia de factor de transcripción puede codificar un factor de transcripción dependiente de ligando que es un factor de transcripción de origen natural o artificial. Un factor de transcripción artificial es uno en que la secuencia natural del factor de transcripción se ha alterado, por ejemplo, por mutación de la secuencia o por combinación de dominios de diferentes factores de transcripción. En una realización, el factor de transcripción comprende un dominio de unión a ligando del receptor nuclear de Grupo H (LBD). En una realización, el LBD del receptor nuclear de Grupo H es de un EcR, un receptor ubicuo, un receptor huérfano 1, un NER-1, un receptor nuclear de hormonas esteroideas 1, un receptor X retinoide que interacciona con proteína-15, un receptor X hepático β , una proteína tipo receptor de hormonas esteroideas, un receptor X hepático, un receptor X hepático α , un receptor X farnesoide, una proteína de interacción con receptor 14, o un receptor de farnesol. En otra realización, el LBD del receptor nuclear de Grupo H es de un receptor de ecdisona.

El EcR y los otros receptores nucleares de Grupo H son miembros de la superfamilia de receptores nucleares donde todos los miembros se caracterizan generalmente por la presencia de un dominio de transactivación (TD) aminoterminal, un dominio de unión a ADN (DBD), y un LBD separado del DBD por una región bisagra. Como se usa en este documento, la expresión "dominio de unión a ADN" comprende una secuencia polipeptídica mínima de una proteína de unión a ADN, hasta la longitud completa de una proteína de unión a ADN, siempre que el dominio de unión a ADN funcione asociándose con un elemento de respuesta particular. Los miembros de la superfamilia de receptores nucleares también se caracterizan por la presencia de cuatro o cinco dominios: A/B, C, D, E, y en algunos miembros F (véase el documento US 4.981.784 y Evans, Science 240:889 (1988)). El dominio "A/B" corresponde al dominio de transactivación, "C" corresponde al dominio de unión a ADN, "D" corresponde a la región bisagra, y "E" corresponde al dominio de unión a ligando. Algunos miembros de la familia también pueden tener otro dominio de transactivación en el extremo carboxi-terminal del LBD correspondiente a "F".

El DBD se caracteriza por la presencia de dos dedos de zinc de cisteína entre los que hay dos motivos de aminoácido, la caja P y la caja D, que confieren especificidad por elementos de respuesta. Estos dominios pueden ser nativos, modificados, o quimeras de diferentes dominios de proteínas receptoras heterólogas. El EcR, como un subconjunto de la familia de receptores nucleares, también posee regiones peor definidas responsables de las propiedades de heterodimerización. Como los dominios de los receptores nucleares son de naturaleza modular, el

LBD, DBD, y TD pueden intercambiarse.

5 En otra realización, el factor de transcripción comprende un TD, un DBD que reconoce un elemento de respuesta asociado con el gen exógeno cuya expresión se tiene que modular; y un LBD del receptor nuclear de Grupo H. En ciertas realizaciones, el LBD del receptor nuclear de Grupo H comprende una mutación de sustitución.

10 En otras realizaciones, un polinucleótido que codifica el conmutador génico comprende una primera secuencia de factor de transcripción bajo el control de un primer promotor y una segunda secuencia de factor de transcripción bajo el control de un segundo promotor, donde las proteínas codificadas por dicha primera secuencia de factor de transcripción y dicha segunda secuencia de factor de transcripción interacciona para formar un complejo proteico que funciona como factor de transcripción dependiente de ligando, es decir, un conmutador génico basado en "conmutador dual" o "de dos híbridos". El primer y segundo promotores pueden ser iguales o diferentes.

15 Un polinucleótido que codifica un conmutador génico también puede comprender una primera secuencia de factor de transcripción y una segunda secuencia de factor de transcripción bajo el control de un promotor, donde las proteínas codificadas por la primera secuencia de factor de transcripción y la segunda secuencia de factor de transcripción interacciona para formar un complejo proteico que funciona como factor de transcripción dependiente de ligando, es decir, un "conmutador génico sencillo". La primera secuencia de factor de transcripción y la segunda secuencia de factor de transcripción pueden estar conectadas por un sitio interno de entrada al ribosoma, por ejemplo, EMCV IRES.

20 En una realización, la primera secuencia de factor de transcripción codifica un polipéptido que comprende un TD, un DBD que reconoce un elemento de respuesta asociado con el gen exógeno cuya expresión se tiene que modular; y un LBD del receptor nuclear de Grupo H, y la segunda secuencia de factor de transcripción codifica un factor de transcripción que comprende un LBD del receptor nuclear seleccionado entre un LBD de RXR de vertebrado, un LBD de RXR de invertebrado, un LBD de proteína ultraespiráculo, y un LBD quimérico que comprende dos fragmentos polipeptídicos, donde el primer fragmento polipeptídico es de un LBD de RXR de vertebrado, un LBD de RXR de invertebrado, o un LBD de proteína ultraespiráculo, y el segundo fragmento polipeptídico es de un diferente LBD de RXR de vertebrado, LBD de RXR de invertebrado, o LBD de proteína ultraespiráculo.

30 En otra realización, el conmutador génico comprende una primera secuencia de factor de transcripción que codifica un primer polipéptido que comprende un LBD de receptor nuclear y un DBD que reconoce un elemento de respuesta asociado con el gen exógeno cuya expresión se tiene que modular, y una segunda secuencia de factor de transcripción que codifica un segundo polipéptido que comprende un TD y un LBD de receptor nuclear, donde uno de los LBD de receptor nuclear es un LBD del receptor nuclear de Grupo H. En una realización preferida, el primer polipéptido está sustancialmente libre de un TD y el segundo polipéptido está sustancialmente libre de un DBD. Para los propósitos de la invención, "sustancialmente libre" significa que la proteína en cuestión no contiene una secuencia suficiente del dominio en cuestión para proporcionar activación o actividad de unión.

40 En otro aspecto de la invención, la primera secuencia de factor de transcripción codifica una proteína que comprende un compañero heterodimérico y un TD y la segunda secuencia de factor de transcripción codifica una proteína que comprende un DBD y un LBD.

45 Cuando solamente un LBD de receptor nuclear es un LBD de Grupo H, el otro LBD de receptor nuclear puede ser de cualquier otro receptor nuclear que forme un dímero con el LBD de Grupo H. Por ejemplo, cuando el LBD del receptor nuclear de Grupo H es un LBD de EcR, el otro LBD de receptor nuclear "compañero" puede ser de un EcR, un RXR de vertebrado, un RXR de invertebrado, una proteína ultraespiráculo (USP), o un receptor nuclear quimérico que comprende al menos dos diferentes fragmentos polipeptídicos de LBD de receptor nuclear seleccionados entre un RXR de vertebrado, un RXR de invertebrado, y una USP (véase el documento WO 01/70816 A2, solicitud de patente internacional N° PCT/US02/05235 y documento US 2004/0096942 A1. El dominio de unión a ligando de receptor nuclear "compañero" puede comprender adicionalmente una mutación de truncamiento, una mutación de delección, una mutación de sustitución, u otra modificación.

55 En una realización, el LBD de RXR de vertebrado es de un RXR de ser humano *Homo sapiens*, ratón *Mus musculus*, rata *Rattus norvegicus*, pollo *Gallus gallus*, cerdo *Sus scrofa domestica*, rana *Xenopus laevis*, pez cebra *Danio rerio*, tunicado *Polyandrocarpa misakiensis*, o medusa *Tripedalia cysophora*.

60 En una realización, el dominio de unión a ligando de RXR de invertebrado es de un polipéptido ultraespiráculo de langosta *Locusta migratoria* ("LmUSP"), un homólogo 1 de RXR de garrapata dura *Amblyomma americanum* ("AmaRXR1"), un homólogo 2 de RXR de garrapata dura *Amblyomma americanum* ("AmaRXR2"), un homólogo de RXR de cangrejo violinista *Celuca pugilator* ("CpRXR"), un homólogo de RXR de escarabajo *Tenebrio molitor* ("TmRXR"), un homólogo de RXR de abeja melífera *Apis mellifera* ("AmRXR"), un homólogo de RXR de áfido *Myzus persicae* ("MpRXR"), o un homólogo de RXR no de dípteros/no de lepidópteros.

65 En una realización, el LBD de RXR quimérico comprende al menos dos fragmentos polipeptídicos seleccionados entre un fragmento polipeptídico de RXR de especie vertebrada, una fragmento polipeptídico de RXR de especie

5 invertebrada, y un fragmento polipeptídico de homólogo de RXR de especie invertebrada no de dípteros/no de lepidópteros. Un dominio de unión a ligando de RXR quimérico para su uso en la invención puede comprender al menos dos fragmentos polipeptídicos de RXR de diferentes especies, o cuando las especies son iguales, los dos o más fragmentos polipeptídicos pueden ser de dos o más isoformas diferentes del fragmento polipeptídico de RXR de la especie.

En una realización, el dominio de unión a ligando de RXR quimérico comprende al menos un fragmento polipeptídico de RXR de especie vertebrada y un fragmento polipeptídico de RXR de especie invertebrada.

10 En otra realización, el dominio de unión a ligando de RXR quimérico comprende al menos un fragmento polipeptídico de RXR de especie vertebrada y un fragmento polipeptídico de homólogo de RXR de especie invertebrada no de dípteros/no de lepidópteros.

15 El ligando, cuando se combina con el LBD del receptor o receptores nucleares, que a su vez están unidos al elemento de respuesta ligado al gen exógeno, proporciona regulación temporal externa de la expresión del gen exógeno. El mecanismo de unión o el orden en que los diversos componentes de esta invención se unen entre sí, es decir, por ejemplo, ligando a LBD, DBD a elemento de respuesta, TD a promotor, etc., no es crítico.

20 En un ejemplo específico, la unión del ligando al LBD de un receptor nuclear de Grupo H y su compañero LBD de receptor nuclear posibilita la expresión del gen exógeno. Este mecanismo no excluye el potencial del ligando de unirse al receptor nuclear de Grupo H (GHNR) o su compañero, y la formación resultante de complejos homodiméricos activos (por ejemplo, GHNR + GHNR o compañero + compañero). Preferiblemente, uno o más de los dominios de receptor se varía produciendo un conmutador génico híbrido. Normalmente, uno o más de los tres dominios, DBD, LBD, y TD, pueden elegirse entre una fuente diferente a la fuente de los otros dominios de modo que los genes híbridos y las proteínas híbridas resultantes estén optimizados en la célula hospedadora u organismo elegido para la actividad de transactivación, unión complementaria del ligando, y reconocimiento de un elemento de respuesta específico. Además, el propio elemento de respuesta puede modificarse o sustituirse con elementos de respuestas por otros dominios de proteína de unión a ADN tales como la proteína GAL-4 de levadura (véase Sadowski et al., Nature 335:563 (1988)) o la proteína LexA de *Escherichia coli* (véase Brent et al., Cell 43:729 (1985)), o elementos de respuesta sintéticos específicos para interacciones diana con proteínas diseñadas, modificadas, y seleccionadas para dichas interacciones específicas (véase, por ejemplo, Kim et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:3616 (1997)) para acomodar receptores híbridos.

35 El complejo EcR funcional también puede incluir una o más proteínas adicionales tales como inmunofilinas. Miembros adicionales de la familia de receptores nucleares de proteínas, conocidos como factores de transcripción (tales como DHR38 o *betaFTZ-1*), también pueden ser compañeros dependientes o independientes de ligando para EcR, USP, y/o RXR. Además, pueden requerirse otros cofactores tales como proteínas generalmente conocidas como coactivadores (también llamados adaptadores o mediadores). Estas proteínas no se unen de forma específica de secuencia a ADN y no están implicadas en la transcripción basal. Pueden ejercer su efecto sobre la activación de transcripción a través de diversos mecanismos, incluyendo estimulación de la unión a ADN de activadores, afectando a la estructura de la cromatina, o mediando las interacciones del complejo de iniciación-activador. Ejemplos de dichos coactivadores incluyen RIP140, TIF1, RAP46/Bag-1, ARA70, SRC-1/NCoA-1, TIF2/GRIP/NCoA-2, ACTR/AIB1/RAC3/pCIP así como la proteína de unión a elemento de respuesta B coactivador C promiscuo, CBP/p300 (para una revisión véase Glass et al., Curr. Opin. Cell Biol. 9:222 (1997)). Además, pueden requerirse cofactores proteicos generalmente conocidos como correpresores (también conocidos como represores, silenciadores, o mediadores de silenciamiento) para inhibir de forma eficaz la activación transcripcional en ausencia de ligando. Estos correpresores pueden interactuar con el EcR sin ligando para silenciar la actividad en el elemento de respuesta. Evidencias actuales sugieren que la unión de ligando cambia la conformación del receptor, que provoca liberación del correpresor y reclutamiento de los coactivadores descritos anteriormente, suprimiendo de este modo la actividad de silenciamiento. Ejemplos de correpresores incluyen N-CoR y SMRT (para una revisión, véase Horwitz et al., Mol Endocrinol. 10:1167 (1996)). Estos cofactores pueden ser endógenos de la célula u organismo, o pueden añadirse de forma exógena como transgenes a expresar de un modo regulado o no regulado.

55 El gen exógeno está unido de forma funcional a un promotor que comprende al menos un elemento de respuesta que se reconoce por el DBD del factor de transcripción dependiente de ligando codificado por el conmutador génico. En una realización, el promotor comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más copias del elemento de respuesta. Los promotores que comprende los elementos de respuesta deseados pueden ser promotores de origen natural o promotores artificiales creados usando técnicas que son bien conocidas en la técnica, por ejemplo, uno o más elementos de respuesta unidos de forma funcional a un promotor mínimo.

60 Para introducir los polinucleótidos en las células, puede usarse un vector. El vector puede ser, por ejemplo, un vector plasmídico o un vector viral de ARN o ADN mono o bicatenario. Dichos vectores pueden introducirse en células mediante técnicas bien conocidas para introducir ADN y ARN en células. Los vectores virales pueden ser de replicación competente o de replicación deficiente. En el último caso, la propagación viral generalmente sucederá en células hospedadoras complementarias. Como se usa en este documento, la expresión "célula hospedadora" u "hospedador" se usa para indicar una célula de la invención que alberga uno o más polinucleótidos de la invención.

Por tanto, como mínimo, los vectores deben incluir los polinucleótidos de la invención. Otros componentes del vector pueden incluir, aunque sin limitación, marcadores de selección, dominios de modificación de cromatina, promotores adicionales que dirigen la expresión de otros polipéptidos que también pueden estar presentes en el vector (por ejemplo, un polipéptido letal), sitios de integración genómica, sitios de recombinación, y ejes de inserción molecular.

5 Los vectores pueden comprender cualquier cantidad de estos elementos adicionales, dentro o no dentro de los polinucleótidos, de modo que el vector pueda adaptarse a los objetivos específicos de los métodos terapéuticos deseados.

10 Como se describe en este documento, los vectores que se introducen en las células comprenden adicionalmente un "gen marcador de selección" que, cuando se expresa, indica que la construcción de conmutador génico de la invención se ha integrado en el genoma de la célula hospedadora. De este modo, el gen de selección puede ser un marcador positivo para la integración en el genoma. Aunque no es crítico para los métodos de la invención, la presencia de un gen marcador de selección permite al facultativo seleccionar una población de células vivas donde la construcción de vector se ha integrado en el genoma de las células. Por tanto, ciertas realizaciones de la invención comprenden la selección de células donde el vector se ha integrado satisfactoriamente. Como se usa en este documento, el término "seleccionar" o variaciones del mismo, cuando se usan en relación a células, pretenden indicar métodos convencionales bien conocidos para elegir células con una composición genética específica o fenotipo. Los métodos típicos incluyen, aunque sin limitación, el cultivo de células en presencia de antibióticos, tales como G418, neomicina y ampicilina. Otros ejemplos de genes marcadores de selección incluyen, aunque sin limitación, genes que confieren resistencia a dihidrofolato reductasa, higromicina, o ácido micofenólico. Otros métodos de selección incluyen, aunque sin limitación, un gen marcador de selección que permite el uso de timidina quinasa, hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa o adenina fosforribosiltransferasa como agentes de selección. Las células que comprenden una construcción de vector que comprende un gen o genes de resistencia a antibiótico entonces serían capaces de tolerar el antibiótico en cultivo. Asimismo, las células que no comprenden una construcción de vector que comprende un gen o genes de resistencia a antibiótico no serían capaces de tolerar el antibiótico en cultivo.

30 Como se usa en este documento, un "dominio de modificación de cromatina" (CMD) se refiere a secuencias de nucleótidos que interactúan con una diversidad de proteínas asociadas con el mantenimiento y/o alteración la estructura de cromatina, tales como, aunque sin limitación, aislantes de ADN. Véase Ciavatta et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A., 103:9958 (2006). Ejemplos de CMD incluyen, aunque sin limitación, el aislante de β -globulina de pollo y el sitio hipersensible 4 de pollo (cHS4). El uso de diferentes secuencias CMD entre uno o más programas génicos (es decir, un promotor, secuencia codificante, y región reguladora 3'), por ejemplo, puede facilitar el uso de las secuencias de ADN de CMD diferenciales como "minibrasos de homología" en combinación con diversos microorganismos o tecnologías de recombinación *in vitro* para "intercambio" de programas génicos entre vectores lanzadera existentes multigénicas y monogénicas. Otros ejemplos de dominios de modificación de cromatina son conocidos en la técnica o pueden identificarse fácilmente.

40 Vectores particulares para su uso con la invención son vectores de expresión que codifican proteínas o polinucleótidos. Generalmente, dichos vectores comprenden regiones de control de acción en *cis* eficaces para la expresión en un hospedador unidades de forma funcional al polinucleótido a expresar. Los factores apropiados de acción en *trans* se suministran por el hospedador, se suministra por un vector complementario o se suministran por el propio vector tras su introducción en el hospedador.

45 Puede usarse una gran diversidad de vectores de expresión para expresar proteínas o polinucleótidos. Dichos vectores incluyen vectores cromosómicos, episómicos y derivados de virus, por ejemplo, vectores derivados de plásmidos bacterianos, de bacteriófagos, de episomas de levadura, de elementos cromosómicos de levadura, de virus tales como virus adeno-asociados, lentivirus, baculovirus, papovavirus, tales como SV40, virus vaccinia, adenovirus, poxvirus de aves de corral, virus de la pseudorrabia y retrovirus, y vectores derivados de combinaciones de los mismos, tales como los derivados de elementos genéticos plasmídicos y de bacteriófagos, tales como cósmidos y fagómidos. Todos pueden usarse para la expresión de acuerdo con este aspecto de la invención. Generalmente, puede usarse cualquier vector adecuado para mantener, propagar o expresar polinucleótidos o proteína en un hospedador para la expresión a este respecto.

55 La secuencia polinucleotídica en el vector de expresión está unida de forma funcional a una o más secuencias apropiadas de control de la expresión incluyendo, por ejemplo, un promotor para dirigir la transcripción de ARNm. Promotores adicionales representativos incluyen, aunque sin limitación, promotores constitutivos y promotores específicos de tejido o inducibles. Ejemplos de promotores eucariotas constitutivos incluyen, aunque sin limitación, el promotor del gen de metalotioneína I de ratón (Hamer et al., J. Mol. Appl. Gen. 1:273 (1982)); el promotor TK de Herpes virus (McKnight, Cell 31:355 (1982)); el promotor temprano de SV40 (Benoist et al., Nature 290:304 (1981)); y el promotor del virus vaccinia. Ejemplos adicionales de los promotores que podrían usarse para dirigir la expresión de una proteína o polinucleótido incluyen, aunque sin limitación, promotores específicos de tejido y otros promotores endógenos para proteínas específicas, tales como el promotor de albúmina (hepatocitos), un promotor de proinsulina (células beta pancreáticas) y similares. En general, las construcciones de expresión contendrán sitios para la transcripción, inicio y terminación y, en la región transcrita, un sitio de unión al ribosoma para la traducción. La parte codificante de los transcritos maduros expresados por las construcciones puede incluir un AUG de inicio de la

traducción en el comienzo y un codón de terminación (UAA, UGA o UAG) posicionado apropiadamente al final del polipéptido a traducir.

Además, las construcciones pueden contener elementos de control que regulan, y también generan expresión. Generalmente, dichas regiones funcionarán controlando la transcripción, tales como sitios de unión a represor y potenciadores, entre otros.

Ejemplos de vectores eucariotas incluyen, aunque sin limitación, pW-LNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 y pSG disponibles en Stratagene; pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL disponibles en Amersham Pharmacia Biotech; y pCMVDsRed2-express, pIRES2-DsRed2, pDsRed2-Mito, y pCMV-EGFP disponibles en Clontech. Muchos otros vectores son bien conocidos y están disponibles en el mercado.

Vectores particularmente útiles, que comprenden ejes de inserción molecular para una rápida inserción y retirada de elementos de programas génicos, se describen en la solicitud de patente publicada de Estados Unidos N° 2004/0185556, solicitud de patente de Estados Unidos N° 11/233,246 y solicitudes publicadas internacionales N° WO 2005/040336 y WO 2005/116231. Un ejemplo de dichos vectores es el sistema de producción UltraVector™ (Intrexon Corp., Blacksburg, VA), como se describe en el documento WO 2007/038276. Como se usa en este documento, un "programa génico" es una combinación de elementos genéticos que comprende un promotor (P), una secuencia de expresión (E) y una secuencia reguladora 3' (3), de modo que "PE3" es un programa génico. Los elementos dentro del programa génico pueden intercambiarse fácilmente entre ejes moleculares que flanquean cada uno de los elementos del programa génico. Un eje molecular, como se usa en este documento, se define como un polinucleótido que comprende al menos dos sitios de restricción no variables raros o infrecuentes dispuestos de un modo lineal. Como se describe en este documento, el eje molecular comprende al menos tres sitios de restricción no variables raros o infrecuentes dispuestos de un modo lineal. Normalmente un eje molecular cualquiera no incluiría un sitio de restricción raro o infrecuente de otro eje molecular cualquiera dentro del mismo programa génico. Secuencias afines de más de 6 nucleótidos sobre las cuales actúa una enzima de restricción dada se mencionan como sitios de restricción "raros". Hay, sin embargo, sitios de restricción de 6 pb que existen de forma más infrecuente que lo que se predeciría estadísticamente, y estos sitios y las endonucleasas que los escinden se mencionan como sitios de restricción "infrecuentes". Ejemplos de enzimas de restricción raras o infrecuentes incluyen, aunque sin limitación, AsiS I, Pac I, Sbf I, Fse I, Asc I, Mlu I, SnaB I, Not I, Sal I, Swa I, Rsr II, BSiW I, Sfo I, Sgr AI, AflIII, Pvu I, Ngo MIV, Ase I, Flp I, Pme I, Sda I, Sgf I, Srf I, y Sse8781 I.

El vector también puede comprender sitios de restricción para una segunda clase de enzimas de restricción llamadas enzimas endonucleasas constitutivas (HE). Las enzimas HE tiene grandes sitios de restricción asimétricos (12-40 pares de bases), y sus sitios de restricción son de naturaleza infrecuente. Por ejemplo, la HE conocida como I-SceI tiene un sitio de restricción de 18 pb (5'TAGGGATAACAGGGTAAT3' (SEC ID N°12)), de aparición prevista de solamente una vez cada 7×10^{10} pares de bases de secuencia aleatoria. Esta tasa de aparición es equivalente a solamente un sitio en un genoma que es 20 veces el tamaño de un genoma de mamífero. La naturaleza rara de los sitios HE aumenta enormemente la probabilidad de que un ingeniero genético pueda cortar un programa génico sin alterar la integridad del programa génico si se incluyeran sitios HE en localizaciones apropiadas en un plásmido de vector de clonación.

La selección de vectores y promotores apropiados para la expresión en una célula hospedadora es un procedimiento bien conocido, y las técnicas necesarias para la construcción de vectores y su introducción en el hospedador, así como su expresión en el hospedador son habilidades rutinarias en la técnica.

La introducción de los polinucleótidos en las células puede ser una transfección transitoria, transfección estable, o puede ser una inserción específica de locus del vector. Las transfecciones transitorias y estables de los vectores en la célula hospedadora pueden realizarse por transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por lípido catiónico, electroporación, transducción, infección, u otros métodos. Dichos métodos se describen en muchos manuales convencionales de laboratorio, tales como Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology (1986); Keown et al., 1990, Methods Enzymol. 185: 527-37; Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Tercera Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. Estos métodos de transfección estable provocan la inserción aleatoria del vector en el genoma de la célula. Además, el número de copias y orientación de los vectores también son, hablando generalmente, aleatorios.

Como se describe en este documento, el vector se inserta en un sitio bio-neutro en el genoma. Un sitio bio-neutro es un sitio en el genoma donde la inserción de los polinucleótidos interfiere muy poco, si es que lo hace, con la función normal de la célula. Los sitios bio-neutros pueden analizarse usando bioinformática disponible. Muchos sitios bio-neutros son conocidos en la técnica, por ejemplo, el locus equivalente ROSA. Otros sitios bio-neutros pueden identificarse usando técnicas rutinarias bien conocidas en la técnica. La caracterización del sitio o sitios genómicos se realiza usando métodos conocidos en la técnica. Para controlar la localización, número de copias y/u orientación de los polinucleótidos cuando se introduce el vector en las células, pueden usarse métodos de inserción específica de locus. Los métodos de inserción específica de locus son bien conocidos en la técnica e incluyen, aunque sin limitación, recombinación homóloga e inserción en genoma mediada por recombinase. Por supuesto, si tienen que usarse métodos de inserción específica de locus en los métodos de la invención, los vectores pueden comprender

elementos que ayudan a esa inserción específica de locus, tales como, aunque sin limitación, recombinación homóloga. Por ejemplo, los vectores pueden comprender uno, dos, tres, cuatro o más sitios de integración genómica (GIS). Como se usa en este documento, un "sitio de integración genómica" se define como una parte de la secuencia de vector cuya secuencia de nucleótidos es idéntica o casi idéntica a partes del genoma dentro de las células que permiten la inserción del vector en el genoma. En particular, el vector puede comprender dos sitios de inserción genómica que flanquean al menos los polinucleótidos. Por supuesto, los GIS pueden flanquear elementos adicionales, o incluso todos los elementos presentes en el vector.

Como se describe en este documento, la inserción específica de locus puede realizarse por inserción génica específica de sitio de recombinasa. En resumen, las enzimas recombinasa bacterianas, tales como, aunque sin limitación, PhiC31 integrasa pueden actuar en "pseudo" sitios de recombinación dentro del genoma humano. Estos pseudo sitios de recombinación pueden ser dianas para la inserción específica de locus usando las recombinasas. La inserción génica específica de sitio de recombinasa se describe en Thyagarajan et al., Mol. Cell Biol. 21:3926 (2001). Otros ejemplos de recombinasas y sus respectivos sitios que pueden usarse para inserción génica específica de sitio de recombinasa incluyen, aunque sin limitación, serina recombinasas tales como R4 y TP901-1 y recombinasas descritas en el documento WO 2006/083253.

Como se describe en este documento, el vector puede comprender gen de quimio-resistencia, por ejemplo, el gen de resistencia a múltiples fármacos *mdr1*, dihidrofolato reductasa, u O^6 -alquilguanina-ADN alquiltransferasa. El gen de quimio-resistencia puede estar bajo el control de un promotor constitutivo (por ejemplo, CMV) o inducible (por ejemplo, RheoSwitch®). Si se desea tratar una enfermedad en un sujeto manteniendo al mismo tiempo las células modificadas dentro del sujeto, un médico puede aplicar un agente quimioterapéutico para destruir células enfermas mientras las células modificadas estarían protegidas del agente debido a la expresión de un gen adecuado de quimio-resistencia y puede continuar usándose para el tratamiento, mejora, o prevención de una enfermedad o trastorno. Colocando el gen de quimio-resistencia bajo un promotor inducible, puede evitarse la expresión innecesaria del gen de quimio-resistencia, aunque aún estará disponible en caso de ser necesario un tratamiento continuado. Si las células modificadas en sí mismas llegan a estar enfermas, aún podrían destruirse induciendo la expresión de un polipéptido letal como se describe a continuación.

Los métodos descritos en este documento, se realizan introduciendo los polinucleótidos que codifican el conmutador génico y el gen exógeno en células de un sujeto. Puede usarse cualquier método conocido para introducir un polinucleótido en una célula conocido en la técnica, tal como los descritos anteriormente.

Cuando los polinucleótidos tienen que introducirse en células *ex vivo*, las células pueden obtenerse de un sujeto mediante cualquier técnica conocida en la técnica incluyendo, aunque sin limitación, biopsias, raspado, y retirada de tejido quirúrgico. Las células aisladas pueden cultivarse durante una cantidad suficiente de tiempo para permitir que los polinucleótidos se introduzcan en las células, por ejemplo, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 36, 48 horas o más. Los métodos para cultivar células primarias durante cortos periodos de tiempo son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células pueden cultivarse en placas (por ejemplo, en placas de micropocillos) adheridas o en suspensión.

Para métodos terapéuticos *ex vivo*, las células se aíslan de un sujeto y se cultivan en condiciones adecuadas para introducir los polinucleótidos en las células. Una vez se han introducido los polinucleótidos en las células, las células se incuban durante un periodo suficiente de tiempo para permitir que se exprese el factor de transcripción dependiente de ligando, por ejemplo, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 18, o 24 horas o más. En algún punto después de la introducción de los polinucleótidos en las células (antes o después de expresarse niveles significativos del factor de transcripción dependiente de ligando), las células se introducen de nuevo en el sujeto. La reintroducción puede realizarse por cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, infusión intravenosa o inyección directa en un tejido o cavidad. La presencia de los polinucleótidos en las células puede determinarse antes de introducirse de nuevo las células en el sujeto. Las células que contienen los polinucleótidos pueden seleccionarse (por ejemplo, basándose en la presencia de un marcador de selección en los polinucleótidos) y se vuelven a introducir en el sujeto solamente aquellas células que contienen los polinucleótidos. Después de reintroducir las células en el sujeto, se administra ligando al sujeto para inducir la expresión del polipéptido terapéutico o polinucleótido terapéutico.

El ligando puede añadirse a las células incluso antes de reintroducir las células en el sujeto de modo que el polipéptido terapéutico o polinucleótido terapéutico se exprese antes de la reintroducción de las células. El ligando puede administrarse mediante cualquier método adecuado, sistémicamente (por ejemplo, vía oral, intravenosa) o localmente (por ejemplo, vía intraperitoneal, intratecal, intraventricular, o inyección directa en el tejido u órgano donde se reintrodujeron las células, por ejemplo, por vía intratumoral). La cronología óptima de administración de ligando puede determinarse para cada tipo de célula y enfermedad o trastorno usando solamente técnicas rutinarias.

Los métodos terapéuticos *in vivo* descritos en este documento implican introducción directa *in vivo* de los polinucleótidos en las células del sujeto. Los polinucleótidos pueden introducirse en el sujeto sistémica o localmente (por ejemplo, en el sitio de la enfermedad o trastorno). Una vez se han introducido los polinucleótidos en el sujeto, el ligando puede administrarse para inducir la expresión del polipéptido terapéutico o polinucleótido terapéutico. El

ligando puede administrarse por cualquier método adecuado, sistémicamente (por ejemplo, por vía oral, intravenosa) o localmente (por ejemplo, por vía intraperitoneal, intratecal, intraventricular, o inyección directa en el tejido u órgano donde está sucediendo la enfermedad o trastorno, por ejemplo, por vía intratumoral). La cronología óptima de administración de ligando puede determinarse para cada tipo de célula y enfermedad o trastorno usando solamente técnicas rutinarias.

Para uso *in vivo* use, los ligandos descritos en este documento pueden aceptarse en vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como, por ejemplo, soluciones, suspensiones, comprimidos, cápsulas, pomadas, elixires, y composiciones inyectables. Las composiciones farmacéuticas pueden contener del 0,01 % al 99 % en peso del ligando. Las composiciones pueden ser formas de dosificación individual o múltiple. La cantidad de ligando en cualquier composición farmacéutica particular dependerá de la dosis eficaz, es decir, la dosis necesaria para provocar la expresión o supresión génica deseada.

Vías adecuadas para administrar las preparaciones farmacéuticas incluyen oral, rectal, tópica (incluyendo dérmica, bucal y sublingual), vaginal, parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratecal, intratumoral, y epidural) y por tubo naso-gástrico. Los especialistas en la técnica entenderán que la vía preferida de administración dependerá de la afección que se esté tratando y puede variar con factores tales como el estado del destinatario.

Como se usa en este documento, el término "rAD.RheoIL12" se refiere a un vector de polinucleótido adenoviral que alberga el gen de IL-12 bajo el control de un conmutador génico del sistema terapéutico RheoSwitch® (RTS), que es capaz de producir proteína IL-12 en presencia de ligando activador.

Como se usa en este documento, el término "IL-12p70" se refiere a proteína IL-12, que tiene de forma natural dos subunidades habitualmente mencionadas como p40 y p35. El término IL-12p70 abarca proteínas de fusión que comprenden las dos subunidades de IL-12 (p40 y p35), donde la proteína de fusión puede incluir aminoácidos enlazadores entre subunidades.

Como se usa en este documento, la expresión "una proteína que tiene la función de IL-12" se refiere a una proteína que tiene al menos un 20 % (por ejemplo, al menos un 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 %) de cualquier bioactividad de IL-12 humana. Las bioactividades de IL-12 son bien conocidas en la técnica e incluyen, sin limitación, diferenciación de células T vírgenes en células Th1, estimulación del crecimiento y función de células T, producción de interferón-gamma (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) a partir de células T y citolíticas naturales (NK), reducción de supresión mediada por IL-4 de IFN- γ , potenciación de la actividad citotóxica de células NK y linfocitos T citotóxicos CD8⁺, estimulación de la expresión de IL-12R-J31 e IL-12R-P2, y actividad anti-angiogénica. La expresión "una proteína que tiene la función de IL-12" abarca mutantes de una secuencia de IL-12 de tipo silvestre, donde la secuencia de tipo silvestre se ha alterado por una o más de adición, delección, o sustitución de aminoácidos, así como proteínas no IL-12 que imitan una o más de las bioactividades de IL-12.

Como se usa en este documento, el término "rAd.cIL12" se refiere a un vector de control de polinucleótido adenoviral que contiene el gen de IL-12 bajo el control de un promotor constitutivo.

Como se usa en este documento, los términos "que activa" o "activar" se refieren a cualquier aumento medible en la actividad celular de un conmutador génico, que provoca la expresión de un gen de interés (por ejemplo, proteína IL-12).

Como se usa en este documento, los términos "que trata" o "tratamiento" de una enfermedad se refieren a ejecutar un protocolo, que puede incluir administrar uno o más fármacos o células modificadas por ingeniería *in vitro* a un mamífero (humano o no humano), en un esfuerzo por aliviar los signos o síntomas de la enfermedad. Por tanto, "que trata" o "tratamiento" no deben entenderse necesariamente que requieren alivio completo de los signos o síntomas, no requieren una cura, e incluyen específicamente protocolos que tienen solamente efecto marginal sobre el sujeto.

Como se usa en este documento, "células inmunes" incluyen células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, mastocitos, eosinófilos, basófilos, células citolíticas naturales y linfocitos (por ejemplo, células B y T).

Como se usa en este documento, las expresiones "células dendríticas" y "DC" se usan de forma intercambiable.

Como se usa en este documento, la expresión "células de soporte de terapia" (TSC) son células que pueden modificarse (por ejemplo, transfectarse) con el vector de la invención para suministrar la una o más proteínas que tienen la función de un inmunomodulador y, opcionalmente, una proteína que tiene la función de IL-12, a microentornos tumorales. Dichas TSC incluyen, aunque sin limitación, células madre, fibroblastos, células endoteliales y queratinocitos.

Como se usa en este documento, las expresiones "células dendríticas modificadas por ingeniería *in vitro*" o "población modificada por ingeniería *in vitro* de células dendríticas" o "DC modificadas por ingeniería *in vitro*" o "una población de células dendríticas modificadas por ingeniería" o "DC que expresan IL-12" o "DC.RheoIL12" se refieren

a células dendríticas que expresan de forma condicional IL-12 bajo el control de un conmutador génico, que puede activarse por ligando activador.

5 Como se usa en este documento, las expresiones "TSC modificadas por ingeniería *in vitro*" o "población modificada por ingeniería *in vitro* de TSC" o "una población de TSC modificadas por ingeniería" o "TSC que expresan un inmunomodulador" o "TSC que expresan IL-12" se refieren a células de soporte de terapia, por ejemplo, células madre, fibroblastos, células endoteliales y queratinocitos, que expresan de forma condicional un inmunomodulador y/o IL-12 según pueda ser el caso bajo el control de un conmutador génico, que puede activarse por ligando activador.

10 Como se usa en este documento, los términos "MOI" o "multiplicidad de infección" se refieren a la cantidad promedio de partículas adenovirales que infectan una única célula en un experimento específico (por ejemplo, adenovirus recombinante o adenovirus de control).

15 Como se usa en este documento, el término "tumor" se refiere a todo crecimiento y proliferación de células benignas o malignas *in vivo* o *in vitro*, ya sean células y/o tejidos precancerosos o cancerosos.

20 Ejemplos de cánceres que pueden tratarse de acuerdo con la invención incluyen cáncer de mama, cáncer de próstata, linfoma, cáncer de piel, cáncer pancreático, cáncer de colon, melanoma, melanoma maligno, cáncer de ovario, cáncer de cerebro, carcinoma primario de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, glioma, glioblastoma, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer pulmonar no microcítico, carcinoma de cabeza o cuello, carcinoma de mama, carcinoma de ovario, carcinoma pulmonar, carcinoma pulmonar microcítico, tumor de Wilms, carcinoma cervical, carcinoma testicular, carcinoma de vejiga, carcinoma pancreático, carcinoma de estómago, carcinoma de colon, carcinoma prostático, carcinoma genitourinario, carcinoma de tiroides, carcinoma esofágico, mieloma, mieloma múltiple, carcinoma adrenal, carcinoma de células renales, carcinoma de endometrio, carcinoma de la corteza adrenal, insulinoma pancreático maligno, carcinoma carcinoide maligno, coriocarcinoma, micosis fungoide, hipercalcemia maligna, hiperplasia cervical, leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielogénica aguda, leucemia mielogénica crónica, leucemia granulocítica crónica, leucemia granulocítica aguda, leucemia de células pilosas, neuroblastoma, rabdomiosarcoma, sarcoma de Kaposi, policitemia vera, trombotocitosis esencial, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, sarcoma de tejido blando; sarcoma osteogénico, macroglobulinemia primaria, y retinoblastoma, y similares.

35 La invención describe la modificación por ingeniería de DC para expresar de forma condicional una proteína que tiene la función de IL-12 y usos terapéuticos y/o aplicaciones para el tratamiento de cáncer o tumores o ambos. Las DC modificadas por ingeniería *in vitro* que expresan de forma condicional una proteína que tiene la función de IL-12 son una mejora segura sobre la producción constitutiva de proteína IL-12. Además, la capacidad de controlar la cronología y nivel de expresión de IL-12 proporciona control mejorado de la eficacia del tratamiento. Por lo tanto, las DC modificadas por ingeniería *in vitro* pueden formularse en composiciones farmacéuticas como agentes terapéuticos para el tratamiento de un cáncer o un tumor en un organismo humano o no humano. Como alternativa, pueden usarse poblaciones modificadas por ingeniería *in vitro* de DC o subconjuntos de las mismas como vehículos para suministrar de forma condicional producción de proteína IL-12 a un área específica (tejido normal, cáncer, o tumor) en el cuerpo de un organismo humano o no humano. Las células dendríticas modificadas por ingeniería también pueden expresar de forma condicional IFN-alfa. Las células dendríticas utilizadas pueden ser células dendríticas autólogas o no autólogas. Las células dendríticas pueden aislarse de médula ósea o de la circulación de sangre periférica. En pacientes humanos, las poblaciones de células dendríticas pueden aislarse mediante un procedimiento de leucoféresis, donde se aísla y retira una fracción de glóbulos blancos y se vuelven a infundir otros componentes sanguíneos al paciente.

50 Se describen en este documento métodos para modificar por ingeniería células inmunes diferentes a DC tales como macrófagos, neutrófilos, mastocitos, eosinófilos, basófilos, células citolíticas naturales, y linfocitos (por ejemplo, células B y T) para expresar de forma condicional una proteína que tiene la función de IL-12 y usos terapéuticos y/o aplicaciones para el tratamiento de cáncer o tumores o ambos. Las células inmunes modificadas por ingeniería *in vitro* diferentes a DC, por ejemplo, macrófagos, neutrófilos, mastocitos, eosinófilos, basófilos, células citolíticas naturales, y linfocitos (por ejemplo, células B y T) que expresan de forma condicional una proteína que tiene la función de IL-12 son una mejora segura sobre la producción constitutiva de proteína IL-12. Además, la capacidad de controlar la cronología y nivel de expresión de IL-12 proporciona un control mejorado de la eficacia del tratamiento. Por lo tanto, las células inmunes modificadas por ingeniería *in vitro* diferentes a DC, por ejemplo, macrófagos, neutrófilos, mastocitos, eosinófilos, basófilos, células citolíticas naturales, y linfocitos (por ejemplo, células B y T) pueden formularse en composiciones farmacéuticas como agentes terapéuticos para el tratamiento de un cáncer o un tumor en un organismo humano o no humano. Como alternativa, las poblaciones modificadas por ingeniería *in vitro* de células inmunes diferentes a DC, por ejemplo, macrófagos, neutrófilos, mastocitos, eosinófilos, basófilos, células citolíticas naturales, y linfocitos (por ejemplo, células B y T) o subconjuntos de las mismas pueden usarse como vehículos para suministrar de forma condicional producción de proteína IL-12 a un área específica (tejido normal, cáncer, o tumor) en el cuerpo de un organismo humano o no humano. Las células inmunes modificadas por ingeniería diferentes a DC, por ejemplo, macrófagos, neutrófilos, mastocitos, eosinófilos, basófilos, células citolíticas naturales, y linfocitos (por ejemplo, células B y T) también pueden expresar de forma condicional IFN-alfa. Las

células inmunes utilizadas pueden ser células inmunes autólogas o no autólogas. Las células inmunes pueden aislarse de médula ósea o de la circulación de sangre periférica. En pacientes humanos, las poblaciones de células inmunes pueden aislarse mediante un procedimiento de leucoféresis, donde se aísla y retira una fracción de glóbulos blancos y se vuelven a infundir otros componentes sanguíneos al paciente.

Como se describe en este documento, las células dendríticas pueden prepararse transfectando células madre hematopoyéticas humanas con un vector de la invención que expresa una proteína que tiene la función de IL-12, y diferenciando la célula madre transfectada para dar una célula dendrítica. Véase la patente de Estados Unidos 6.734.014.

En una realización, un vector adenoviral de ácido nucleico (rAd.RheoIL12) que contiene un conmutador génico, donde las secuencias codificantes para VP16-RXR y Gal4-EcR están separadas por la secuencia del sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) de EMCV se insertó en el vector lanzadera adenoviral bajo el control del promotor de ubiquitina C humana. Las secuencias codificantes para las subunidades p40 y p35 de IL12 separadas por una secuencia IRES, y colocadas bajo el control de un promotor inducible sintético, se insertan cadena arriba del promotor de ubiquitina C.

En otra realización, la invención describe un vector lanzadera que porta unidades de transcripción (VP16-RXR y Gal4-EcR) para las dos proteínas de fusión y subunidades inducibles de IL-12 recombinadas con la estructura adenoviral (AdEasy1) en células de *E. coli* BJ5183. Después de certificar el clon recombinante, el plásmido que porta el genoma rAd.RheoIL12 se cultiva en y se purifica a partir de células XL10-Gold, se retira por digestión de la estructura del plásmido y se compacta por transfección en células HEK 293.

En una realización particular, la reserva viral primaria resultante se amplifica por re-infección de células HEK 293 y se purifica por centrifugación en gradiente de densidad de CsCl.

En una realización el gen de IL-12 es una secuencia génica de IL-12 de tipo silvestre. En otra realización, el gen de IL-12 es una secuencia génica modificada, por ejemplo, una secuencia quimérica o una secuencia que se ha modificado para usar codones preferidos.

En una realización, el gen de IL-12 es la secuencia de IL-12 de tipo silvestre humana. En otra realización, la secuencia es al menos un 85 % idéntica a la secuencia de IL-12 humana de tipo silvestre, por ejemplo, al menos un 90 %, 95 %, o 99 % idéntica a IL-12 humana de tipo silvestre. En una realización más, la secuencia génica de IL-12 codifica un polipéptido IL-12 humano. En otra realización, el gen codifica un polipéptido que es al menos un 85 % idéntico a IL-12 humana de tipo silvestre por ejemplo, al menos un 90 %, 95 %, o 99 % idéntico a IL-12 humana de tipo silvestre.

En una realización, el gen de IL-12 es la secuencia de IL-12 de ratón de tipo silvestre. En otra realización, la secuencia es al menos un 85 % idéntica a IL-12 de ratón de tipo silvestre, por ejemplo, al menos un 90 %, 95 %, o 99 % idéntica a IL-12 de ratón de tipo silvestre. En una realización más, la secuencia génica de IL-12 codifica el polipéptido IL-12 de ratón. En otra realización, el gen codifica un polipéptido que es al menos un 85 % idéntico a IL-12 de ratón de tipo silvestre, por ejemplo, al menos un 90 %, 95 %, o 99 % idéntico a IL-12 de ratón de tipo silvestre.

La descripción describe un método para producir una población de DC modificadas por ingeniería *in vitro* que expresan de forma condicional una proteína que tiene la función de IL-12, comprendiendo el método las etapas de: (a) modificar al menos una parte de DC, por ejemplo, DC derivadas de médula ósea, introduciendo en dichas DC un vector que alberga un conmutador génico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene la función de IL-12, produciendo de este modo dicha población de DC modificadas por ingeniería *in vitro* que son capaces de tratar o prevenir una enfermedad.

Como se describe en este documento, es un método para producir una población de células inmunes modificadas por ingeniería *in vitro* diferentes a DC, por ejemplo, macrófagos, neutrófilos, mastocitos, eosinófilos, basófilos, células citolíticas naturales y linfocitos (por ejemplo, células B y T) o TSC que expresan de forma condicional una proteína que tiene la función de IL-12, comprendiendo el método las etapas de: (a) modificar al menos una parte de las células inmunes diferentes a DC o TSC introduciendo en dichas células inmunes diferentes a DC o TSC un vector que alberga un conmutador génico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene la función de IL-12, produciendo de este modo dicha población de células inmunes modificadas por ingeniería *in vitro* diferentes a DC o TSC que son capaces de tratar o prevenir una enfermedad.

En otras realizaciones, la invención describe el aislamiento y enriquecimiento de DC, células inmunes diferentes a DC o TSC. Las DC pueden aislarse de médula ósea de seres humanos, ratones, u otros mamíferos. Las células dendríticas pueden aislarse de la sangre de seres humanos, ratones u otros mamíferos. En pacientes humanos, las poblaciones de células dendríticas pueden aislarse mediante un procedimiento de leucoféresis conocido en la técnica, donde se aísla y retira una fracción de glóbulos blancos y se vuelven a infundir otros componentes sanguíneos al paciente. En una realización, las DC se obtienen de médula ósea murina como se ha descrito previamente (Tatsumi *et al.*, 2003). En resumen, se cultiva médula ósea (BM) de ratón de tipo silvestre o EGFP Tg

- 5 en medio condicionado (CM) suplementado con 1000 unidades/ml de factor estimulador de colonias de granulocitos/macrófagos murino recombinante y mL-4 recombinante (Peprotech, Rocky Hill, NJ) a 37 °C en una incubadora humidificada, de CO₂ al 5 % durante 7 días. Después se aíslan las DC CD11c⁺, por ejemplo, usando perlas MACSTM específicas, según las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Las DC CD11c⁺ producidas de este modo eran >95 % puras basado en la morfología y co-expresión de los antígenos CD11b, CD40, CD80, y MHC clase I y clase II.
- 10 Una realización de la invención proporciona el uso de DC modificadas por ingeniería que expresan de forma condicional una proteína que tiene la función de IL-12 adecuadas para aplicaciones terapéuticas para el tratamiento de cáncer, o tumores o ambos como terapia génica en organismo humano o no humano. En otra realización de la invención se proporcionan DC modificadas por ingeniería que expresan de forma condicional una proteína que tiene la función de IL-12 y/o una proteína que tiene la función de IFN-alfa adecuadas para aplicaciones terapéuticas para el tratamiento de cáncer, o tumores o ambos como terapia génica en organismo humano o no humano.
- 15 En una realización, la invención describe DC modificadas por ingeniería que contienen un conmutador génico.
- En otra realización, la invención describe un método para tratar tumores en un mamífero que comprende administrar una cantidad eficaz de un ligando diacilhidrazina.
- 20 En otra realización, la invención describe un método para tratar tumores en un mamífero que comprende administrar una cantidad eficaz de RG-115830 o RG-115932.
- En otra realización, la invención describe kits que comprenden células dendríticas modificadas por ingeniería para contener un conmutador génico y que comprenden un ligando que activa el conmutador génico.
- 25 En otra realización, la invención describe kits que comprenden células dendríticas modificadas por ingeniería para contener un conmutador génico y que comprenden una composición que contiene RG-115830 o RG-115932.
- 30 En otra realización, la invención usa DC modificadas por ingeniería, células inmunes diferentes a DC, o TSC que contienen al menos una parte de un receptor de ecdisona. En otra realización, la invención usa DC modificadas por ingeniería, células inmunes diferentes a DC, o TSC que contienen un conmutador génico basado en receptor de ecdisona. En otra realización, la invención usa DC modificadas por ingeniería, células inmunes diferentes a DC, o TSC que contienen RheoSwitch. En otra realización, la invención describe un kit que comprende DC modificadas por ingeniería, células inmunes diferentes a DC, o TSC que contienen un conmutador génico y un ligando que modula el conmutador génico. En otra realización, los kits comprenden adicionalmente un ligando diacilhidrazina. En otra realización, el kit comprende adicionalmente RG-115830 o RG-115932.
- 35 También se describe en este documento una población modificada por ingeniería de DC. DC cultivadas en el día 7 no se trataron, se infectaron con adenovirus recombinante que codifica IL-12p70 murina dirigida por un promotor constitutivo (rAd.cIL12) o inducible (rAd.RheoIL12), o se infectaron con vector adenoviral de control simulado (rAdΨ5), sobre un intervalo de multiplicidad de infección (MOI). Después de 48 h, las DC infectadas se recogieron y analizaron para el fenotipo y para la producción de IL-12p70 usando un kit de ELISA específico (BD-PharMingen, San Diego, CA), con un nivel inferior de detección de 62,5 pg/ml.
- 40 En otra realización, la invención proporciona el uso de una población modificada por ingeniería *in vitro* de DC, células inmunes diferentes a DC, o TSC que comprenden un vector, por ejemplo, un vector de ADN, que tiene un conmutador génico capaz de expresar de forma condicional una proteína que tiene la función de IL-12, y que comprenden adicionalmente ligando activador. En otra realización, la invención proporciona el uso de una población modificada por ingeniería *in vitro* de DC, células inmunes diferentes a DC, o TSC que comprenden un vector que tienen un conmutador génico capaz de expresar de forma condicional una proteína que tiene la función de IL-12 y/o una proteína que tiene la función de IFN-alfa, y que comprenden adicionalmente ligando activador.
- 45 En una realización más, la invención describe un método para tratar cáncer, por ejemplo, melanoma o glioma, administrando DC modificadas por ingeniería, células inmunes diferentes a DC, o TSC a un paciente y después administrando un ligando activador, tal como RG-115919, RG-115830 o RG-115932, a dicho paciente. El paciente puede ser un ser humano o un animal con cáncer. Los métodos y productos de tratamiento, células modificadas por ingeniería, kits, y ligandos tienen aplicación en terapia en seres humanos y en terapia veterinaria en animales. Por lo tanto, los productos y métodos se contemplan para usarse para propósitos humanos y de veterinaria animal.
- 50 En una realización más, la invención describe un método para tratar cáncer, por ejemplo, melanoma o glioma, administrando DC modificadas por ingeniería, células inmunes diferentes a DC, o TSC a un paciente y después administrando un ligando activador, tal como RG-115919, RG-115830 o RG-115932, a dicho paciente. El paciente puede ser un ser humano o un animal con cáncer. Los métodos y productos de tratamiento, células modificadas por ingeniería, kits, y ligandos tienen aplicación en terapia en seres humanos y en terapia veterinaria en animales. Por lo tanto, los productos y métodos se contemplan para usarse para propósitos humanos y de veterinaria animal.
- 55 La invención describe que expresión condicional de proteína IL-12 en DC (mencionadas como DC.RheoIL12), células inmunes diferentes a DC, o TSC puede superar el impacto inmunológico de IL-12 de forma prematura dentro de la lesión tumoral y después dentro de los ganglios linfáticos de drenaje tumoral que no podía resolverse con respecto al resultando terapéutico con esquemas convencionales de terapia génica. Se ha descubierto adicionalmente que la cronología de expresión de IL-12 después de la administración de DC modificadas por ingeniería, células inmunes diferentes a DC, o TSC es crítica para el tratamiento satisfactorio del cáncer.
- 60 La invención describe que expresión condicional de proteína IL-12 en DC (mencionadas como DC.RheoIL12), células inmunes diferentes a DC, o TSC puede superar el impacto inmunológico de IL-12 de forma prematura dentro de la lesión tumoral y después dentro de los ganglios linfáticos de drenaje tumoral que no podía resolverse con respecto al resultando terapéutico con esquemas convencionales de terapia génica. Se ha descubierto adicionalmente que la cronología de expresión de IL-12 después de la administración de DC modificadas por ingeniería, células inmunes diferentes a DC, o TSC es crítica para el tratamiento satisfactorio del cáncer.
- 65 La invención describe que expresión condicional de proteína IL-12 en DC (mencionadas como DC.RheoIL12), células inmunes diferentes a DC, o TSC puede superar el impacto inmunológico de IL-12 de forma prematura dentro de la lesión tumoral y después dentro de los ganglios linfáticos de drenaje tumoral que no podía resolverse con respecto al resultando terapéutico con esquemas convencionales de terapia génica. Se ha descubierto adicionalmente que la cronología de expresión de IL-12 después de la administración de DC modificadas por ingeniería, células inmunes diferentes a DC, o TSC es crítica para el tratamiento satisfactorio del cáncer.

En un aspecto, la invención describe una composición farmacéutica adecuada para administración a un ser humano o un animal no humano que comprende una población de DC modificadas por ingeniería *in vitro*, células inmunes diferentes a DC, o TSC que expresan de forma condicional una proteína que tiene la función de IL-12, o que expresan de forma condicional IL-12 y/o IFN-alfa, donde la formulación es adecuada para administración por administración intratumoral. La invención proporciona adicionalmente una composición farmacéutica que comprende un ligando activador, tal como RG-115830 o RG-115932, donde la composición es adecuada para administración por administración intraperitoneal, oral, o subcutánea.

En la realización particular descrita en este documento, la invención describe un método para tratar un tumor, que comprende:

- a. administrar por vía intratumoral en un mamífero las DC modificadas por ingeniería *in vitro* descritas anteriormente; y
- b. administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un ligando activador.

Por ejemplo, la invención describe un método para tratar un tumor, que comprende las etapas en orden de:

- a. proporcionar DC modificadas por ingeniería *in vitro*;
- b. administrar por vía intratumoral en un mamífero dichas DC modificadas por ingeniería *in vitro*; y
- c. administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un ligando activador.

También se describe en este documento un método para tratar un tumor, que comprende:

- a. administrar por vía intratumoral en un mamífero las células inmunes modificadas por ingeniería *in vitro* diferentes a células dendríticas, por ejemplo, macrófagos, neutrófilos, mastocitos, eosinófilos, basófilos, células citolíticas naturales y linfocitos (por ejemplo, células B y T) o células de soporte de terapia, que se han descrito anteriormente; y
- b. administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un ligando activador.

En una realización, las DC modificadas por ingeniería *in vitro*, células inmunes diferentes a DC o TSC se administran una vez. En otra realización, las DC, células inmunes diferentes a DC o TSC se administran más de una vez si la administración única demuestra ser segura y bien tolerada y fuera beneficioso para el paciente inyecciones adicionales. Los criterios de retratamiento es que la enfermedad del sujeto sea estable o muestre signos clínicos (es decir, escáneres CT (regresión del tumor o tumores), química sérica, análisis de orina, hematología, signos vitales, disminución en el diámetro del tumor, etc.) o subjetivos (es decir, estado ECOG mejorado, etc.) de mejora. El retratamiento puede iniciarse a las 1, 2, 3 ó 4 semanas, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, ó 12 meses, o 1, 2, 3, 4 ó 5 años del primer tratamiento.

La eficacia y seguridad de múltiples dosis del transgén pueden evaluarse por biopsias de aspiración con aguja fina del tumor y ganglios linfáticos de drenaje asociados. Estos pueden recogerse en el día -12 a -7 y el día 14 del periodo de retratamiento para evaluación *in vivo* de expresión transgénica de hIL-12 y respuesta inmune celular. Las biopsias pueden evaluarse por microscopía óptica convencional e inmunohistoquímica para evaluar la infiltración celular de células T en el tumor y ganglios linfáticos de drenaje, puede usarse RT-PCR sobre ARN con cebadores diseñados apropiadamente. Puede extraerse sangre para un perfil de citoquinas séricas en el día -12 a -7, el día 8 y el día 14 del periodo de retratamiento. Puede obtenerse un perfil de citoquinas séricas para determinar si la expresión de otras citoquinas está afectada por el tratamiento con el transgén de hIL-12. Puede hacerse ensayo combinado de citoquinas en el suero por Luminex para IL-12, INF-gamma, IP-10, y otras citoquinas Th1/Th2 tales como IL-1, TNF-alfa, IL-4, IL-5, e IL-10.

El ligando activador puede administrarse sustancialmente al mismo tiempo que las DC modificadas por ingeniería *in vitro*, células inmunes diferentes a DC, o TSC, por ejemplo, en una hora antes o después de la administración de las células. En una realización, el ligando activador se administra a las o menos de aproximadamente 24 horas después de la administración de las DC modificadas por ingeniería *in vitro*, células inmunes diferentes a DC, o TSC. Como se describe en este documento, el ligando activador se administra a las o menos de aproximadamente 48 horas después de las DC modificadas por ingeniería *in vitro*, células inmunes diferentes a DC, o TSC. En otra realización, el ligando es RG-115932. En otra realización, el ligando se administra a una dosis de aproximadamente 1 a 50 mg/kg/día. En otra realización, el ligando se administra a una dosis de aproximadamente 30 mg/kg/día. En una realización, el ligando se administra diariamente durante un periodo de 5 a 28 días. En otra realización, el ligando se administra diariamente durante un periodo de 14 días. En otra realización, se administran aproximadamente 1×10^6 a 1×10^8 células. En otra realización, se administran aproximadamente 5×10^7 células.

Para demostrar una terapia génica mediada por IL-12 eficaz, se usa un sistema de expresión de ADNc de IL-12 condicional que permite la activación de la producción de IL-12 por células DC.RheoIL12 en diversos momentos puntuales después de inyección intratumoral. Basándose en los resultados en el modelo de melanoma B16 agresivo en ratones C57BL/6, se hicieron las siguientes conclusiones: 1) se secretan niveles elevados de IL-12 a partir de DC.RheoIL12 en presencia del ligando activador RG-115830 pero no en ausencia del ligando; 2) la terapia basada

en DC.RheoIL12 intratumoral es tan eficaz como la terapia basada en DC.cIL12 intratumoral siempre que RG-115830 se administre a animales tratados en 24 h desde la inyección de DC (y en momentos puntuales posteriores de provisión de ligando, la terapia RG-115830 falla); 3) la expresión de IL-12 en DC parece prolongar la supervivencia de estas células en el microentorno tumoral y está asociada con cantidades mayores de DC inyectadas por vía intratumoral que migran a ganglios linfáticos de drenaje tumoral; y 4) la correlación inmune más fuerte con el resultado de terapia es el nivel de células T CD8⁺ específicas de tumor cebadas de forma cruzada por la terapia y no la cantidad de DC inyectadas sostenida en el microentorno tumoral. Globalmente, estos datos sugieren que las terapias basadas en DC.IL12 probablemente triunfan basándose en su influencia positiva sobre los efectores aferentes (de cebador cruzado) de células T CD8⁺ de Tipo-1 y no sobre eventos eferentes posteriores, tales como reclutamiento mediado por DC inyectadas de células T anti-tumorales en el microentorno tumoral, etc.

Antes de la inyección intratumoral, las células (células inmunes o TSC) pueden tratarse con un factor para estimular la actividad de las células. Por ejemplo, las células pueden tratarse con una molécula co-estimuladora tal como molécula co-estimuladora positiva incluyendo OX40L, 4-1BBL, CD40, CD40L, GITRL, CD70, LIGHT o ICOS-L o una molécula co-estimuladora negativa tal como anticuerpos anti-CTLA4, anti-PD-L1 o anti-PD-L2. Por ejemplo, las células (por ejemplo, DC, células inmunes o TSC) pueden incubarse con una célula que expresa una o más moléculas co-estimuladoras, por ejemplo, células de linfoma J588 que expresan la molécula ligando CD40. En otra realización, las células (células inmunes o TSC) pueden tratarse con una contra-molécula supresora inmune (inhibidor de tolerancia) tal como anticuerpos anti-TGF-beta (para inhibir la señalización TGF dentro del microentorno), anticuerpos anti-IL10, TGF-beta RILDN (para inhibir la señalización TGF dentro de células modificadas con genes), IL-10R DN, dnFADD (para inhibir las vías de muerte celular dentro de las células), anticuerpos anti-SOCS1, ARNip o señuelo (para inhibir la señalización supresora de citoquinas dentro de las células), o anticuerpos anti-TGF-alfa.

La producción de IL-12 a partir de DC y otras células presentadoras de antígeno actúa sobre células T CD4⁺ y CD8⁺ para sesgarlas en un fenotipo de tipo Th1 o Tc1, respectivamente. Por lo tanto, es posible medir el efecto de IL-12 sobre una población de células midiendo el nivel de expresión o actividad de la citoquina tipo Th1/Tc1, IFN- γ en una muestra biológica de un paciente.

Como se describe en este documento, es un método para determinar la eficacia de un régimen terapéutico basado en DC modificadas por ingeniería *in vitro*, células inmunes diferentes a DC o TSC en un paciente con cáncer, que comprende:

- a. medir el nivel de expresión o el nivel de actividad o ambos de interferón-gamma (IFN- γ) en una primera muestra biológica obtenida de un paciente humano antes de la administración de DC modificadas por ingeniería *in vitro*, células inmunes diferentes a DC, o TSC, generando de este modo a nivel de control;
- b. administrar por vía intratumoral a dicho paciente las DC modificadas por ingeniería *in vitro*, células inmunes diferentes a DC, o TSC;
- c. administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de ligando activador;
- d. medir el nivel de expresión o el nivel de actividad o ambos de IFN- γ en una segunda muestra biológica obtenida de dicho paciente en un momento después de la administración de dicho ligando activador, generando de este modo datos para un nivel de ensayo; y
- e. comparar el nivel de control con el nivel de ensayo de IFN- γ , donde datos que muestran un aumento en el nivel de expresión, actividad, o ambos de IFN- γ en el nivel de ensayo respecto al nivel de control indican que el régimen de tratamiento terapéutico es eficaz en dicho paciente.

Como se describe en este documento, es un método para determinar la eficacia de un régimen terapéutico basado en células inmunes modificadas por ingeniería *in vitro* diferentes de DC o TSC en un paciente con cáncer, que comprende:

- a. medir el nivel de expresión o el nivel de actividad o ambos de interferón-gamma (IFN- γ) en una primera muestra biológica obtenida de un paciente humano antes de la administración de células inmunes modificadas por ingeniería *in vitro* diferentes a DC o TSC, generando de este modo un nivel de control;
- b. administrar por vía intratumoral a dicho paciente células inmunes modificadas por ingeniería *in vitro* diferentes a DC o TSC;
- c. administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de ligando activador;
- d. medir el nivel de expresión o el nivel de actividad o ambos de IFN- γ en una segunda muestra biológica obtenida de dicho paciente en un momento después de la administración de dicho ligando activador, generando de este modo datos para un nivel de ensayo; y
- e. comparar el nivel de control con el nivel de ensayo de IFN- γ , donde datos que muestran un aumento en el nivel de expresión, actividad, o ambos de IFN- γ en el nivel de ensayo respecto al nivel de control indican que el régimen de tratamiento terapéutico es eficaz en dicho paciente.

El término "sujeto" significa un insecto, planta o animal intacto. También se prevé que los ligandos funcionarán igualmente bien cuando el sujeto sea un hongo o levadura. Se entiende que el término "sujeto" es cualquier sujeto,

particularmente un sujeto mamífero, para el cual se desea diagnóstico, pronóstico, o terapia. Mamífero incluye, aunque sin limitación, seres humanos, animales domésticos, animales de granja, animales de zoológico tales como osos, animales deportivos, animales de compañía tales como perros, gatos, cobayas, conejos, ratas, ratones, caballos, ganado vacuno, osos, vacas; primates tales como simios, monos, orangutanes, y chimpancés; cánidos tales como perros y lobos; félidos tales como gatos, leones, y tigres; équidos tales como caballos, burros, y cebras; animales para alimentación tales como vacas, cerdos, y ovejas; ungulados tales como ciervos y jirafas; roedores tales como ratones, ratas, hámsteres y cobayas; y etc. En ciertas realizaciones, el animal es un sujeto humano.

El término "animal" pretende abarcar una "animal" singular así como "animales" plurales y comprende mamíferos y aves, así como peces, reptiles, y anfibios. El término animal también abarca animales de modelo, por ejemplo, animales de modelo de enfermedad. En algunas realizaciones, el término animal incluye animales valiosos, económicamente o de otro modo, por ejemplo, ganado de cría económicamente importante, animales de carreras, animales de exhibición, animales de colección, animales raros o en peligro, o animales de compañía. En particular, el mamífero puede ser un sujeto humano, un animal para alimentación o un animal de compañía.

Como se usa en este documento, un "mamífero que lo necesita" se refiere a un mamífero para el cual es deseable tratar, es decir, reducir el tamaño de un tumor o eliminar un tumor.

El método descrito en este documento depende de la captura del antígeno tumoral por las células dendríticas inyectadas por vía intratumoral desde el entorno tumoral y el cebador de las células T en los ganglios linfáticos de drenaje para desarrollar una respuesta de células T específica de tumor. Por lo tanto, la DC debe estar en un estado de alta actividad endocítica en el momento de inyección intratumoral para un óptimo beneficio terapéutico. Se ha establecido bien que las DC inmaduras preparadas a partir de monocitos CD14⁺ por tratamiento con GM-CSF e IL-4 durante aproximadamente 6-7 días son de fenotipo inmaduro y muestra una elevada tasa de endocitosis (Cella *et al.* 1999; Gilboan, 2007). La maduración de las DC está asociada con la supresión de la actividad endocítica. La IL-12 ha demostrado actuar sobre las DC inmaduras y señalar la expresión de factores que inducen la maduración (Nagayama *et al.* 2000). Por lo tanto, usando el RTS, es posible optimizar el resultado terapéutico humano retardando la expresión de IL-12 en las DC transducidas hasta que se inyecten en el tumor. Como un sistema de expresión constitutiva carece de esta capacidad de controlar de forma temporal la expresión, la acción autocrina de la IL-12 producida y el curso resultante de maduración no pueden controlarse (Mazzolini *et al.* 2005). Además, la invención que ensayará el funcionamiento de un sistema regulado de expresión génica en sujetos humanos puede encontrar aplicación del sistema en otras áreas de terapia génica humana.

Sin el deseo de limitarse a teoría alguna, se espera que la invención soporte el uso de terapia génica basada en DC modificadas por ingeniería *in vitro*, células inmunes diferentes a DC o TSC administradas por vía intratumoral en el entorno clínico, centrándose en la respuesta clínica objetivo como criterio de valoración principal del estudio, y las células T CD8⁺ anti-tumores cebadas de forma cruzada (que producen IFN- γ) como criterio de valoración secundario del estudio. Los datos revelan que la capacidad de activar y desactivar la expresión de IL-12 *in vivo* añade un elemento de seguridad y control terapéutico al tratamiento porque tanto la cronología como el nivel de expresión de IL-12 pueden controlarse mediante la administración de ligando, y además porque se espera que la cronología de la expresión de IL-12 sea crítica para la eficacia terapéutica del método.

La invención soporta adicionalmente las aplicaciones terapéuticas de células modificadas por ingeniería *in vitro* con genes de interés expresados de forma condicional como enfoques innovadores para el tratamiento eficaz y eficiente de enfermedades humanas.

En caso de conflicto entre cualquier contenido o sugerencia de cualquier referencia citada en este documento y la memoria descriptiva, prevalecerá la última, para los propósitos de la invención.

Ahora se describirán realizaciones específicas de acuerdo con los métodos de la invención en los siguientes ejemplos, que se proporcionan con fines de ilustración y no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

DC.RheoIL12 produce de forma condicional elevados niveles de IL-12p70 en respuesta a ligando RG-115830 *in vitro*

1.1 Materiales y métodos

1.1.1 Ratones

Se adquirieron ratones hembra de 6-8 semana de edad C57BL/6 de tipo silvestre y C57BL/6-TgN(ACTbEGFP) 10sb/J EGFP Tg del Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) y se mantuvieron en jaulas micro-aislantes. Los animales se manipularon de acuerdo con las recomendaciones para el apropiado cuidado y uso de animales de laboratorio.

1.1.2 Líneas celulares

Las líneas celulares H-2b de melanoma B16 y timoma EL-4, singénicas a ratones C57BL/6 se han descrito previamente (Itoh *et al.*, 1994). Las líneas celulares se mantuvieron en CM (RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal inactivado por calor al 10 %, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, y L-glutamina 10 mM; todos los reactivos de Invitrogen, Carlsbad, CA) en una incubadora humidificada al 5 % de CO₂ y 37 °C.

1.1.3 Generación de células dendríticas (DC)

Las DC se generaron a partir de médula ósea murina como se ha descrito previamente (Tatsumi *et al.*, 2003). En resumen, se cultivó BM de ratón de tipo silvestre o EGFP Tg en CM suplementado con 1000 unidades/ml de factor estimulador de colonias de granulocitos/macrófagos murino recombinante y mIL-4 recombinante (PeproTech, Rocky Hill, NJ) a 37 °C en una incubadora humidificada, al 5 % de CO₂ durante 7 días. Las DC CD11c⁺ después se aislaron usando perlas MACSTM específicas, según el protocolo del fabricante (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Las DC CD11c⁺ producidas de esta manera eran >95 % puras basado en la morfología y co-expresión de los antígenos CD11b, CD40, CD80, y MHC clase I y clase II.

1.1.4 Vectores virales

El vector adenoviral de control rAdΨ5 y rAd.cIL12, que codifican mIL-12 dirigido por un promotor CMV (Tatsumi *et al.*, 2003), se produjeron y proporcionaron por la University of Pittsburgh Cancer Institute's Vector Core Facility.

El vector rAd.RheoIL12 se produjo del siguiente modo. Las secuencias codificantes de VP16-RXR y Gal4-EcR separadas por la secuencia del sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) de EMCV se insertaron en el vector lanzadera adenoviral bajo el control del promotor de ubiquitina C humana. Posteriormente, las secuencias codificantes de las subunidades p40 y p35 de IL12 separadas por una secuencia IRES, y colocadas bajo el control de un promotor inducible sintético, se insertaron cadena arriba del promotor de ubiquitina C (véase la FIG. 1). El funcionamiento del sistema mediante la expresión de las dos proteínas de fusión (VP-16 RXR frente a Gal4-EcR) bajo promotores diferentes de fuerzas variables mostró que una mayor proporción VP16-RXR a Gal4-EcR daba el mejor funcionamiento. Por tanto, VP-16 RXR cadena arriba del IRES y Gal-4 EcR cadena abajo dieron funcionamiento óptimo que el diseño contrario.

El vector lanzadera que porta estas unidades de transcripción para las dos proteínas de fusión y las subunidades inducibles de IL12 se recombinaron con la estructura adenoviral (AdEasy1, stratagene La Jolla, CA) en células de *E. coli* BJ5183. Después de verificar el clon recombinante, el plásmido que porta el genoma rAd.RheoIL12 se cultivó en y se purificó de células XL10-Gold, se retiró por digestión la estructura plasmídica y se compactó por transfección en células HEK 293.

La reserva viral primaria resultante se amplificó por re-infección de células HEK 293 y se purificó por centrifugación en gradiente de densidad de CsCl.

1.1.5 ELISA

Las DC cultivadas en el día 7 no se trataron, se infectaron con Ad recombinantes que codifican IL-12p70 murina dirigida por un promotor constitutivo (rAd.cIL12) o inducible (rAd.RheoIL12), o se infectaron con vector de control simulado rAdΨ5, sobre un intervalo de MOI. En diversos momentos puntuales después de esto (0 - 48 h), las DC después se cultivaron en ausencia o presencia de un ligando activador (10 - 200 µg/ml) durante 24 h adicionales antes del análisis de secreción de IL-12p70 usando un kit ELISA específico (BDPharMingen, San Diego, CA; nivel inferior de detección = 62,5 pg/ml). En algunos casos, para discernir la rigurosidad de la producción condicional de citoquinas, las DC infectadas con rAd.RheoIL12 (es decir DC.RheoIL12), que se habían pretratado con el ligando activador, se lavaron del ligando y se cultivaron en medio de control durante 24 h adicionales antes del análisis de secreción de IL-12p70. Como alternativa, después de 48 h, las DC infectadas se recogieron y analizaron para el genotipo y para la producción de IL-12p70 usando el kit ELISA (BD-PharMingen, San Diego, CA), con un nivel inferior de detección de 62,5 pg/ml.

1.1.6 Citometría de flujo

Para el análisis fenotípico de DC infectadas por adenovirus, se usaron mAb conjugados con PE o FITC contra moléculas de superficie celular de ratón (CD11b, CD11c, CD40, CD54, CD80, CD86, H-2Kd, I-Ad (todas de BD-PharMingen)) y controles apropiados de isotipo, y se realizó análisis citométrico de flujo usando un citómetro de flujo FACscan (Becton Dickinson, San Jose, CA).

1.2 Resultados

1.2.1 DC derivadas de BM murina infectadas con Rheo-IL12 producen de forma condicional elevados niveles de IL-12p70 cuando se tratan con ligando *in vitro*.

DC cultivadas de BM de ratón C57BL/6 (B6) durante 7 días en presencia de rmlL-4 y rmGM-CSF se dejaron sin tratar, o se infectaron a diversas MOI con rAd.Ψ5 de control, rAd.cIL-12 (que codifica mL-12p70 bajo un promotor constitutivo CMV) o rAd.RheoIL12 (que codifica IL-12 p70 bajo un promotor condicional sensible al ligando de molécula pequeña RG-115830). Cuarenta y ocho horas después de la infección, las DC se cultivaron en ausencia o presencia de RG-115830 durante 24 h adicionales, momento en el cual se recogieron los sobrenadantes de cultivo para la cuantificación de la producción de IL-12p70 por ELISA. Como se muestra en la FIG. 2A, las DC no infectadas de control o las DC infectadas con Ad.Ψ5 en ausencia o presencia de fármaco exógeno no lograron producir niveles elevados de IL-12p70 en comparación con DC infectadas con rAd.cIL12 (DC.cIL12). Las DC infectadas con rAd.RheoIL-12 (DC.RheoIL12) solamente produjeron IL-12p70 cuando se trataron con RG-115830 (véase la FIG. 2A y 2B). Basándose en los resultados de experimentos de "criss-cross", la producción óptima por DC infectadas de IL-12p70 sucedió usando una MOI de 100, con células tratadas con 50-200 µg/ml de RG-115830 (FIG. 2A). La provisión retardada de RG-115830 a DC.RheoIL12 durante hasta 48 h no produjo ninguna producción significativamente reducida de IL-12p70 en comparación con la adición de este ligando en el momento puntual 0 h *in vitro* (FIG. 2B). Finalmente, la retirada del ligando silenció de forma precisa la capacidad de DC.RheoIL12 (previamente activada por ligando) de continuar produciendo niveles elevados de IL-12p70 *in vitro* (FIG. 2C).

Ejemplo 2

Administración intratumoral de células dendríticas modificadas por ingeniería *in vitro* a animales

2.1 Métodos y materiales

2.1.1 Modelo de tumor B16

Ratones B6 recibieron inyección subcutánea de 1×10^5 células de melanoma B16 en el flanco derecho en el día 0. En el día 7, los tumores alcanzaron un tamaño de aproximadamente 20-30 mm² y los ratones se trataron con inyecciones i.t. de PBS o 1×10^6 de DC de control frente a transducidas con adenovirus (MOI = 100) en un volumen total de 50 µl de PBS. Los ratones también recibieron inyecciones i.p. de 200 µg de RG-115830 (en 50 µl de DMSO) frente a control de vehículo DMSO que se iniciaron a las 0 h, 24 h o 48 h después de la administración de DC, como se indica. Después del inicio, los ratones recibieron un total de 5 inyecciones intraperitoneales diarias consecutivas de RG-115830 a esta dosis. En experimentos adicionales, se administró ligando empezando en el día de inyección de DC y después se terminó 1, 3 o 5 días después de la inyección de DC para discernir si un cese prematuro de la promoción del transgén de IL-12p70 reducía los beneficios terapéuticos de este enfoque. En todos los casos, el tamaño del tumor se evaluó cada 3 ó 4 días y se registró en mm² determinando el producto de los diámetros perpendiculares más grandes medidos por calibres vernier. Los datos se presentan como el área promedio del tumor ± DT. Todas las cohortes de animales contenían 5 ratones/grupo.

En experimentos indicados, los animales que quedaron libres de tumor (45 días) post-terapia se re-expusieron a las células de melanoma B16 (10^5 células inyectadas en el flanco izquierdo, es decir contralateral al sitio original de exposición a B16) y de carcinoma de colon MC38 (10^5 células en el flanco derecho) para discernir la presencia y especificidad de inmunidad de memoria en estos ratones. Todos los datos se presentaron como el área promedio del tumor ± DT. Todas las cohortes de animales contenían 5 ratones/grupo.

Para evaluar el destino y la función de las DC inyectadas, se generaron DC CD11c⁺ derivadas de BM de 7 días a partir de ratones C57BL/6-TgN(ACTbEGFP)10sb/J EGFP Tg. Las DC EGFP⁺ CD11c⁺ se dejaron sin infectar o se infectaron con virus rAd, como se ha indicado anteriormente. Cuarenta y ocho horas después de la infección, se recogieron 1×10^6 DC de control o infectadas con virus, se lavaron en PBS, y se inyectaron en lesiones de tumor B16 del día 7 establecidas en ratones B6 singénicos. Tres días después de la inyección de DC, se extirparon los tumores y ganglios linfáticos inguinales de drenaje (LN), se fijaron durante 1 h en paraformaldehído al 2 % (en PBS), y después se crioprotegieron en sacarosa al 30 % en PBS antes de congelarse rápidamente en isopentano enfriado con nitrógeno líquido. Después se generaron secciones congeladas de cinco micrómetros y se tiñeron con contraste con 2 mg/ml de Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante 3 min. Las secciones lavadas después se montaron en Gelvatol (Monsanto Chemical Co., St. Louis, MO) y se observaron usando un microscopio Olympus BX51 equipado con un dispositivo de cámara a color acoplado de carga enfriada.

2.1.2 Evaluación de respuestas específicas de células T CD8⁺ contra melanoma B16

Se aislaron células T CD8⁺ combinadas hasta una pureza de >95 % de los bazos de 2 ratones tratados/grupo 25 días después de la inoculación de tumor usando clasificación celular con perlas magnéticas (MACSTM; Miltenyi Biotec) y después se co-cultivaron (1×10^5 /pocillo) con 1×10^4 células tumorales irradiadas (10.000 radianes) B16 o EL-4. Después de 48 h de incubación, los sobrenadantes de cultivo se recogieron y se analizaron para la liberación de IFN-γ usando un ELISA comercial (BD-PharMingen) con un límite inferior de detección de 31,5 pg/ml. Los datos se presentan como la media ± DT de determinaciones triplicadas.

2.1.3 Análisis estadístico

Todos los experimentos con tres o más grupos en que se aplicó tratamiento como un diseño completamente aleatorio se analizaron primero por ANOVA factorial de un factor o dos factores. Si el P resultante era $<0,05$, se ensayaban contrastes por pares específicos con un ensayo T con corrección de Welch para varianzas desiguales según lo necesario. Los datos se comprobaron para propiedades de distribución, y se aplicaron transformaciones apropiadas. Se realizaron análisis de la producción de IFN- γ de células T derivadas de esplenocitos con el ensayo exacto de Kruskal-Wallis. Si el P para el ensayo de Kruskal-Wallis era $<0,05$, se evaluaban contrastes a priori con el ensayo de Wilcoxon. El análisis de modelos murinos de tratamiento terapéutico por inoculación de tumor individual se realizó con modelos lineales mixtos. Los datos se transformaron log, se estimó la covarianza dentro del ratón, y se ajustaron los efectos fijos del tratamiento para efectos aleatorios del ratón. Los P sin procesar para comparar pares de grupos en un único momento se ajustaron por re-muestreo bootstrap. Las tasas de regresión tumoral se ajustaron a un modelo lineal generalizado (con vinculación binomial) que incorporaba grupo de tratamiento, día de observación, y su interacción.

2.2 Resultados

2.2.1 La administración intratumoral de DC.cIL12 en solitario o DC.RheoIL12 combinado con administración i.p. de RG-115830 promueve la regresión de lesiones establecidas de melanoma B16 s.c.

Se inyectaron s.c. células de melanoma B16 (1×10^5) en el flanco izquierdo de ratones H-2^b B6 singénicos y se dejaron establecer. En el día 7, los ratones se asignaron aleatoriamente en cohortes de 5 animales cada una, con un tamaño medio de tumor de cohorte de aproximadamente 20-30 mm². Los ratones después recibieron inyecciones intratumorales de PBS o 10^6 DC (pre-infectadas *in vitro* durante 48 h con rAd. Ψ S, rAd.cIL12 o rAd.RheoIL12) en un volumen total de 50 μ l de PBS. Los animales también recibieron inyecciones intraperitoneales de DMSO o RG-115830 (en DMSO) en el momento de la administración de DC (es decir, día 1 de tratamiento) o a las 24 h o 48 h después de la administración de DC (es decir, día 2 de tratamiento). Como se representa en la FIG. 3A y 3B, el tratamiento de ratones con RG-115830 en solitario o DC.RheoIL12 en ausencia de RG-115830 no logró producir ningún beneficio terapéutico. En marcado contraste, los tumores tratados con DC.cIL-12 o DC.RheoIL-12 + RG-115830 (proporcionado en 24 h desde la inyección de DC en concierto con un curso de 5 días de administración de ligando) retrocedieron en tamaño durante las siguientes 3 semanas. Estas terapias fueron estadísticamente indistinguibles basándose en las mediciones del tamaño del tumor, y produjeron tasas del 100 % (5/5 ratones) de regresión tumoral en cada uno de estos casos. De forma interesante, si la administración de RG-115830 se retardaba hasta 48 h después de la inyección intratumoral de DC (en un momento puntual en que este agente puede promover de forma eficaz la producción de IL-12p70 a partir de DC.RheoIL-12 *in vitro*, véase la FIG. 2B), la terapia basada en DC.RheoIL12 provocaba una tasa ligeramente inhibida de crecimiento tumoral ($p < 0,05$ para todos los momentos puntuales después del día 10), pero todos los animales progresaban y requerían sacrificio hacia el día 30 (FIG. 3A). Esto sugiere que el beneficio terapéutico del tratamiento intratumoral con DC.cIL12 es críticamente dependiente de la producción de IL-12p70 en momentos puntuales predominantemente prematuros (que suceden presumiblemente dentro de la lesión tumoral y/o los ganglios linfáticos de drenaje).

Se realizaron experimentos adicionales en que se administró ligando activador (RG-115830) a ratones inyectados con DC.RheoIL-12 durante 1, 3 ó 5 días después de la inyección de DC (FIG. 3B-3C). Los resultados de estos estudios sugieren que la terminación prematura de la administración de ligando impacta sobre la eficacia anti-tumoral de DC.RheoIL-12 suministradas i.t., con inhibición del crecimiento tumoral limitada o eliminada si el ligando no se proporciona a los ratones durante aproximadamente 5 o más días después de la provisión de DC modificadas con gen. Estos hallazgos son coherentes con los datos proporcionados en la FIG. 2B y 2C, y soportan la ajustada regulación (dependiente de ligando) del impacto terapéutico resultante de las DC.RheoIL-12 inyectadas en este modelo. Además, cuando se toman juntos, los resultados representados en la FIG. 3 sugieren fuertemente que la eficacia óptima anti-melanoma asociada con suministro i.t. de DC.RheoIL12 resulta de la provisión del ligando durante un periodo de d1-d5 después de la inyección de DC en tumores B16.

2.2.2 La activación retardada de terapia condicional con DC.RheoIL12 es ineficaz debido al fallo aparente de las DC inyectadas en sobrevivir *in vivo*.

Nuestro informe previo (Tatsumi *et al.*, 2003) sugirió que la inserción del gen de IL-12 en DC promueve la supervivencia potenciada de estas células después de su inyección en el microentorno tumoral y la capacidad consecuente de estas células de cebar de forma cruzada células T CD8⁺ anti-tumores y el reclutamiento concebible de células T efectoras en circulación en el microentorno tumoral *in vivo*. Por tanto, el siguiente intento fue discriminar si el fallo de la terapia con DC-RheoIL12 iniciada (por administración i.p. de RG-115830) 48 h después de la inyección de DC se debía a la incapacidad de las DC de persistir en el microentorno tumoral, la incapacidad de estas células de transitar hasta el LN de drenaje tumoral y/o la incapacidad de células T CD8⁺ específicas de cebarse de forma cruzada como resultado del tratamiento. Se recapituló los experimentos resumidos en la FIG. 3A, con 2 ratones por cohorte sacrificados 72 h después de la inyección intratumoral de DC, con la excepción de que se usaron ratones EGFP Tg (H-2^b) como fuente de médula ósea para la generación de DC. Se extirparon el tumor y LN y se prepararon secciones tisulares para el análisis de DC EGFP⁺ por microscopía de fluorescencia. Los 3 restantes

animales/cohorte se siguieron hasta el día 25, cuando se sacrificaron y se aislaron esplenocitos combinados para el análisis de respuestas de células T CD8⁺ específicas de B16.

5 Como se representa en la FIG. 4, la capacidad de resolver DC EGFP⁺ en tumor o LN 72 h después de inyección i.t. era estrictamente dependiente de la activación del transgén de IL-12 en 24-48 h desde la administración *in vivo* de estas células. Pudieron observarse fácilmente DC.cIL12 y DC.RheoIL12 EGFP⁺ en lesiones B16 y se observaron más raramente dentro de LN de drenaje en ratones inyectados i.t. con DC.cIL12 o DC.RheoIL12 (si RG-115830 se proporcionaba i.p. a las 0 h o 24 h después de la administración de DC). Se detectaron muy pocas o ninguna DC EGFP⁺ en tejidos recogidos de ratones tratados con DC de control (no infectadas) o DC.RheoIL12 (donde la administración de RG-115830 se retardó durante 48 h después de la inyección de DC). Cuando se comparan tejidos de ratones tratados con DC.RheoIL12 y RG-115830 proporcionado a las 0 h frente a 24 h, había más DC EGFP⁺ en el tumor ($p = 0,001$) y también el LN de drenaje ($p = 0,02$) cuando se proporcionaba el fármaco activador más pronto.

15 2.2.3 Los beneficios terapéuticos de la administración de DC.RheoIL12 están asociados con la inducción de células T CD8⁺ específicas e inmunidad anti-tumoral duradera.

Dada la aparente dependencia de la viabilidad de las DC inyectadas en la cronología de la inyección de ligando, se predeciría un grado superior de cebador cruzado de células T CD8⁺ específicas en el caso de ratones que reciben DC.RheoIL12 activadas a las 0 h frente a momentos puntuales posteriores por RG-115830. De forma interesante, aunque esto se observó ciertamente para las cohortes de 0 h (DC.RheoIL-12, d1-d5) frente a 48 h (DC.RheoIL-12, d3-d7) de DC.RheoIL-12, no fue el caso cuando se compararon los grupos de 0 h frente a 24 h (DC.RheoIL-12+L,d2-d6) de DC.RheoIL12 (FIG. 5A). De hecho, las respuestas *in vitro* de células T CD8⁺ esplénicas (secreción de IFN- γ) frente a dianas de tumor relevante B16 frente a irrelevante EL-4 fueron comparable para estas dos cohortes, y éstas se aproximaron cada una a lo detectado en ratones tratados con DC.cIL12. Globalmente, estos perfiles de respuesta de células T CD8⁺ parecían correlacionarse directamente con el resultado de la terapia (FIG. 3A). Similar a la FIG. 5A, la respuesta de células T esplénicas a las células específicas de tumor B16 frente a células MC38 no tratadas por producción de IFN-gamma estuvo correlacionada con el resultado del tratamiento.

30 Para abordar si la terapia eficaz basada en DC.RheoIL12 estaba asociada con el desarrollo de inmunidad anti-tumoral duradera, se (re)-expusieron animales libres de tumor a células de melanoma B16 relevantes o células de carcinoma de colon MC38 irrelevantes en el día 45 (después de la exposición inicial a B16). Como se muestra en la FIG. 5B, todos los ratones previamente curados de sus melanomas mostraron protección específica contra células de tumor B16, mientras que las lesiones de tumor MC38 crecieron progresivamente. Muestra que las células dendríticas de la invención tienen seguridad adicional y control terapéutico potencial para la modalidad de tratamiento (porque tanto la cronología como el nivel de expresión de IL-12 pueden controlarse mediante la administración de ligando).

Ejemplo 3

40 Comparación de la vía/dosis de administración de ligando sobre el efecto terapéutico

3.1 Métodos y materiales

45 Se establecieron melanomas B16 s.c. durante 7 días en los flancos derechos de ratones B6 singénicos. En el día 7, se inyectaron por vía intratumoral (i.t.) 10⁶ DC.SP1-IL12 (cambio óptimo identificado en la comparación de la FIG. 10). Se proporcionó ligando activador (RG-115932) como una inyección i.p., mediante sonda oral en Labrasol, o mediante comida que contiene fármaco proporcionada *ad libitum* empezando en el día precedente a la inyección de DC (y diariamente después de ello durante 6 días). Cada cohorte contenía 5 animales, con crecimiento tumoral controlado cada 3-4 días y presentado como tamaño medio (mm² basado en el producto de mediciones ortogonales). El tratamiento para cada cohorte se describe a continuación.

Cohorte nº	Descripción de tratamiento
1	Control, sin DC, sin ligando
2	Control, sin DC, ligando i.p., 50 mg/kg/día (Máx)
3	Control, sin DC, comida, <i>ad libitum</i> (45 mg/kg/día)
4	Control, sin DC, sonda oral, 30 mg/kg/día
5	DC.SP1-IL12, sin ligando
6	DC.SP1-IL12, i.p., 1 mg/kg/día
7	DC.SP1-IL12, i.p., 3 mg/kg/día
8	DC.SP1-IL12, i.p., 10 mg/kg/día
9	DC.SP1-IL12, i.p., 30 mg/kg/día
10	DC.SP1-IL12, i.p., 50 mg/kg/día
11	DC.SP1-IL12, comida, <i>ad libitum</i> (45 mg/kg/día)
12	DC.SP1-IL12, sonda oral, 30 mg/kg/día

3.2 Resultados

Los resultados muestran que la administración de ligando en solitario a cualquier dosis o mediante cualquier vía no tuvo impacto sobre el crecimiento de tumor B16 (FIG. 6). La terapia con DC-SP1 i.t. es eficaz para controlar el crecimiento de B16, pero solamente si se aplica ligando, produciendo todas las vías de administración de ligando algún grado de eficacia. La terapia con DC-SP1 i.t. usando ligando administrado i.p. produjo un claro patrón de respuesta de inhibición del tumor por dosis de ligando, con efectos anti-tumores óptimos a dosis de ligando >30 mg/kg/día. El ligando aplicado a terapia con DC-SP1 i.t. a una dosis de 30 mg/kg/día fue igualmente eficaz si se administraba ligando por inyección i.p., sonda oral, o mezcla en dieta. Una dosis incluso mayor de ligando proporcionado en la comida fue algo menos eficaz. Como solamente el enantiómero R (RG-115932) es capaz de activar el RTS, la comida que contiene la mezcla racémica proporciona solamente aproximadamente 20 - 22,5 mg/kg/día del enantiómero activo. A este respecto, la regresión tumoral observada en animales que recibieron mezcla racémica AD mediante la comida (es decir, -20 - 22,5 mg/kg/día del enantiómero activo RG-115932) fue coherente con la respuesta a la dosis i.p. observada con RG-115932 puro porque el efecto anti-tumoral en la cohorte de comida estaba entre los observado con los grupos de dosis de 10 y 30 mg/kg/día de RG-115932 i.p.. Estos datos sugieren que la administración oral del ligando es eficaz para inducir un efecto terapéutico. La disponibilidad de administración oral del ligando facilitarían la sobrecarga del tratamiento sobre los pacientes.

Este efecto dependiente de fármaco activador estaba asociado con (1) la expresión transgénica en el tumor y DLN, (2) la supervivencia prolongada de Ad-DC en el microentorno tumoral, (3) la migración y persistencia de AdDC en el DLN, y (4) la inducción de células T CD8⁺ anti B16.

La FIG. 10 muestra una comparación de los efectos de diferentes vectores adenovirales que contienen IL-12. La variante SP1-RheoIL-12 fue la más eficaz de las variantes que contienen Rheoswitch. SP1-RheoIL-12 difiere de oldRheoIL-12 en la estructura del vector (vector AdEasy1 para oldRheoIL-12 y vector RAPAd de ViraQuest en Sp1-RheoIL-12). TTR-RheoIL-12 difiere de oldRheoIL-12 en que contiene un promotor mínimo TTR cadena abajo del elemento de respuesta Gal4. Como ilustra la FIG. 10, SP1-RheoIL-12 fue más eficaz que TTR-RheoIL-12 en reducir el tamaño del tumor de melanoma B16.

La FIG. 11 muestra la ausencia de formación de tumor de melanoma B16 después de la re-exposición de ratones previamente tratados con células dendríticas que contienen IL-12 inducible por Rheoswitch adenoviral recombinante (DC-SP1-RheoIL-12). Esto muestra que se evitaba que los tumores B16 de melanoma crecieran durante hasta 25 días cuando los ratones inmunes a B16 se volvían a inocular 45 días después de la primera inoculación con células B16. Se generaron células dendríticas murinas a partir de médula ósea de ratones B6 por cultivo de 7 días en medio completo (RPMI-1640, FBS al 10 %) que contenía rmlL-4 más rmGM-CSF. Después se aislaron las células dendríticas CD11c positivas usando perlas MACS específicas según el protocolo del fabricante (Miltenyi Biotech) y se infectaron a MOI de 100 usando rAd.IL-12 (RheoIL-12 frente a SP1 frente a TTR) durante 24 horas antes de la inyección de 10E6 DC en tumores B16 de melanoma s.c. establecidos en día 9 (5 ratones por grupo, tumor en el flanco derecho). Los ratones se trataron o no con inyecciones i.p. diarias del ligando activador RG-115830 (30 mg/kg en 50 microlitros de DMSO) en los días 0-4 después de la inyección de DC. El tamaño del tumor se controló cada 3-4 días y se presenta en mm cuadrados como el producto de diámetros ortogonales. Para evaluar la especificidad de protección asociada a la terapia, todos los animales libres de tumor se re-expusieron con 10E5 células de melanoma B16 en el flanco izquierdo frente a células de carcinoma de colon MC38 en el flanco derecho en día 45 después de la exposición inicial al tumor B16. Se formaron tumores MC38 pero no se formaron tumores B16.

La FIG. 12 muestra una comparación entre las cantidades de células dendríticas (DC-SP1-RheoIL-12) inyectadas en el tumor B16 (10^5 , 10^6 , 10^7) y la longitud de tiempo de administración de ligando y regresión tumoral en modelo de ratón de tumor de melanoma B16 (6 días, 13 días). La FIG. 12 muestra la dependencia de la dosis de DC transducidas inyectadas en el tumor y la duración de administración de AD (inyección i.p., 30 mg/kg/día) sobre la inhibición del crecimiento tumoral. Se dio a los ratones que albergaban tumor una única inyección intratumoral de AdDC a dosis de 10^5 , 10^6 , y 10^7 células e inyección i.p. diaria de ligando activador en una única dosis de 30 mg/kg/día durante 6 días o 13 días empezando en el día de la inyección de 10^7 células. Además, se observó una supresión significativamente más robusta del crecimiento tumoral so el ligando activador se proporcionaba durante 13 días en lugar de 6 días. El ligando (RG-115932) administrado durante 13 días en una fila en combinación con 10^7 células dendríticas fue eficaz en causar regresión tumoral durante un periodo de 25 días. Esto sugiere que en contraste con la creencia de que las DC transducidas *ex vivo* sobreviven solamente unos pocos días después de su inyección en tumores, las AdDC que expresan IL-12 bajo el control de los RTS probablemente aún interaccionan durante más de 1 semana después de la inyección intratumoral y pueden incluso permanecer vivas y sensibles al ligando activador durante tanto como 13 días después de la inyección. No hubo efecto del ligando activador en solitario (sin AdDC) sobre el crecimiento tumoral.

En un experimento similar a la FIG. 12, el ligando activador se administró por sonda oral durante 9 y 12 días. Se evaluó la respuesta a dosis anti-tumoral con una formulación oral del ligando activador a diferentes dosis en Labrasol. Se observó un efecto anti-tumoral dependiente de dosis y las mayores respuestas se observaron en animales que recibieron 50 mg/kg/día por vía oral durante 12 días. De hecho, a todas las dosis ensayadas, el tratamiento de 13 días con ligando activador fue superior a los 9 días de tratamiento con fármaco activador. Esto

sugiere que las DC que sobreviven y sostienen la producción de IL-12 durante al menos 9 a 12 días *in vivo* (en el microentorno tumoral u órganos linfoides) son importantes para una eficacia óptima de tratamiento.

5 La FIG. 13 muestra que la terapia descrita en este documento no estaba asociada con una pérdida adversa en el peso del animal debido a debilitamiento. El debilitamiento y la pérdida de peso están a menudo asociados con elevados niveles de interferón-gamma y TNF-alfa que se sabe que están regulados positivamente en respuesta a IL-12.

10 Se establecieron melanomas B16 s.c. durante 7 días en los flancos derechos de 5 ratones B6 singénicos. En el día 7, se inyectaron por vía intratumoral (i.t.) DC.SP1-IL-12 (DC derivadas de médula ósea infectadas a una MOI de 100 usando el conmutador óptimo SP1) a dosis de 10E5, 10E6 o 10E7. Se proporcionó RG-115932 por inyección i.p. empezando en el día de la inyección de DC (y diariamente después de ello durante 6 días o 13 días). Cada cohorte contenía 5 animales, con crecimiento tumoral controlado cada 3-4 días y presentado como tamaño medio (mm cuadrados basado en el producto de mediciones ortogonales). También se evaluaron los pesos de los animales individuales en el momento de las mediciones del tumor (FIG. 13). Todos los animales que quedaron libres de enfermedad por cualquier terapia se re-expusieron en el día 50 (después de la inoculación inicial de tumor B16) con 10E5 células de melanoma B16 en el flanco opuesto (flanco izquierdo) del tumor original y con 10E5 células de carcinoma de colon MC38 en el flanco derecho. El crecimiento tumoral se controló cada 3-4 días y se comparó frente al crecimiento observado en animales vírgenes (sin tratar) (véase la FIG. 12).

20 La FIG. 14 muestra la ausencia de formación de tumor de melanoma B16 después de re-exposición de ratones previamente tratados con células dendríticas que contienen IL-12 inducible por Rheoswitch adenoviral recombinante y ligando activador RG-115932. La FIG. 14 por lo tanto muestra que se evitaba que los tumores B16 de melanoma crecieran durante hasta 24 días cuando los ratones inmunes a B16 se volvían a inocular con células B16. La FIG. 14 también ilustra que ratones vírgenes a B16 no estaban protegidos contra la formación de tumores, al igual que los ratones inmunes a MC38 y los ratones vírgenes a MC38. MC38 es un carcinoma de colon conocido en la técnica. Esto demuestra la especificidad de inmunización causada por la inyección original de tumor B16 con células dendríticas que contienen IL-12 inducible por Rheoswitch adenoviral recombinante.

25 Las DC producidas por diferenciación de células CD14⁺ son de fenotipo inmaduro y no producen niveles detectables de IL-12 (Cella *et al.* 1999). La FIG. 15 indica que las DC murinas producidas por tratamiento de células de médula ósea con GM-CSF e IL-4 durante 7 días seguido de selección CD11c⁺ también mostraron ausencia de expresión detectable de IL-12 después de transducción con el vector adenoviral que alberga IL-12 bajo el control del RTS. El tratamiento de las células transducidas con dosis variables del fármaco activador (RG-115932) produjo IL-12 de un modo dependiente de dosis.

30 Se ha informado de que la transducción adenoviral induce algún grado de maduración en las DC por interacción pentona-integrina que conduce a la producción de TNF-alfa a través de la vía de activación NFkB. Se ha informado de que la acción autocrina de TNF-alfa es la señal de inducción de la maduración para DC en este caso (Philpott *et al.*, 2004). Se espera que la corta transducción adenoviral (2-3 horas) usada y la elección de la MOI para los niveles mínimos requeridos limiten este efecto de maduración prematura.

Ejemplo 4

45 En este ejemplo, se aislaron células dendríticas de médula ósea, se transdujeron con las construcciones adenovirales representadas en la FIG. 7, y a ratones que albergaban gliomas GL261 intracraneales singénicos se les inyectaron por vía intratumoral células dendríticas modificadas por ingeniería; y se inyectó por vía intra-peritoneal RG-115830. La FIG. 7 muestra los resultados de inyección intratumoral de glioma GL261 intracraneal de ratón con células dendríticas transducidas con polinucleótidos que codifican IL-12 y/o IFN-alfa bajo el control de RTS o que carecen de RTS. Los datos revelan que la expresión inducida por ligando de IFN-alfa e IL-12 a través de la activación del RTS con el ligando RG-115830 promovía supervivencia del 75 por ciento a los 50 días de ratones con glioma GL261; en comparación con la expresión de IFN-alfa en solitario. Además, el control proporcionado por el RheoSwitch y el ligando promovió supervivencia potenciada.

55 Ejemplo 5

Se evaluará la seguridad, tolerancia, función del transgén, y efectos inmunológicos de una o más inyecciones intratumorales de células dendríticas autólogas transducidas con adenovirus modificadas para expresar hIL-12 bajo el control del RTS en sujetos con melanoma en fase III y IV a través de procedimientos tales como los descritos a continuación.

60 Se realizará un estudio que implica sujetos de estudio con melanoma en fase III y IV en 4 cohortes (grupos) de sujetos recibiendo cada sujeto una única inyección intratumoral (en un tumor de melanoma) de células dendríticas (DC) autólogas transducidas con adenovirus (reinsertadas en el mismo sujeto del que proceden) modificadas para expresar interleuquina-12 humana (hIL-12) a una dosis de 5×10^7 en combinación con dosis orales diarias de fármaco activador (ligando activador). El estudio usará inyecciones de células dendríticas transducidas *ex vivo*

(después de retirar las células de los sujetos) con vector adenoviral para la expresión inducible de IL-12 humana. La producción de IL-12 se "activa" (induce) a partir de las DC inyectadas a través de la activación del RTS por la administración oral del fármaco activador (RG-115932). Se evaluarán la seguridad y la tolerancia a través de exámenes físicos (incluyendo estado de función ECOG), mediciones de signos vitales, química sérica, análisis de orina, hematología, acontecimientos adversos "efectos secundarios", y anticuerpos y respuesta inmune celular al adenovirus, componentes del RTS, y el fármaco activador. Para evaluar el progreso, se medirá la farmacocinética/ADME de una sola dosis y en estado estacionario del fármaco activador oral y sus metabolitos principales, el análisis de los niveles de hIL-12 y la respuesta inmune celular (células T) en biopsias de los tumores diana, ganglios linfáticos de drenaje, y circulación periférica, así como un perfil de citoquinas séricas.

Por ejemplo, se dividen 16 sujetos con melanoma en fase III y IV en cuatro cohortes conteniendo las cohortes 1 y 2 tres sujetos y conteniendo las cohortes 3 y 4 5 sujetos. Todos los sujetos recibirán una única inyección intratumoral de 5×10^7 DC autólogas transducidas con vector adenoviral que codifica IL-12 humana bajo el control del RTS. Los sujetos recibirán una única dosis oral diaria de fármaco activador (cohorte 1: 0,01 mg/kg, cohorte 2: 0,1 mg/kg, cohorte 3: 1,0 mg/kg o cohorte 4: 3 mg/kg) comenzando la primera aproximadamente 3 horas antes de la inyección de DC en el día 1 y continuando durante 13 días consecutivos más. Puede administrarse una o más inyecciones adicionales de células dendríticas autólogas transducidas con adenovirus en combinación con 14 dosis orales diarias individuales (una vez) de fármaco activador a sujetos elegibles que cumplan los criterios para el retratamiento. Se evalúan la seguridad, tolerancia, y función de las células dendríticas para todos los sujetos en cada grupo de la cohorte 1 durante hasta un mes después de la inyección de las células dendríticas modificadas por ingeniería *in vitro* antes de registrar a los sujetos para recibir la siguiente dosis más alta del fármaco activador. La evaluación de la seguridad continuará en todos los sujetos durante 3 meses después de la inyección inicial de las células dendríticas modificadas por ingeniería con la posibilidad de prolongar el periodo de seguimiento hasta un total de seis meses para controlar la seguridad en el sujeto si se observa toxicidad o el sujeto recibe una o más inyecciones adicionales de las células dendríticas.

Dicho estudio demuestra la seguridad y tolerancia de una o múltiples inyecciones intratumorales de células dendríticas autólogas transducidas con adenovirus en combinación con un fármaco activador oral en sujetos con melanoma. El estudio proporciona farmacocinética/ADME en estado estacionario del fármaco activador oral. El estudio demuestra la funcionalidad del RTS en sujetos midiendo la expresión de hIL-12 de células dendríticas autólogas transducidas con adenovirus en tumor diana y/o ganglios linfáticos de drenaje en respuesta a la activación del RTS por la administración oral del fármaco activador. Además, el estudio demuestra los efectos inmunológicos de las células dendríticas autólogas transducidas con adenovirus en términos de la respuesta inmune celular en el tumor diana, ganglios linfáticos de drenaje, y circulación periférica después de administración oral del fármaco activador.

Se selecciona melanoma como cáncer ejemplar (para su uso con el RTS) porque los pacientes en fase III y IV no tienen terapias viables disponibles, el melanoma en particular entre los tumores sólidos ha demostrado responder a enfoques de inmunoterapia, y los tumores de melanoma son fácilmente accesibles para inyección intratumoral y biopsia. Los sujetos incluidos en el estudio tienen melanoma no extirpable en fase III o IV, que tiene al menos 0,5 cm de diámetro, cualquier grosor del tumor, cualquier cantidad de ganglios linfáticos implicados, metástasis en tránsito, o metástasis distantes.

5.1. Preparación de adenovirus que alberga el sistema terapéutico RheoSwitch y hIL-12

Se transfiere el ADN recombinante a células dendríticas (DC) por transducción de vector adenoviral *ex vivo*. El ADN recombinante se usa para expresar IL-12 humana (p70) a partir de células dendríticas inmaduras inyectadas por vía intratumoral que confiere supervivencia y estimula la maduración de las DC en el entorno tumoral provocando su posterior migración a los ganglios linfáticos de drenaje. Esto conduce a una desviación hacia la diferenciación de células auxiliares T al tipo Th1 y también a la activación de células T citotóxicas específicas de tumor por cebado cruzado con los antígenos tumorales.

El ADN recombinante usado como vector adenoviral recombinante permite la expresión de IL-12 humana bajo el control del sistema terapéutico RheoSwitch® (RTS). El RTS comprende un mensaje bicistrónico expresado a partir del promotor de ubiquitina C humana y codifica dos proteínas de fusión: Gal4-EcR y VP16-RXR. Gal4-EcR es una fusión entre el dominio de unión a ADN (aminoácidos 1-147) de Gal4 de levadura y los dominios DEF del receptor de ecdisona del insecto *Choristoneura fumiferana*. En otra realización, el RTS consiste en un mensaje bicistrónico expresado a partir del promotor de ubiquitina C humana y codifica dos proteínas de fusión: Gal4-EcR y VP16-RXR. Gal4-EcR es una fusión entre el dominio de unión a ADN (aminoácidos 1-147) de Gal4 de levadura y los dominios DEF del receptor de ecdisona del insecto *Choristoneura fumiferana*. VP16-RXR es una fusión entre el dominio de activación de la transcripción de HSV-VP16 y los dominios EF de un RXR quimérico derivado de secuencias humanas y de langosta. Estas secuencias Gal4-EcR y VP16-RXR están separadas por un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) de EMCV. Estas dos proteínas de fusión dimerizan cuando Gal4-EcR se une a un fármaco de molécula pequeña (RG-115932) y activan la transcripción de hIL-12 a partir del promotor sensible a Gal4 que contiene seis sitios de unión a Gal4 y un promotor mínimo sintético. La unidad de transcripción del RTS descrita anteriormente se coloca cadena abajo de la unidad de transcripción de hIL-12. Este casete RTS-hIL12 completo se

incorpora en el genoma de adenovirus 5 en el sitio donde la región E1 se ha deletado. La estructura adenoviral también carece del gen E3. Se muestra un mapa para el vector adenoviral Ad-RTS-hIL-12 en la FIG. 8.

El vector adenoviral recombinante usado en este estudio contiene los siguientes elementos reguladores ejemplares además de las secuencias del vector viral: promotor de ubiquitina C humana, sitio interno de entrada al ribosoma derivado de EMCV, un promotor inducible que contiene 6 copias del sitio de unión a Gal4, 3 copias de los sitios de unión a SP-1, y una secuencia de promotor mínimo sintético, sitios de poliadenilación de SV40, y una secuencia de terminación de la transcripción derivada del gen de la alfa-globina humana. Debe entenderse que podrían utilizarse otros elementos reguladores como alternativas.

Un vector adenoviral recombinante ejemplar Ad-RTS-hIL-12 se ha producido del siguiente modo. Las secuencias codificantes para las proteínas de fusión de receptor, VP16-RXR y Gal4-EcR separadas por el EMCV-IRES (sitio interno de entrada al ribosoma), se insertan en el vector adenoviral lanzadera bajo el control del promotor de ubiquitina C humana (promotor constitutivo). Posteriormente, las secuencias codificantes para las subunidades p40 y p35 de hIL-12 separadas por IRES, colocadas bajo el control de un promotor inducible sintético que contiene 6 copias del sitio de unión a Gal4 se insertan cadena arriba del promotor de ubiquitina C y las secuencias del receptor. El vector lanzadera contiene las secuencias del adenovirus serotipo 5 desde el extremo izquierdo hasta la unidad de mapa 16 (mu16), del cual están deletadas las secuencias E1 y remplazadas por las secuencias de RTS e IL-12 (RTS-hIL-12). El vector lanzadera que porta el RTS-hIL-12 se ensaya por transfección transitoria en células HT-1080 para la expresión de IL-12 dependiente de fármaco activador. El vector lanzadera después se recombina con la estructura adenoviral por cotransfección en células HEK 293 para obtener adenovirus recombinante Ad-RTS-hIL-12. La estructura adenoviral contiene deletaciones de secuencia de mu 0 a 9,2 en el extremo izquierdo del genoma y el gen E3. El vector lanzadera y la estructura adenoviral contienen la secuencia solapante desde mu9,2 hasta mu16 que permite la recombinación entre ellos y la producción del vector adenoviral recombinante. Como el vector adenoviral recombinante es deficiente en las regiones E1 y E3, el virus es deficiente en la replicación en células normales de mamífero. Sin embargo, el virus puede replicarse en células HEK 293 que albergan la región E1 del adenovirus-5 y por tanto proporcionan la función E1 en trans.

Un vector adenoviral recombinante ejemplar se ha producido del siguiente modo: El vector lanzadera linealizado que porta los elementos de ADN para la expresión inducible de IL12 humana, y la estructura adenoviral se co-transfectan en células HEK293. La recombinación entre las secuencias solapantes en el vector lanzadera y la estructura viral provoca la producción de adenovirus recombinante y se compacta en partículas virales en las células HEK293. Las células HEK293 se cultivan en DMEM que contiene suero bovino fetal.

El virus usado para el estudio propuesto se purificó por centrifugación en gradiente de densidad de CsCl. El adenovirus recombinante experimenta dos rondas de purificación de placas y la reserva de siembra resultante se usa para producir un banco viral maestro (MVB) por amplificación en células HEK293 a partir de un banco de células maestras caracterizado completamente. El MVB experimenta ensayos extensivos de liberación de GMPc/GLP incluyendo adenovirus competente en replicación (RCA), esterilidad, micoplasma, virus adventicios, retrovirus, virus humanos VIH1/2, HTLV1/2, HAV, HBV, HCV, EBV, B19, CMV, HHV-6, 7 y 8, virus bovino y porcino, secuenciación de vector completo y ensayo funcional por expresión de IL12 inducida por AD en líneas celulares humanas.

El virus del MVB puede usarse para la producción del virus purificado en una instalación de GMPc y puede experimentar de nuevo ensayos de liberación incluyendo identidad, RCA, esterilidad, micoplasma, virus adventicios, proporciones de partícula viral-a-unidades infecciosas, contaminación de ADN de la célula hospedadora, endotoxina y proteínas y ensayo funcional por expresión de IL12 inducida por AD en líneas celulares humanas.

6.2. Transducción de células dendríticas autólogas por adenovirus que contiene transgén de hIL-12 y sistema terapéutico RheoSwitch® (RTS)

Se transducen *ex vivo* células dendríticas derivadas de sujetos humanos y se inyectan en el tumor. Las DC se caracterizarán antes de la transducción viral para la viabilidad, pureza (normalmente >80 % células muestran fenotipo DC), esterilidad, micoplasma y endotoxina. Después de la transducción viral, las células se lavan repetidamente para retirar cualquier virus no absorbido. Se ensayará el sobrenadante del último lavado para el contenido de virus residual por PCR. Como las DC se transducen *ex vivo* por vector adenoviral (virus no integrante) y la vida útil de las DC después de inyección intratumoral y la posterior migración a los ganglios linfáticos de drenaje es corta, no se espera que se incorpore ADN viral en muchas células no diana. Se espera que el protocolo usado para la transducción adenoviral de DC produzca un 80-90 % de transducción y se considera muy eficaz.

Recogida de PBMC por leucoféresis: Los sujetos experimentaron una leucoféresis convencional de 90 to 120 minutos en la Apheresis Unit of the UPCI Outpatient. El procedimiento leucoféresis implica la retirada de sangre de una vena de un brazo; el paso de la sangre a través de una centrífuga (separador celular), donde sus componentes se separan y se retiran uno o más componentes; y el retorno de los componentes restantes a la vena del sujeto en el mismo o el otro brazo. Se extrae no más del 15 % del volumen total de sangre del sujeto en momento cualquiera según se procesa la sangre a través del dispositivo separador celular. En el separador celular, la sangre se separa en plasma, plaquetas, glóbulos blancos y glóbulos rojos. Los glóbulos blancos (WBC) se retiran y todos los demás

componentes se devuelven a la circulación del sujeto. Se hace todo intento posible por usar dos líneas IV periféricas para este procedimiento. No ello no es posible, puede ser necesaria una línea central. El sujeto debe tener claro por parte del médico que va a experimentar leucoféresis, y se le explorará de forma rutinaria para los signos vitales (incluyendo presión sanguínea) antes del procedimiento.

Procesamiento: Después de la recogida, el paquete leucocitario se entregan en mano al CPL, y se procesa inmediatamente por elutriación centrífuga en ELUTRA™. Este es un sistema cerrado validado para uso clínico. La fracción de monocitos se recupera, y después de la recuperación y de establecer la viabilidad de las células, se transfieren a un cartucho Aastrom para cultivo de 6 días en presencia de IL-4 y GM-CSF. Todos los procedimientos de procesado y lavado se realizan en condiciones estériles.

Siembra inicial: Se cuentan los monocitos recuperados de un único paquete leucocitario en presencia de un colorante de azul tripano para determinar la cantidad de células viables. Los monocitos se evalúan para la pureza por citometría de flujo. Los monocitos se resuspenden a $5 \text{ a } 10 \times 10^6$ células/ml en medio sin suero y sin antibiótico CellGenix, que contiene 1.000 IU/ml de IL-4 y 1.000 IU/ml de GM-CSF por SOP-CPL-0166, y se colocan en un cartucho Aastrom. Se requiere un volumen de carga mínimo de 50 ml y una cantidad mínima de células para la inoculación de casete.

Cultivo: El cartucho Aastrom se coloca en la incubadora en el sistema Replicell, un dispositivo de cultivo completamente cerrado y automatizado compatible con GMPc para la generación de DC inmaduras.

Recogida de DC inmaduras: En el día 6, el cartucho Aastrom se retira de la incubadora y se recogen las DC inmaduras. Las células se recogen por centrifugación a 1.500 rpm, se lavan en medio CellGenix, se cuentan en presencia de un colorante de azul tripano y se comprueban para las características morfológicas y fenotípicas.

Viabilidad: Ésta se determina realizando recuentos celulares en hemocitómetro en presencia de azul de tripano. Generalmente, >95 % de las células recogidas son viables, es decir, excluyen el colorante de azul tripano. Si la viabilidad es menor del 70 % se descartarán las DC inmaduras.

Fenotipado: Las células generadas en cultivo se cuentan por observación microscópica en un hemocitómetro, y se obtiene un recuento diferencial preliminar (DC frente a linfocitos) usando un colorante de azul tripano. La confirmación del recuento diferencial se hace por citometría de flujo, sensibilizado para DC frente a linfocitos y usando propiedades de alta dispersión directa y lateral de las DC inmaduras como criterio para su identificación. Las DC inmaduras contienen rutinariamente >80 % de células con morfología de célula dendrítica y tienen fenotipo DC.

Ensayo de potencia de IL-12p70: Se ha establecido que las DC maduras (mDC) tienen la capacidad de producir IL-12p70 de forma espontánea o tras la activación con CD40L con o sin adición de señales inmunes innatas (por ejemplo, LPS). Se recientemente se estableció un ensayo de producción normalizada de IL-12p70 y es aplicable a muestras pequeñas o lotes grandes de vacunas DC generadas en una diversidad de condiciones. El actual ensayo de potencia consiste en dos etapas distintas, implicando la primera la co-incubación de DC respondedoras con células de linfoma J588 transfectadas de forma estable con el gen del ligando CD40 humano como estimulador. La segunda etapa implica ensayar los sobrenadantes de estos co-cultivos para los niveles de IL-12p70 secretada por las DC estimuladas con J558/CD40L +/- LPS en el sistema Luminex. Este ensayo de potencia tiene una CV inter-ensayo del 18,5 % (n=30) y un amplio rango dinámico, que facilita la evaluación de diversos productos DC caracterizados por niveles muy diferentes de producción de IL-12p70. El rango normal para el ensayo establecido usando productos DC generados a partir de monocitos de 13 donantes normales fue de 8-999 pg/ml, con una media de 270 pg/ml

Producción y criterios de liberación para células dendríticas

Cada lote de las células dendríticas generadas in vitro se ensaya para la presencia de contaminantes microbianos (bacterias aeróbicas y anaeróbicas, hongos y micoplasma), así como endotoxina y se caracterizan fenonormalmente y funcionalmente. Todas las células dendríticas a inyectar en sujetos serán frescas y no experimentarán crioconservación.

Ensayo de garantía de calidad de DC: Las DC generadas como se ha descrito anteriormente se evalúan para la esterilidad, viabilidad, pureza, potencia y estabilidad. Los criterios para la liberación del producto celular están establecidos y se siguen rigurosamente.

Viabilidad: Las células generadas en cultivo se cuentan por observación microscópica en un hemocitómetro, y se obtiene un recuento diferencial (DC frente a linfocitos) usando un colorante de azul tripano. Este recuento proporciona el porcentaje de células viables en el cultivo ensayado. Se requiere más del 70 % de viabilidad celular por exclusión de azul de tripano y un mínimo del 70 % de células que expresan HLA-DR y CD86 como marcadores DC derivadas de monocitos para pasar los criterios de liberación. Pueden incluirse marcadores adicionales para análisis de exploración tales como CD83 y CCR7 para evaluar el estado de maduración de DC, y CD3 y CD19 para evaluar la contaminación con linfocitos.

Pureza: Se usa análisis de citometría de flujo de dos colores de células teñidas con mAb conjugados con FITC y PEc para determinar que la población DC identificada morfológicamente expresa los antígenos de superficie definidos para DC y carece de antígenos de monocitos y linaje de células T y B. Para la preparación de vacunas, las DC generadas deben expresar HLA-DR y CD86 y no deben expresar CD3, CD19, o CD14. Para considerarse mDC, las células deben expresar CD83+ y CCR7+.

Potencia: Para definir una medida de potencia para las DC, se determinó su capacidad de producir IL-12p70 como se ha descrito anteriormente.

Esterilidad: Las DC se ensayan por cultivo bacteriano (aeróbico y anaeróbico) y fúngico usando el sistema BD Bactec (Becton Dickinson Co., Sparks, MD) del University of Pittsburgh Medical Center Microbiology Laboratory. Los resultados finales de los cultivos microbianos están disponibles en 14 días. Antes de la liberación de las DC para uso de vacuna, se realiza una tinción gram y debe ser negativa para la presencia de microorganismos.

El IMCPL ensaya micoplasma mediante el uso del Gen-Probe Mycoplasma Tissue Culture Rapid Detection System (Gen-Probe, Inc. San Diego, CA), que se basa en tecnología de hibridación de ácido nucleico. El ensayo de endotoxina se realiza usando el ensayo Limulus Amoebocyte Lysate Pirogen Plus (Bio Whittaker, Inc., Walkerville, MD). El ensayo de endotoxina se realiza sobre el cultivo celular en el momento de la recogida y antes de la liberación del producto final. El nivel aceptable de endotoxina es <5 EU/kg de peso corporal. Las células dendríticas no transducidas y transducidas se crioconservarán para análisis futuro.

Se espera que las células transducidas expresen el transgén. Se espera que más del 80 % de las DC estén transducidas. El producto será biológicamente activo ya que se mantiene la secuencia codificante nativa en el transgén. Las DC transducidas con virus inyectadas en el tumor son de fenotipo DC inmaduro y no expresan IL-12 hasta que experimentan maduración, y por tanto en esta fase, la expresión de IL-12 es principalmente procedente del transgén. Como la expresión del transgén de IL-12 se induce mediante el fármaco activador de molécula pequeña RG-115932 de un modo dependiente de dosis, no se puede controlar el nivel de expresión transgénica en las DC transducidas a los niveles deseados. Una pequeña porción de las DC transducidas preparadas para administración a los sujetos humanos puede ensayarse *in vitro* para la inducción de la expresión de IL12 dependiente de fármaco activador. La expresión de IL-12 puede ensayarse por ELISA con una sensibilidad de 4 ng/ml.

El modelo de tumor de ratón *in vivo* es similar a los estudios humanos porque los ratones que albergan tumor de melanoma (B16) subcutáneo se trataron del mismo modo que el estudio en seres humanos propuesto mediante la inyección de DC transducidas con adenovirus e inducción del transgén de IL12 murina. Después de observar regresión tumoral, la re-exposición con las mismas células tumores no provocó crecimiento tumoral, lo que indica inmunidad tumoral sistémica.

Se espera que la inducción *in vitro* de IL-12 a partir de células transducidas por el vector usado en el estudio propuesto produzca aproximadamente 500 ng de IL-12 por 10^6 células en 24 horas, determinado por ELISA. En estudios preclínicos usando modelo de ratón de melanoma, la inyección intratumoral de 10^6 o más DC transducidas mostró eficacia. Sin embargo, se espera que la inyección intratumoral requerida pueda mostrar eficacia a niveles por debajo de este cantidad y por lo tanto pueden utilizarse inyecciones de 5×10^7 DC transducidas como punto de partida para determinar si se requieren cantidades menores o mayores.

Por ejemplo, *in vitro*, las líneas celulares humana y de ratón y las células dendríticas primarias transducidas con vector adenoviral recombinante que porta los genes para IL12 muestran inducción de expresión de IL12 en respuesta al fármaco activador de un modo dependiente de dosis.

La transducción adenoviral de DC humanas a diferentes MOI y para diferente duración de adsorción viral mostró transducción eficaz de estas células por absorción viral de 3 horas a MOI de 500. El fármaco activador indujo la expresión de IL-12 en estas DC humanas transducidas (FIG. 9).

Para experimentos *in vivo* en un modelo de melanoma de ratón descrito anteriormente, se dio a ratones C57/BL6 inyecciones subcutáneas de células B16 para formar tumores. La inyección intratumoral de DC transducidas con vector adenoviral que porta los genes murino de IL-12 bajo el control del RTS, junto con la administración del fármaco activador provocó inmunidad sistémica específica para el tumor. El tratamiento provocó regresión tumoral. La re-exposición de los ratones curados después de 50 días con células B16 mostró que las células B16 no formaban tumores. Esta inducción de inmunidad a tumor fue dependiente de la administración del fármaco activador, y por tanto, la expresión de IL-12, en las DC transducidas inyectadas. El fármaco activador fue eficaz en las vías intraperitoneal y oral. Véanse las FIG. 11 y FIG. 14.

6.3. Formulación de fármaco activador

El fármaco activador usado en este documento se formula en una cualquiera de las siguientes formulaciones:

(1) 100 % Labrasol;

(2) Labrasol aromatizado Listerine (Latitude Pharmaceuticals Inc., EEUU) que comprende (a) mentol, (b) timol, (c) eucaliptol, (d) aspartamo, (e) sacarina sódica, (f) ácido cítrico, (g) aroma de menta, (h) aroma de crema, (i) labrasol;

5 (3) Miglyol 812 y phospholipon 90G (Latitude Pharmaceuticals Inc., EEUU); o

(4) Miglyol 812, phospholipon 90G y succinato de vitamina E tocoferil polietilenglicol (Latitude Pharmaceuticals Inc., EEUU).

6.4. Suministro

10 Aunque puede imaginarse una diversidad de concentraciones y protocolos específicos, un ejemplo para tratar pacientes incluiría pacientes que reciben una o más inyecciones intratumorales de células dendríticas autólogas transducidas (AdDC) a una concentración de 5×10^7 suspendidas en solución salina estéril modificadas para expresar hIL-12 (interleuquina 12 humana) bajo el control del RTS en combinación con el fármaco activador oral (RG-115932).

6.4.1. Tratamiento inicial

20 Día 1 visita intrahospitalaria: En el día 1, se realiza la exploración física inicial (incluyendo signos vitales, peso, y estado ECOG). Se recoge orina y se extrae sangre para la química sérica, análisis de orina, y hematología iniciales (perfil de seguridad). Aproximadamente 3 horas antes de la inyección intratumoral de las células dendríticas modificadas por ingeniería *in vitro*, a cada paciente se le dosifica un fármaco activador (cohorte 1 - 0,01 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1,0 mg/kg, y 3 mg/kg) inmediatamente después de una comida. Se extrae sangre a intervalos de tiempo específicos (predosis, 0,5, 1, 1,5, 2, 4, 6, 8, 12, 16, y 24 horas después de la dosis de AD) en el día 1 para la evaluación de la farmacocinética de dosis individual del fármaco activador y sus metabolitos principales. Cada sujeto recibe una única inyección intratumoral de células dendríticas autólogas transducidas con adenovirus a una concentración de 5×10^7 células, modificadas para expresar hIL-12 bajo el control del RTS. Los sujetos se controlan cuidadosamente para reacciones locales en el sitio de inyección y/o reacciones de hipersensibilidad. Día 2 a 14 visita intrahospitalaria: En los días 2 a 14, se dosifica a cada sujeto el fármaco activador inmediatamente después de una comida. Se recogen diariamente los signos vitales y acontecimientos adversos en los días 2 a 14. En el día 4 \pm 24 horas, se retiran biopsias del tumor y/o ganglios linfáticos de drenaje de aproximadamente el 50 % de los sujetos para la medición de hIL-12 y la respuesta inmune celular. En el día 8, se mide el peso. En el día 8 \pm 24 horas, se retiran biopsias del tumor y/o ganglios linfáticos de drenaje de sujetos a los que no se realizó biopsia en el día 4 para la medición de hIL-12 y la respuesta inmune celular. Se extrae sangre en el día 4 \pm 24 horas y el día 8 \pm 24 horas para el ensayo de anticuerpos potenciales y respuesta inmune celular contra el adenovirus y/o los componentes del RTS. También se obtiene un perfil de citoquinas séricas para determinar si la expresión de otras citoquinas está afectada por el tratamiento con el transgén de hIL-12. En el día 8, se recoge orina y se extrae sangre para química sérica, análisis de orina, y hematología basales (perfil de seguridad). En el día 8, se extrae sangre a intervalos de tiempo específicos (predosis, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, y 24 horas después de la dosis de AD) para la evaluación de la farmacocinética/ADME en estado estacionario del fármaco activador y sus metabolitos principales.

45 Día 14 visita intrahospitalaria: En el día 14, se dosifica a cada sujeto el fármaco activador inmediatamente después de una comida. Cada sujeto recibe una exploración física (incluyendo signos vitales, altura, peso y estado ECOG). Se recoge orina y se extrae sangre para química sérica, análisis de orina, y hematología (perfil de seguridad). Se extrae sangre en el día 14 \pm 24 horas para el ensayo de anticuerpos potenciales y la respuesta inmune celular contra el adenovirus y/o los componentes del RTS. También se obtiene un perfil de citoquinas séricas para determinar si la expresión de otras citoquinas está afectada.

50 Se recoge sangre de los sujetos en visitas específicas intrahospitalarias y externas para medir anticuerpos potenciales y la respuesta inmune celular contra el adenovirus y los componentes del RTS. Se obtiene sangre para un perfil basal de citoquinas séricas. Se usa el ensayo de tipo bloqueo de infectividad de AdVeGFP para detectar una respuesta de anticuerpo contra el vector adenoviral (Gambotto, Robins *et al.* 2004). La respuesta de anticuerpos contra los componentes del RTS se evaluará por transferencia de western y/o ELISA usando suero del paciente y las proteínas RTS producidas a partir de un vector de expresión. Además, se hará ensayo combinado de citoquinas en el suero por Luminex para IL-12, IFN-gamma, IP-10, y otras citoquinas Th1/Th2 tales como IL-2, TNF-alfa, IL-4, IL-5, e IL-10. Estos ensayos de anticuerpos y citoquinas necesitarán aproximadamente 10 ml de sangre.

60 Los ensayos de respuesta inmune celular usan aproximadamente 50-60 ml de sangre y se separan los subconjuntos de células T CD4 y CD8 de la misma. Las células T separadas se mezclan con DC autólogas transducidas con vector AdV vacío, vector AdV-RTS, o AdV-RTS-hIL12 en un ensayo ELISPOT para la producción de INF-gamma por parte de las células T activadas por los antígenos derivados de AdV y RTS, si los hay. Se realizan ensayos similares usando las células tumorales tal cual y/o DC que expresan antígenos de melanoma compartidos para evaluar la respuesta prematura al tumor. También se realizan ensayos adicionales según lo necesario.

65 En el día 14 \pm 24 horas, se retiran biopsias del tumor y/o ganglios linfáticos de drenaje de todos los sujetos que tengan tejido disponible para la medición de hIL-12 y la respuesta inmune celular. Se registran los acontecimientos

adversos. Después de completarse los procedimientos del día 14, se da el alta a cada sujeto de la clínica hospitalaria y se le pide que vuelva en aproximadamente 3 semanas para la visita externa de seguimiento de 1 mes.

5 Visita de terminación prematura: Si un sujeto no puede completar la fase de tratamiento intrahospitalario, se realizarán los siguientes procedimientos de la visita de terminación prematura antes de dar el alta de la clínica. Cada sujeto recibe una exploración física (incluyendo signos vitales, altura, peso y estado ECOG). Se recoge orina y se extrae sangre para química sérica, análisis de orina, y hematología (perfil de seguridad). Se extraerá sangre para el ensayo de anticuerpos potenciales y la respuesta inmune celular contra el adenovirus y/o los componentes del RTS como se ha descrito anteriormente. También se obtendrá un perfil de citoquinas séricas como se ha descrito anteriormente para determinar si la expresión de otras citoquinas está afectada. Se retiran biopsias del tumor y/o ganglios linfáticos de drenaje de todos los sujetos que tengan tejido disponible para la medición de hIL-12 y la respuesta inmune celular. Se registran los acontecimientos adversos. Después de completarse los procedimientos de la visita de terminación prematura, se da el alta a cada sujeto de la clínica hospitalaria y se le pide que vuelva en aproximadamente 3 semanas para la visita externa de seguimiento de 1 mes.

15 Mes 1 a 4 Visitas de seguimiento: Se recogerán los acontecimientos adversos durante el periodo de seguimiento del mes 1 a 4. En las visitas del mes 1, 2, y 3, se realizarán exploraciones físicas de seguimiento (incluyendo signos vitales, peso y estado ECOG). Se recogerán orina y sangre en las visitas del mes 1, 2, y 3 para química sérica, análisis de orina, y hematología (perfil de seguridad). Se recogerá sangre en la visita del mes 1 y 3 para el ensayo de anticuerpos potenciales y la respuesta inmune celular contra el adenovirus y/o los componentes del RTS. Se obtendrá sangre en la visita del mes 1 para el perfilado de citoquinas séricas. En la visita del mes 1, se realizarán biopsias del tumor y/o ganglios linfáticos de drenaje en sujetos con tejido disponible, para la medición de hIL-12 y la respuesta inmune celular. Se realizarán escáneres CT/PET en las visitas del mes 2 y 4 para evaluar la progresión o regresión global de la enfermedad.

25 Mes 5 a 6 Visitas de seguimiento: Si se observa citotoxicidad relacionada con el fármaco en el mes 3 o mes 4, se realizarán visitas de seguimiento del mes 5 a mes 6. Se recogerán los acontecimientos adversos durante el periodo de seguimiento del mes 5 al mes 6. Se controlará la seguridad del sujeto mediante llamada telefónica por parte del personal de la clínica a cada sujeto durante el mes 5 y a través de una visita externa en el mes 6. Si sucede citotoxicidad relacionada con el fármaco o continúa a través del mes 5 y el investigador la considera seria, no estabilizada, o necesita evaluación adicional; el personal de la clínica no solamente telefonará al sujeto sino que pedirá al sujeto que visite la clínica. En la visita de seguimiento del mes 6 se realizarán exploraciones físicas (incluyendo signos vitales, peso y estado ECOG). Se recogerán orina y sangre para química sérica, análisis de orina, y hematología (perfil de seguridad). También se recogerá sangre en la visita del mes 6 para el ensayo de anticuerpos potenciales y la respuesta inmune celular contra el adenovirus y/o los componentes del RTS. Se realizarán escáneres CT/PET en la visita del mes 6 para evaluar la progresión o regresión global de la enfermedad.

40 Criterios de dosificación e interrupción de fármaco activador: Si se determina una toxicidad limitante de dosis (DLT; es decir, un total de > 2 de 3 sujetos incluidos en un grupo en la cohorte 1 experimentan toxicidad de grado > 3 de acuerdo con CTCAE v3.0), a un nivel de dosis dado al siguiente grupo de 3 sujetos se le administrará el mismo nivel de dosis de fármaco activador. Si se observa DLT en 1 o más sujetos en el grupo de dosis adicional, se interrumpirá el aumento de dosis y la siguiente dosis más baja se considerará la dosis máxima tolerada (MTD), de lo contrario se reinicia el aumento de dosis hasta que se alcanza la MTD o hasta una dosis máxima de 10 mg/kg (lo que suceda primero).

45 Se evaluará la seguridad, tolerancia, y función del transgén para todos los sujetos en cada grupo de la cohorte 1 hasta un mes después de la inyección de AdDC antes de aceptar a los sujetos para recibir la siguiente dosis más alta de fármaco activador.

50 Si un sujeto experimenta toxicidad de grado > 3 de acuerdo con CTCAE v3.0 que se considera posiblemente, probablemente o definitivamente relacionada con el tratamiento del fármaco del estudio, se interrumpirá la dosificación con el fármaco activador para ese sujetos y el sujeto experimentará los procedimientos de la visita de terminación prematura.

55 Criterios de interrupción del estudio: Si > 70 % de los sujetos en una cohorte experimenta toxicidad de grado > 3 de acuerdo con CTCAE v3.0 que se considera probablemente o definitivamente relacionada con el tratamiento con fármaco del estudio, se interrumpirá la dosificación con el fármaco activador para todos los sujetos y todos los sujetos experimentarán los procedimientos de la visita de terminación prematura.

60 Medicación de ensayo de investigación: Se evaluará una combinación de dos medicamentos en investigación para la seguridad, tolerancia, función del transgén, y efectos inmunológicos en este ensayo. El fármaco activador de molécula pequeña se administrará como una solución oral a dosis de 0,01 mg/kg, 0,1 mg/kg, 1,0 mg/kg y 10,0 mg/kg a sujetos con melanoma en Fase III o IV una vez al día durante catorce días consecutivos en combinación con una única inyección intratumoral de células dendríticas autólogas transducidas con adenovirus a una concentración de 5×10^7 , modificadas para expresar hIL-12. Existe la opción de que los sujetos reciban una inyección intratumoral de AdDC adicional en combinación con tratamiento durante 14 días consecutivos con el fármaco activador.

6.5. Evaluación de la seguridad para la evaluación de la función del transgén y efectos inmunológicos

Se realiza el ensayo de endotoxina sobre el cultivo celular en el momento de la recogida y antes de la liberación del producto final. El nivel aceptable de endotoxina es <5 EU/kg de peso corporal. Las células dendríticas no transducidas y transducidas se crioconservarán para análisis futuro.

Evaluación de la seguridad: Se evaluará la seguridad de una única inyección intratumoral de células dendríticas autólogas transducidas con adenovirus en combinación con el fármaco activador oral mediante exploraciones físicas, signos vitales, química sérica, análisis de orina, hematología, acontecimientos adversos, y anticuerpos y respuesta inmune celular contra adenovirus y componentes del RTS durante el ensayo y el seguimiento de 12 meses. Se harán pruebas de embarazo en las mujeres en edad fértil en el momento de la selección. También se obtendrá una lista de medicaciones concurrentes de los sujetos en la selección y el día 0 del periodo de retratamiento para determinar si existe alguna relación entre las medicaciones concurrentes y los potenciales acontecimientos adversos. Se recogerá un total aproximado de 89 cucharas de té (439 ml) de sangre más leucoféresis de los sujetos durante la fase de selección y fase inicial de tratamiento intrahospitalario (periodo de 26 días). Se recogerán un total aproximado de 75 cucharas de té (370 ml) de sangre más leucoféresis de los sujetos durante la fase de retratamiento intrahospitalario (periodo de 26 días, 5-6 semanas después de las visitas intrahospitalarias previas). Se recogerá un total aproximado de 46 cucharas de té (227 ml) de sangre de los sujetos durante la fase de seguimiento externo (Mes 1-6).

Exploraciones físicas: Se realizarán exploraciones físicas completas (incluyendo estado de función ECOG) en visitas específicas intrahospitalarias y externas. También se registrará el historial médico y la demográfica de cada sujeto en la visita de selección.

Signos vitales: Los signos vitales de cada sujeto se incluirán en cada exploración física programada pero también se tomarán en todas las visitas intrahospitalarias y externas. Los signos vitales incluyen presión sanguínea, pulso, temperatura, y respiraciones. También se registrará el peso y la altura en visitas específicas. Los signos vitales (menos altura y peso) se registrarán cada hora durante las dos primeras horas y después cada 8 horas después de que haya sucedido la dosificación del fármaco activador.

Química sanguínea: Se extraerá una muestra aleatoria no en ayunas de sangre de cada sujeto en visitas específicas intrahospitalarias y externas y se recogerá el suero para la química. Se realizarán los siguientes ensayos séricos: AST (aspartato transaminasa), ALT (alanina transaminasa), GGT (gammaglutamil transpeptidasa), LDH (láctico deshidrogenasa), LAP (leucina aminopeptidasa), fosfatasa alcalina, creatinina, bilirrubina total, proteína total, albúmina, nitrógeno de urea en sangre, colesterol total, glucosa, y electrolitos.

Análisis de orina: Se recogerá una muestra aleatoria de orina correspondiente a la parte intermedia del flujo de cada sujeto en visitas específicas intrahospitalarias y externas y se analiza. Se realizarán los siguientes ensayos: descripción de color y aspecto, gravedad específica, pH, glucosa, cuerpos cetónicos, proteína, cantidad de glóbulos rojos y blancos, y piroluria.

Hematología: Se extraerá una muestra aleatoria no en ayunas de sangre de cada sujeto en visitas específicas intrahospitalarias y externas y se ejecutarán los siguientes ensayos hematológicos: recuento completo de sangre (CBC) incluyendo recuento de glóbulos blancos, recuento diferencial de glóbulos blancos, recuento de glóbulos rojos, hematocrito, hemoglobina, índices de glóbulos rojos, y recuento de plaquetas. También se evaluará el PTT (tiempo de tromboplastina parcial) y el PT (tiempo de protrombina).

Acontecimientos adversos: Se utilizarán los criterios terminológicos comunes del NCI para acontecimientos adversos (CTCAE versión 3.0) para evaluar la toxicidad en el ensayo y el periodo de seguimiento de 3-6 meses. Un acontecimiento/experiencia adversa es cualquier reacción, efecto secundario, u otro acontecimiento adverso (signos, síntomas, cambios en datos de laboratorio) asociados con el uso de un artículo de ensayo (fármaco, agente biológico, o dispositivo), se considere relacionado o no el acontecimiento con el artículo de ensayo. Un acontecimiento/experiencia adversa seria es cualquier acontecimiento adverso o experiencia que provoca cualquiera de los siguientes resultados: muerte, experiencia adversas potencialmente mortal, una anomalía congénita/defecto de nacimiento, hospitalización o prolongación de hospitalización existente, o una discapacidad/incapacidad persistente o significativa. Los acontecimientos/experiencias médicas importantes que no provocan muerte, no son potencialmente mortales, o requieren hospitalización pueden considerarse experiencias adversas serias cuando, basándose en el juicio médico apropiado, pueden comprometer al sujeto o puede requerir intervención médica o quirúrgica para evitar uno de los resultados enumerados en esta definición.

La severidad de los acontecimientos adversos se clasificará del siguiente modo: Grado 1 (leve), Grado 2 (moderado), Grado 3 (severo), Grado 4 (potencialmente mortal o discapacitante), Grado 5 (muerte relacionada con acontecimiento adverso). La relación entre un acontecimiento adverso y la medicación del estudio se determinará basándose en el juicio clínico y las siguientes definiciones:

a. definitivamente relacionado es un acontecimiento adverso que sigue una secuencia temporal razonable desde la administración de la medicación del estudio, sigue un patrón de respuesta conocido a la medicación del estudio, y, cuando sea apropiado para el protocolo, se confirma por mejora después de interrumpir la medicación del estudio (retirada positiva) y por reaparición de la reacción después de exposición repetida (re-exposición positiva) y no puede explicarse razonablemente mediante características conocidas del estado clínico del paciente o por otras terapias,

b. probablemente relacionado es un acontecimiento adverso que sigue una secuencia temporal desde la administración de la medicación del estudio, sigue un patrón de respuesta conocido a la medicación del estudio y, cuando sea apropiado para el protocolo, se confirma por mejora después de retirada, y no puede explicarse razonablemente mediante características conocidas del estado clínico del sujeto o por otras terapias,

c. posiblemente relacionado es un acontecimiento adverso que sigue una secuencia temporal razonable desde la administración de la medicación del estudio y sigue un patrón de respuesta conocido a la medicación del estudio pero que podía haberse producido por el estado clínico del sujeto o por otras terapias,

d. no relacionado es un acontecimiento adverso para el cual existe suficiente información que indica que la etiología no está relacionada con la medicación del estudio. Se aplican dos o más de las siguientes variables a un acontecimiento adverso no relacionado: 1. El acontecimiento adverso no sigue una secuencia temporal razonable después de la administración de la medicación del estudio, 2. El acontecimiento adverso se explica fácilmente por el estado clínico del sujeto u otras terapias, 3. El acontecimiento adverso no disminuye después de reducción de la dosis o cese de la terapia (asumiendo que es razonable esperar disminución del acontecimiento adverso en el intervalo observado).

Se registrarán todos los acontecimientos adversos observados o informados después de la inclusión de los sujetos. Se registrará cualquier afección que esté presente en el momento de la inclusión que empeore como un acontecimiento adverso. Los acontecimientos adversos se determinarán basándose en síntomas ofrecidos y la observación clínica y evaluación en las visitas del ensayo. En cada visita intrahospitalaria y externa, se pedirá a los sujetos incluidos que ofrezcan información sobre acontecimientos adversos con preguntas no principales tales como "¿Cómo se está sintiendo?". Se registrarán cambios en valores de laboratorio como acontecimientos adversos si se consideran clínica significativos y si se requieren cambios clínicos o acción tales como inicio de un tratamiento.

Anticuerpos potenciales y respuesta inmune celular contra adenovirus y/o componentes del RTS: Se recogerá sangre de los sujetos en visitas específicas intrahospitalarias y externas para evaluar los anticuerpos potenciales y la respuesta inmune celular contra el adenovirus y los componentes del RTS y antígenos tumorales. Se usará el ensayo de tipo bloqueo de infectividad de AdVeGFP para detectar una respuesta de anticuerpos contra el vector adenoviral (Nwanegbo, *et al.* 2004). La respuesta de anticuerpos contra los componentes del RTS se evaluará por transferencia de western y/o ELISA usando suero de los sujetos y las proteínas RTS producidas por un vector de expresión. Además, se hará ensayo combinado de citoquinas en el suero por Luminex para IL-12, IFN-gamma, IP-10, y otras citoquinas Th1/Th2 tales como IL-2, TNFa, IL-4, IL-5 e IL-10. Estos ensayos de anticuerpos y citoquinas necesitarán aproximadamente 10 ml de sangre.

Los ensayos de respuesta inmune celular usan aproximadamente 50-60 ml de sangre y se separarán los subconjuntos de células T CD4 y CD8 de la misma. Las células T separadas se mezclarán con DC autólogas transducidas con vector AdV vacío, vectores AdV-RTS, o AdV-RTS-hIL12 en un ensayo ELISPOT para la producción de IFN-gamma por las células T activadas por los antígenos derivados de AdV y RTS, si los hay. Se realizarán ensayos similares usando las células tumorales tal cual y/o DC que expresan antígenos de melanoma compartidos para evaluar la respuesta inmune prematura contra el tumor. También pueden realizarse ensayos adicionales según lo necesario.

Prueba de embarazo: A las mujeres en edad fértil se les hará una prueba de embarazo en orina en el visita de selección y antes de la primera visita intrahospitalaria de la fase de retratamiento. La prueba se realiza a las 72, 48, 24, ó 12 horas antes de la administración de fármaco activador durante el tratamiento inicial y también todos los periodos de retratamiento. Si la prueba de embarazo en orina de positivo, entonces se obtendrá confirmación con una prueba de embarazo en suero. Si se confirma el embarazo, no se permitirá que el sujeto entre en el ensayo o continúe en la fase de retratamiento. La prueba de embarazo puede volver a realizarse tantas veces como sea necesario.

Consulta de medicación concomitante: En la selección, y antes de la primera visita intrahospitalaria de la fase de retratamiento, se pedirá a cada paciente que proporcione una lista de las medicaciones concurrentes para determinar cualquier posible relación con acontecimientos adversos que aparezcan durante el ensayo o la fase de seguimiento.

Criterios de retratamiento: Si un sujeto ha tolerado la inoculación previa de AdDC sin reacciones adversas que sean limitantes, y no ha mostrado progresión de la enfermedad o disminución sintomática en el momento del retratamiento potencial, se le considerará para retratamiento. Si, en opinión del investigador principal, y el médico de tratamiento existe un potencial beneficio clínico de una o más inyecciones intratumorales adicionales de AdDC en combinación con fármaco activador (dosis tolerada máxima de la cohorte 1) durante 14 días consecutivos, se ofrecerá retratamiento al sujeto, con la condición de que se cumplan los siguientes criterios:

1. No hay toxicidades limitantes,
2. La enfermedad del sujeto está estable o muestra signos clínicos o subjetivos de mejora, y
3. No hay evidencias de respuesta inmune de anticuerpos o celular contra los componentes adenovirales del sistema terapéutico RheoSwitch®.

5

Evaluación de la función del transgén y efectos inmunológicos: Se recogerán biopsias con punzón o por escisión del tumor y ganglios linfáticos de drenaje asociados durante la selección (día -12 a día -7), el día 4, día 8 y día 14 del ensayo y en el mes 1 del seguimiento (véanse las Tablas 3-5) para la evaluación *in vivo* de la expresión transgénica de hIL-12 y la respuesta inmune celular. Se recogerán biopsias por aspiración con aguja fina del tumor y ganglios linfáticos de drenaje asociados en el día -12 a -7 y el día 14 del periodo de retratamiento para la evaluación *in vivo* de la expresión transgénica de hIL-12 y la respuesta inmune celular. Las biopsias se evaluarán por microscopía óptica convencional e inmunohistoquímica para evaluar la infiltración celular de células T en el tumor y ganglios linfáticos de drenaje. Las secciones de biopsia se leerán por un patólogo que desconozca los antecedentes del sujeto del estudio. Para distinguir entre expresión endógena e inducida de IL-12 por las DC en el tumor y ganglios linfáticos de drenaje, se usará RT-PCR sobre ARN con cenadores diseñados apropiadamente. Se extraerá sangre para un perfil de citoquinas séricas en la selección, el día 4, día 8 y día 14 del ensayo, en el mes 1 del seguimiento y en el día -12 a -7, día 8 y día 14 del periodo de retratamiento (véanse las Tablas 3-5). Se obtendrá un perfil de citoquinas séricas para determinar si la expresión de otras citoquinas está afectada por el tratamiento con el transgén de hIL-12. Se hará ensayo combinado de citoquinas en el suero por Luminex para IL-12, IFN-gamma, IP-10, y otras citoquinas Th1/Th2 tales como IL-2, TNF α , IL-4, IL-5 e IL-10. Estos ensayos de anticuerpos y citoquinas necesitarán aproximadamente 10 ml de sangre.

25

Farmacocinética de dosis individual y en estado estacionario del fármaco activador: Se extraerá sangre a intervalos de tiempo específicos (predosis, 0,5, 1, 1,5, 2, 4, 6, 8, 12, 16, y 24 horas después de la dosis de la mañana) en el día 1 del ensayo para la evaluación de la farmacocinética de dosis individual y en el día 8 del ensayo para la medición de la farmacocinética/ADME en estado estacionario del fármaco activador y sus metabolitos principales. Se evaluará el plasma por HPLC para obtener los siguientes criterios de valoración farmacocinéticos en estado estacionario del fármaco activador y metabolitos principales: C_{max} (concentración máxima observada en plasma), T_{max} (tiempo hasta la concentración máxima observada en plasma), C_{trough} (concentración mínima observada en plasma computada como el promedio de las concentraciones a las 0 y 24 horas), C_{24h} (concentración en plasma a las 24 horas), AUC_{24h} (área bajo la curva de concentración de plasma-tiempo desde tiempo 0 hasta 24 horas), Ke (tasas aparente de eliminación), y T_{1/2} (semi-vida aparente).

35

Debe apreciarse que las anteriores realizaciones y ejemplificaciones descritas no pretenden ser limitantes en ningún aspecto del alcance de la invención, y que las reivindicaciones presentadas en este documento pretenden abarcar todas las realizaciones y ejemplificaciones estén presentadas explícitamente o no en este documento.

Bibliografía

- 40 Abdi K., et al. (2006). T-cell control of IL-12p75 production. *Scand J Immunol* 64: 83-92.
 Adorini, L. (1999). Interleukin-12, a key cytokine in Th1-mediated autoimmune diseases. *Cell Mol Life Sci* 55: 1610-25.
 Adorini, L., (2001). Interleukin 12 and autoimmune diabetes. *Nat Genet* 27: 131-2.
 Adorini, L., et al. (2002). Understanding autoimmune diabetes: insights from mouse models. *Trends Mol Med* 8: 31-8.
 45 Adorini, L., et al. (1996). The role of IL-12 in the pathogenesis of Th1 cell-mediated autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci* 795: 208-15.
 Akhtar, N., et al. (2004). Interleukin-12 inhibits tumor growth in a novel angiogenesis canine hemangiosarcoma xenograft model. *Neoplasia* 6: 106-16.
 50 Akiyama, Y., et al. (2000). Enhancement of antitumor immunity against B16 melanoma tumor using genetically modified dendritic cells to produce cytokines. *Gene Ther* 7: 2113-21.
 Al-Mohanna, F., et al. (2002). IL-12-dependent nuclear factor-kappaB activation leads to de novo synthesis and release of IL-8 and TNF-alpha in human neutrophils. *J Leukoc Biol* 72: 995-1002.
 Aliberti, J.C., et al. (1996). Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect Immun* 64: 1961-7.
 55 Allavena, P., et al. (1994). Interleukin-12 is chemotactic for natural killer cells and stimulates their interaction with vascular endothelium. *Blood* 84: 2261-8.
 Alli, R.S. y Khar, A. (2004). Interleukin-12 secreted by mature dendritic cells mediates activation of NK cell function. *FEBS Lett* 559: 71-6.
 60 Alzona, M., et al. (1996). Interleukin-12 activates interferon-gamma production by targeted activation of CD30+ T cells. *Ann N Y Acad Sci* 795: 127-36.
 Amemiya, K., et al. (2006). Interleukin-12 induces a Th1-like response to *Burkholderia mallei* and limited protection in BALB/c mice. *Vaccine* 24: 1413-20.
 Anderson, R.D., et al. (2000). Ad-RTS-hIL-1. A simple method for the rapid generation of recombinant adenovirus vectors. *Gene Therapy*, 4,1034-1038.
 65 Araujo, M.I., et al. (2001). Interleukin-12 promotes pathologic liver changes and death in mice coinfecting with

- Schistosoma mansoni and Toxoplasma gondii. *Infect Immun* 69: 1454-62.
- Arthur, F.F., et al. (1997). A comparison of gene transfer methods in human dendritic cells. *Cancer Gene Therapy*, 4, 17-25.
- Arulanandam, B.P., et al. (1999). IL-12 is a potent neonatal vaccine adjuvant. *Eur J Immunol* 29: 256-64.
- 5 Athie, M.V., et al. (2000). IL-12 selectively regulates STAT4 via phosphatidylinositol 3-kinase and Ras-independent signal transduction pathways. *Eur J Immunol* 30: 1425-34.
- Athie-Morales, V., et al. (2004). Sustained IL-12 signaling is required for Th1 development. *J Immunol* 172: 61-9.
- Atkins, M.B., et al. (1999). High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *J Clin Oncol*; 17: 2105-2116.
- 10 Atkins, M.B., et al. (1997). Phase I evaluation of intravenous recombinant human interleukin 12 in patients with advanced malignancies. *Clin Cancer Res* 3: 409-17.
- Balch, C.M., et al. (2001). Final version of the american joint committee on cancer staging system for cutaneous melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, 19: 3635-3648, 2001.
- Berard, F., et al. (2000). Cross-priming of naive CD8 T cells against melanoma antigens using dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells. *J Exp Med* 192: 1535-44.
- 15 Bertagnolli, M.M., et al. (1992). IL-12 augments antigen-dependent proliferation of activated T lymphocytes. *J Immunol* 149: 3778-83.
- Bhardwaj, N., et al. (1996). IL-12 in conjunction with dendritic cells enhances antiviral CD8+ CTL responses in vitro. *J Clin Invest* 98: 715-22.
- 20 Biedermann, T., et al. (2006). IL-12 instructs skin homing of human Th2 cells. *J Immunol* 177: 3763-70.
- Brunda, M.J, y Gatley, M.K. (1994). Antitumor activity of interleukin-12. *Clin Immunol Immunopathol* 71: 253-5.
- Buchanan, J.M., et al. (1995). Interleukin 12 alters the isotype-restricted antibody response of mice to hen eggwhite lysozyme. *Int Immunol* 7: 1519-28.
- Butterfield, L., et al. (2003). Determinant spreading associated with clinical response in dendritic cell-based immunotherapy for malignant melanoma. *Clinical Cancer Research*, 9, 998-1008.
- 25 Cella M., et al., (1999) Maturation, Activation, and Protection of Dendritic Cells Induced by Double stranded RNA. *J. Exp. Med.* 189,821-829.
- Chada, S., et al. (2003). Cytokine-and chemokine-based gene therapy for cancer. *Curr Opin Mot Ther*, 5: 463-474.
- 30 Faure, F., et al. (1998). Tumor-specific immune response: current in vitro analyses may not reflect the in vivo immune status. *Crit Rev Immunol* 18: 77-86.
- Gambotto, Robins et al. 2004
- Gilboa, E. (2007). DC-based Clinical Vaccines. *J. Clin. Invest.* 117: 1195-1203.
- Gogas, H., et al. (2006). Prognostic significance of autoimmunity during treatment of melanoma with interferon. *New England Journal of Medicine*, 354, 709-718.
- 35 Heinzerling, L., et al. (2005). Intratumoral injection of DNA encoding human interleukin 12 into patients with metastatic melanoma: clinical efficacy. *Hum Gene Ther* 16: 35-48.
- Itoh, T., et al. (1994). Partial purification of murine tumor-associated peptide epitopes common to histologically distinct tumors, melanoma and sarcoma, that are presented by H-2Kb molecules and recognized by CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunol* 153: 1202-15.
- 40 Kaka, K.S., et al. (2008). Using Dendritic Cell Maturation and IL-12 Producing Capacity as Markers of Function; A Cautionary Tale. *J. Immunother*, 31 (4): 359-
- Kalinski, P., et al. (2005). Natural killer-dendritic cell cross-talk in cancer immunotherapy. *Expert Opinion Biological Therapy*, 1303-1315.
- 45 Kang, W.K., et al. (2001). Interleukin 12 gene therapy of cancer by peritumoral injection of transduced autologous fibroblasts: outcome of a phase I study. *Hum Gene Ther* 12: 671-84.
- Karzenowski, D., et al. (2005). Inducible control of transgene expression with ecdysone receptor: gene switches with high sensitivity, robust expression, and reduced size. *Biotechniques* 39,191-192.
- Kikuchi, T. (2006). Genetically modified dendritic cells for therapeutic immunity. *Journal of Experimental Medicine*, 208, 1-8.
- 50 Kumar, P., y Katakam. A. (2007). RheoSwitch® System: a highly sensitive ecdysone receptor-based gene regulation system induced by synthetic small-molecule ligands. In *Gene Transfer: Delivery and Expression of DNA and RNA* b Ed. Friedmann, T. y Rossi, J., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 643-651.
- Liu, Y., et al. (2002). In situ adenoviral interleukin 12 gene transfer confers potent and long-lasting cytotoxic in glioma. *Cancer Gene Therapy*, 9, 9-15.
- 55 Mazzolini, G., et al. (2005). Intratumoral injection of dendritic cells engineered to secrete interleukin-12 by recombinant adenovirus in patients with metastatic gastrointestinal carcinomas. *Journal of Clinical Oncology*, 23, 999-1010.
- Murphy, A., et al. (2005). Gene modification strategies to induce tumor immunity. *Immunity*, 22, 409-414.
- 60 Nagayama, H., et al. (2000). IL-12 Responsiveness and Expression of IL-12 Receptor in Human Peripheral Blood Monocyte-derived Dendritic Cells. *J. Immunol.* 165: 59-66.
- Nwanegbo E., et al. (2004). Prevalence of neutralizing antibodies to adenoviral serotypes 5 and 35 in the adult populations of The Gambia, South Africa, and the United States. *Clinical Diagnostic Lab Immunology*. marzo, 11(2), 351-357.
- 65 Palli, S.R., et al. (2003). Improved ecdysone receptor-based inducible gene regulation system. *European Journal of Biochemistry*, 270, 1308-1315.

Philpott, N.J., et al. (2004). Adenovirus-induced maturation of Dendritic Cells through a PI3 kinase-mediated TNF- α induction pathway. *PNAS* 101, 6200-6205.

Ranieri, E., et al. (1999). Dendritic cells transduced with an adenovirus vector encoding epstein-barr virus latent membrane protein 2B: a new modality for vaccination. *Journal of Virology*, 73, 10416-10425.

5 Ribas, A., et al. (2002). Cancer immunotherapy using gene-modified dendritic cells. *Cancer Gene Therapy*, 2, 57-78.

Romani, N., et al. (1994). Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *Journal of Experimental Medicine*, 180, 83-93.

Romani L., et al. (1997). Interleukin-12 in infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 10: 611-36.

10 Rothe, H., et al. (1996). Interleukin-12 gene expression mediates the accelerating effect of cyclophosphamide in autoimmune disease. *Ann N Y Acad Sci* 795: 397-9.

Sangro, B., et al. (2004). Phase I trial of intratumoral injection of an adenovirus encoding interleukin-12 for advanced digestive tumors. *J Clin Oncol* 22: 1389-97.

Sangro, B., et al. (2005). Gene therapy of cancer based on interleukin 12. *Curr Gene Ther* 5: 573-81.

15 Satoh, Y., et al. (2002). Local administration of IL-12-transfected dendritic cells induces antitumor immune responses to colon adenocarcinoma in the liver in mice. *J Exp Ther Oncol* 2: 337-49.

Satoskar, A.R., et al. (2000). IL-12 gene-deficient C57BL/6 mice are susceptible to *Leishmania donovani* but have diminished hepatic immunopathology. *Eur J Immunol* 30: 834-9.

Schopf, L.R., et al. (1999). Interleukin-12 is capable of generating an antigen-specific Th1-type response in the presence of an ongoing infection-driven Th2-type response. *Infect Immun* 67: 2166-71.

20 Spatz, M., et al. (2000). Immune response to the Herpes Simplex Type I regulatory Proteins ICP8 and VP16 in Infected Persons. *J. Med Virol.* 62, 29-36.

Svane, I.M., et al. (1999). The role of cytotoxic T-lymphocytes in the prevention and immune surveillance of tumors-lessons from normal and immunodeficient mice. *Med Oncol* 16: 223-38.

25 Tang, H.L. y Cyster, J.G., (1999). Chemokine up-regulation and activated T cell attraction by maturing dendritic cells. *Science*, 284, 819-822.

Tatsumi, T., et al. (2003). Intratumoral delivery of dendritic cells engineered to secrete both interleukin (IL)-12 and IL-18 effectively treats local and distant disease in association with broadly reactive Tc1-type immunity. *Cancer Res* 63: 6378-86.

30 Thomas, G.R., et al. (2000). IL-12- and IL-2-induced tumor regression in a new murine model of oral squamous-cell carcinoma is promoted by expression of the CD80 co-stimulatory molecule and interferon-gamma. *Int J Cancer* 86: 368-74.

Trinchieri, G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 3: 133-46.

35 Triozzi, P.L., et al. (2005). Phase I study of the intratumoral administration of recombinant canarypox viruses expressing B7.1 and interleukin 12 in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 11: 4168-75.

Tsugawa, T., et al. (2004). Sequential delivery of interferon-gene and DCs to intracranial gliomas promotes an effective anti-tumor response. *Gene Therapy*, 11, 1551-1558.

Tsung, K., et al. (1997). IL-12 induces T helper 1-directed antitumor response. *J Immunol* 158: 3359-65.

40 Vujanovic, L., et al. (2006). IL-12p70 and IL-18 gene-modified dendritic cells loaded with tumor antigen-derived peptides o recombinant protein effectively stimulate specific Type-1 CD4(+) T-cell responses from normal donors and melanoma patients in vitro. *Cancer Gene Therapy*, 13, 798-805.

Wigginton, J.M. y Wiltout, R.H. (2002). IL-12/IL-2 combination cytokine therapy for solid tumours: translation from bench to bedside. *Expert Opin Biol Ther*, 2: 513-524.

45 Wolf, S.F., et al. (1994). Interleukin 12: a key modulator of immune function. *Stem Cells* 12: 154-68.

Yamanaka, R., et al. (2002). Marked enhancement of antitumor immune responses in mouse brain tumor models by genetically modified dendritic cells producing Semliki Forest virus-mediated interleukin-12. *J Neurosurg* 97: 611-8.

50 Yuminamochi, E., et al. (2007). Interleukin-12- and interferon-gamma-mediated natural killer cell activation by *Agaricus blazei* Murill. *Immunology*.

LISTADO DE SECUENCIAS

55 <110> Intrexon Corporation University of Pittsburgh - Of the Commonwealth System of Higher Education
Braughler, J. Mark Kumar, Prasanna Storkus, Walter J. Okada, Hideho

<120> Células dendríticas modificadas por ingeniería y usos para el tratamiento del cáncer

<130> 2584.007PC0A

60 <150> US 61/019.089
<151> 04-01-2008

<150> US 60/991.807

65 <151>03-12- 2007

<150> US 60/990.689
 <151> 28-11-2007

 5 <150> US 60/990.167
 <151>26-11- 2007

 <150> US 60/979.480
 <151> 12-10-2007

 10 <150> US 60/979.485
 <151> 12-10-2007

 <150> US 60/978.509
 <151> 09-10-2007

 15 <150> US 60/978.394
 <151> 08-10-2007

 <150> US 60/978.224
 <151> 08-10-2007

 20 <160> 13

 <170> PatentIn versión 3.3

 25 <210> 1
 <211> 648
 <212> ADN
 <213> *Mus* sp.

 30 <220>
 <223> p35 de IL-12

 <400> 1

 35 **atgtgtcaat cacgctacct cctctttttg gccacccttg ccctcctaaa ccacctcagt 60**
ttggccaggg tcattccagt ctctggacct gccaggtgtc ttagccagtc ccgaaacctg 120
ctgaagacca cagatgacat ggtgaagacg gccagagaaa aactgaaaca ttattcctgc 180
actgctgaag acatcgatca tgaagacatc acacgggacc aaaccagcac attgaagacc 240
tgtttaccac tggaactaca caagaacgag agttgcctgg ctactagaga gacttcttcc 300
acaacaagag ggagctgcct gccccacag aagacgtctt tgatgatgac cctgtgcctt 360
ggtagcatct atgaggactt gaagatgtac cagacagagt tccaggccat caacgcagca 420
cttcagaatc acaaccatca gcagatcatt ctagacaagg gcctgctggt ggccatcgat 480
gagctgatgc agtctctgaa tcataatggc gagactctgc gccagaaacc tcctgtggga 540
gaagcagacc cttacagagt gaaaatgaag ctctgcatcc tgcttcacgc cttcagcacc 600
cgcgctcgtga ccatcaacag ggtgatgggc tatctgagct ccgctga 648

 <210> 2
 <211> 1008
 <212> ADN
 <213> *Mus* sp.

 40 <220>

ES 2 531 522 T3

<223> p40 de IL-12

<400> 2

```
atgtgtcctc agaagctaac catctcctgg ttgcatcg ttttgtggt gtctccactc 60
atggccatgt gggagctgga gaaagacggt tatgtttag aggtggactg gactcccgat 120
gcccctggag aaacagtga cctcacctgt gacacgctg aagaagatga catcacctgg 180
acctcagacc agagacatgg agtcataggg tctggaaaga ccctgaccat cactgtcaaa 240
gagtttctag atgtggcca gtacacctgc cacaaaggag gcgagactct gagccactca 300
catctgctgc tccacaagaa ggaaaatgga atttggtcca ctgaaatttt aaaaaatttc 360
aaaaacaaga ctttctgaa gtgtgaagca ccaaattact cggacggtt cacgtgctca 420
tggctggtgc aaagaaacat ggacttgaag ttcaacatca agagcagtag cagttcccct 480
gactcteggg cagtgacatg tggaatggcg tctctgtctg cagagaaggt cacactggac 540
caaagggact atgagaagta ttcagtgtcc tggcaggagg atgtcacctg cccaactgcc 600
gaggagacce tgccattga actggcgttg gaagcacggc agcagaataa atatgagaac 660
tacagacca gcttcttcat cagggacatc atcaaaccag acccgcccaa gaacttgacg 720
atgaagcctt tgaagaactc acaggtggag gtcagctggg agtaccctga ctctggagc 780
actccccatt cctacttctc cctcaagttc tttgttcgaa tccagcgcaa gaaagaaaag 840
atgaaggaga cagaggaggg gtgtaaccag aaaggtgctt tcctcgtaga gaagacatct 900
accgaagtcc aatgcaaagg cgggaatgtc tgcgtgcaag ctcaggatcg ctattacaat 960
tcctcatgca gcaagtgggc atgtgttccc tgcagggtcc gatcctag 1008
```

5

<210> 3

<211> 660

<212> ADN

10 <213> *Homo sapiens*

<220>

<223> p35 de IL-12

15

<400> 3

ES 2 531 522 T3

atgtgtccag cgcgcagcct cctccttgtg gctaccctgg tcctcctgga ccacctcagt 60
 ttggccagaa acctccccgt ggccaactcca gaccaggaa tgttcccatg ccttcaccac 120
 tcccaaaacc tgctgagggc cgtcagcaac atgctccaga aggccagaca aactctagaa 180
 ttttaccctt gcacttctga agagattgat catgaagata tcacaaaaga taaaaccagc 240
 acagtggagg cctgtttacc attggaatta accaagaatg agagttgcct aaattccaga 300
 gagacctctt tcataactaa tgggagttgc ctggcctcca gaaagacctc ttttatgatg 360
 gccctgtgcc ttagtagtat ttatgaagac ttgaagatgt accaggtgga gttcaagacc 420
 atgaatgcaa agcttctgat ggatcctaag aggcagatct ttctagatca aaacatgctg 480
 gcagttattg atgagctgat gcaggccctg aatttcaaca gtgagactgt gccacaaaaa 540
 tcctcccttg aagaaccgga tttttataaa actaaaatca agctctgcat acttcttcat 600
 gctttcagaa ttcgggcagt gactattgac agagtgaaga gctatctgaa tgcttcctaa 660

<210> 4
 <211> 987
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> p40 de IL-12

10

<400> 4

atgtgtcacc agcagttggt catctcttgg tttccctgg tttttctggc atctcccctc 60
 gtggccatat gggaaactgaa gaaagatggt tatgtcgtag aattggattg gtatccggat 120
 gccctggag aaatggtggt cctcacctgt gacaccctg aagaagatgg tatcacctgg 180
 acctggacc agagcagtga ggtcttaggc tctggcaaaa ccctgacat ccaagtcaaa 240
 gagtttggag atgctggcca gtacacctgt cacaaaggag gcgaggttct aagccattcg 300
 ctctgctgc ttcacaaaaa ggaagatgga atttggtcca ctgatatttt aaaggaccag 360
 aaagaacca aaaataagac ctttctaaga tgcgaggcca agaattatc tggacgtttc 420
 acctgctggt ggctgacgac aatcagtact gatttgacat tcagtgtcaa aagcagcaga 480
 ggctcttctg accccaagg ggtgacgtgc ggagctgcta cactctctgc agagagagtc 540
 agaggggaca acaaggagta tgagtactca gtggagtgcc aggaggacag tgctgcca 600
 gctgctgagg agagtctgcc cattgaggtc atggtggatg ccgttcacaa gctcaagtat 660

ES 2 531 522 T3

gaaaactaca ccagcagctt cttcatcagg gacatcatca aacctgaccc acccaagaac 720
 ttgcagctga agccattaataa gaattctcgg caggtggagg tcagctggga gtaccctgac 780
 acctggagta ctcacattc ctacttctcc ctgacattct gcgttcaggt ccagggcaag 840
 agcaagagag aaaagaaga tagagtcttc acggacaaga cctcagccac ggtcatctgc 900
 cgcaaaaatg ccagcattag cgtgcgggcc caggaccgct actatagctc atcttggagc 960
 gaatgggcat ctgtgcctg cagttag 987

<210> 5
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> *Mus* sp.

<220>
 <223> p35 de IL-12

<400> 5

Met Cys Gln Ser Arg Tyr Leu Leu Phe Leu Ala Thr Leu Ala Leu Leu
 1 5 10 15

Asn His Leu Ser Leu Ala Arg Val Ile Pro Val Ser Gly Pro Ala Arg
 20 25 30

Cys Leu Ser Gln Ser Arg Asn Leu Leu Lys Thr Thr Asp Asp Met Val
 35 40 45

Lys Thr Ala Arg Glu Lys Leu Lys His Tyr Ser Cys Thr Ala Glu Asp
 50 55 60

Ile Asp His Glu Asp Ile Thr Arg Asp Gln Thr Ser Thr Leu Lys Thr
 65 70 75 80

Cys Leu Pro Leu Glu Leu His Lys Asn Glu Ser Cys Leu Ala Thr Arg
 85 90 95

Glu Thr Ser Ser Thr Thr Arg Gly Ser Cys Leu Pro Pro Gln Lys Thr
 100 105 110

Ser Leu Met Met Thr Leu Cys Leu Gly Ser Ile Tyr Glu Asp Leu Lys
 115 120 125

Met Tyr Gln Thr Glu Phe Gln Ala Ile Asn Ala Ala Leu Gln Asn His
 130 135 140

Asn His Gln Gln Ile Ile Leu Asp Lys Gly Met Leu Val Ala Ile Asp

ES 2 531 522 T3

Glu Ala Pro Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Ser Trp Leu Val Gln
 130 135 140
 Arg Asn Met Asp Leu Lys Phe Asn Ile Lys Ser Ser Ser Ser Ser Pro
 145 150 155 160
 Asp Ser Arg Ala Val Thr Cys Gly Met Ala Ser Leu Ser Ala Glu Lys
 165 170 175
 Val Thr Leu Asp Gln Arg Asp Tyr Glu Lys Tyr Ser Val Ser Cys Gln
 180 185 190
 Glu Asp Val Thr Cys Pro Thr Ala Glu Glu Thr Leu Pro Ile Glu Leu
 195 200 205
 Ala Leu Glu Ala Arg Gln Gln Asn Lys Tyr Glu Asn Tyr Ser Thr Ser
 210 215 220
 Phe Phe Ile Arg Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn Leu Gln
 225 230 235 240
 Met Lys Pro Leu Lys Asn Ser Gln Val Glu Val Ser Trp Glu Tyr Pro
 245 250 255
 Asp Ser Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Lys Phe Phe Val
 260 265 270
 Arg Ile Gln Arg Lys Lys Glu Lys Met Lys Glu Thr Glu Glu Gly Cys
 275 280 285
 Asn Gln Lys Gly Ala Phe Leu Val Glu Lys Thr Ser Thr Glu Val Gln
 290 295 300
 Cys Lys Gly Gly Asn Val Cys Val Gln Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Asn
 305 310 315 320
 Ser Ser Cys Ser Lys Trp Ala Cys Val Pro Cys Arg Val Arg Ser
 325 330 335

<210> 7
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> p35 de IL-12

<400> 7

5

10

ES 2 531 522 T3

Met Cys Pro Ala Arg Ser Leu Leu Leu Val Ala Thr Leu Val Leu Leu
1 5 10 15

Asp His Leu Ser Leu Ala Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr Pro Asp Pro
20 25 30

Gly Met Phe Pro Cys Leu His His Ser Gln Asn Leu Leu Arg Ala Val
35 40 45

Ser Asn Met Leu Gln Lys Ala Arg Gln Thr Leu Glu Phe Tyr Pro Cys
50 55 60

Thr Ser Glu Glu Ile Asp His Glu Asp Ile Thr Lys Asp Lys Thr Ser
65 70 75 80

Thr Val Glu Ala Cys Leu Pro Leu Glu Leu Thr Lys Asn Glu Ser Cys
85 90 95

Leu Asn Ser Arg Glu Thr Ser Phe Ile Thr Asn Gly Ser Cys Leu Ala
100 105 110

Ser Arg Lys Thr Ser Phe Met Met Ala Leu Cys Leu Ser Ser Ile Tyr
115 120 125

Glu Asp Leu Lys Met Tyr Gln Val Glu Phe Lys Thr Met Asn Ala Lys
130 135 140

Leu Leu Met Asp Pro Lys Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln Asn Met Leu
145 150 155 160

Ala Val Ile Asp Glu Leu Met Gln Ala Leu Asn Phe Asn Ser Glu Thr
165 170 175

Val Pro Gln Lys Ser Ser Leu Glu Glu Pro Asp Phe Tyr Lys Thr Lys
180 185 190

Ile Lys Leu Cys Ile Leu Leu His Ala Phe Arg Ile Arg Ala Val Thr
195 200 205

Ile Asp Arg Val Met Ser Tyr Leu Asn Ala Ser
210 215

<210> 8
<211> 328
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

ES 2 531 522 T3

<220>
 <223> p40 de IL-12

<400> 8

5

Met Cys His Gln Gln Leu Val Ile Ser Trp Phe Ser Leu Val Phe Leu
 1 5 10 15

Ala Ser Pro Leu Val Ala Ile Trp Glu Leu Lys Lys Asp Val Tyr Val
 20 25 30

Val Glu Leu Asp Trp Tyr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met Val Val Leu
 35 40 45

Thr Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Gly Ile Thr Trp Thr Leu Asp Gln
 50 55 60

Ser Ser Glu Val Leu Gly Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Gln Val Lys
 65 70 75 80

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

Leu Ser His Ser Leu Leu Leu Leu His Lys Lys Glu Asp Gly Ile Trp
 100 105 110

Ser Thr Asp Ile Leu Lys Asp Gln Lys Glu Pro Lys Asn Lys Thr Phe
 115 120 125

Leu Arg Cys Glu Ala Lys Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Trp Trp
 130 135 140

Leu Thr Thr Ile Ser Thr Asp Leu Thr Phe Ser Val Lys Ser Ser Arg
 145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Gln Gly Val Thr Cys Gly Ala Ala Thr Leu Ser
 165 170 175

Ala Glu Arg Val Arg Gly Asp Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr Ser Val Glu
 180 185 190

Cys Gln Glu Asp Ser Ala Cys Pro Ala Ala Glu Glu Ser Leu Pro Ile
 195 200 205

Glu Val Met Val Asp Ala Val His Lys Leu Lys Tyr Glu Asn Tyr Thr
 210 215 220

ES 2 531 522 T3

Ser Ser Phe Phe Ile Arg Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn
 225 230 235 240

Leu Gln Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu Val Ser Trp
 245 250 255

Glu Tyr Pro Asp Thr Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Thr
 260 265 270

Phe Cys Val Gln Val Gln Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys Lys Asp Arg
 275 280 285

Val Phe Thr Asp Lys Thr Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg Lys Asn Ala
 290 295 300

Ser Ile Ser Val Arg Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Trp Ser
 305 310 315 320

Glu Trp Ala Ser Val Pro Cys Ser
 325

- 5 <210> 9
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
 <223> Elemento de respuesta del receptor de ecdisona sintético
- 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9) .. (9)
 <223> n es a, c, t, g o t
- 20 <400> 9
 rrggtcant gacacyy 17
- 25 <210> 10
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 30 <220>
 <223> Elemento de respuesta del receptor de ecdisona sintético
- 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7) .. (7)
 <223> n es a, c, g o t
- <400> 10
 aggtcanagg tca 13
- <210> 11
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 531 522 T3

<220>
 <223> Elemento de respuesta del receptor de ecdisona sintético

5 <400> 11
 gggttgaatg aattt 15

10 <210> 12
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Sitio de restricción de endonucleasa de retorno I-SceI sintética

20 <400> 12
 tagggataac agggtaat 18

25 <210> 13
 <211> 37323
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Ad-RTS-hIL-12 sintética (SP1-RheoIL-12)

<400> 13

```

catcatcaat aatatacctt attttggatt gaagccaata tgataatgag ggggtggagt 60
ttgtgacgtg gcgcggggcg tgggaacggg gcgggtgacg tagtagtgtg gcggaagtgt 120
gatgttgcaa gtgtggcggg acacatgtaa gcgacggatg tggcaaaagt gacgtttttg 180
gtgtgcccgc gtgtacacag gaagtgacaa ttttcgcgcg gtttaggcg gatgtttag 240
taaatttggg cgtaaccgag taagatttgg ccattttcgc gggaaaactg aataagagga 300
agtgaaatct gaataatttt gtgttactca tagcgcgtaa tatttgtcta gggagatccg 360
gtaccggcgc gcgcgcgctt tggccgcctc gagtctagag atccggtgag tattagggcg 420
gcaccaggtg ccgcaataaa atatctttat tttcattaca tctgtgtgtt ggttttttgt 480
gtgaatcgat agtactaaca tacgctctcc atcaaaacaa aacgaaacaa aacaaactag 540
caaaataggc tgtccccagt gcaagtgcag gtgccagaac atttctctat cgataatgca 600
ggtcggagta ctgtcctccg agcggagtac tgctctccga gcggagtact gtcctccgag 660
cggagtactg tcctccgagc ggagtactgt cctccgagcg gagtactgtc ctccgagcgg 720
agactcttcg aaggaagagg ggcggggctc atcgaccccg ccctcttcc ttcgaaggaa 780
  
```

ES 2 531 522 T3

gaggggcggg gtcgaagacc tagagggtat ataatgggtg ccttagctgg tgtgtgagct 840
catcttcctg tagatcacgc gtgccaccat gggtcaccag cagttggtca tctcttggtc 900
ttccctgggtt tttctggcat ctcccctegt ggccatatgg gaactgaaga aagatgttta 960
tgtcgtagaa ttggattggt atccggatgc ccctggagaa atgggtggtcc tcacctgtga 1020
caccctgaa gaagatggta tcacctggac cttggaccag agcagtgagg tcttaggctc 1080
tggcaaaacc ctgaccatcc aagtcaaaga gtttggagat gctggccagt acacctgtca 1140
caaaggaggc gaggttctaa gccattcget cctgctgctt cacaaaaagg aagatggaat 1200
ttggtccact gatattttaa aggaccagaa agaaccctaaa aataagacct ttctaagatg 1260
cgaggccaag aattattctg gacgtttcac ctgctgggtg ctgacgacaa tcagtactga 1320
tttgacattc agtgtcaaaa gcagcagagg ctcttctgac ccccaagggg tgacgtgcgg 1380
agctgctaca ctctctgcag agagagtcag aggggacaac aaggagtatg agtactcagt 1440
ggagtgccag gaggacagtg cctgccagc tgctgaggag agtctgcca ttgaggtcat 1500
ggtggatgcc gttcacaagc tcaagtatga aaactacacc agcagcttct tcacagggga 1560
catcatcaaa cctgaccac ccaagaactt gcagctgaag ccattaaaga attctcggca 1620
ggtggaggtc agctgggagt accctgacac ctggagtact ccacattcct acttctccct 1680
gacattctgc gttcaggtcc agggcaagag caagagagaa aagaaagata gagtcttcac 1740
ggacaagacc tcagccacgg tcactctcgg caaaaatgcc agcattagcg tgcgggcca 1800
ggaccgctac tatagctcat cttggagcga atgggcatct gtgccctgca gttaggttgg 1860
gcgagctcga attcattgat cccccggct gcaggaattc gatatcaagc tcgggatccg 1920
aattccgccc ccccccccc ccccccccta acgttactgg ccgaagccgc ttggaataag 1980
gccggtgtgc gtttgtctat atgttatttt ccaccatatt gccgtctttt ggcaatgtga 2040
gggcccggaa acctggccct gtcttcttga cgagcattcc taggggtctt tcccctctcg 2100
ccaaaggaat gcaaggtctg ttgaatgtcg tgaaggaagc agttcctctg gaagcttctt 2160
gaagacaaac aacgtctgta gcgacccttt gcaggcagcg gaacccccca cctggcgaca 2220
ggtgcctctg cggccaaaag ccacgtgtat aagatacacc tgcaaaggcg gcacaacccc 2280
agtgccacgt tgtgagttgg atagttgtgg aaagagtcaa atggctctcc tcaagcgtat 2340
tcaacaaggg gctgaaggat gcccagaagg taccatttg tatgggatct gatctggggc 2400
ctcggtgca acgctttaca tgtgtttagt cgaggttaaa aaaacgtcta ggcccccgga 2460
accacgggga cgtggttttc ctttgaaaaa cacgatgata atatggccac aaccatgggt 2520
ccagcgcgca gcctcctcct tgtggctacc ctggctctcc tggaccacct cagtttggcc 2580
agaaaacctc ccgtggccac tccagacca ggaatgttcc catgccttca ccaactccaa 2640

ES 2 531 522 T3

aacctgctga gggccgctcag caacatgctc cagaaggcca gacaaactct agaattttac 2700
 ccttgcaactt ctgaagagat tgatcatgaa gatatcacia aagataaaac cagcacagtg 2760
 gaggcctggt taccattgga attaaccaag aatgagagtt gcctaaattc cagagagacc 2820
 tctttcataa ctaatgggag ttgcctggcc tccagaaaga cctcttttat gatggccctg 2880
 tgccttagta gtatttatga agacttgaag atgtaccagg tggagttaa gaccatgaat 2940
 gcaaagcttc tgatggatcc taagaggcag atctttctag atcaaacat gctggcagtt 3000
 attgatgagc tgatgcaggc cctgaatttc aacagtgaga ctgtgccaca aaaatcctcc 3060
 cttgaagaac cggattttta taaaactaaa atcaagctct gcatacttct tcatgcttcc 3120
 agaattcggg cagtgactat tgatagagtg atgagctatc tgaatgcttc ctaacgtacg 3180
 tcgacatcga gaacttggtt attgcagctt ataatggtta caaataaagc aatagcatca 3240
 caaatttcac aaataaagca tttttttcac tgcattctag ttgtggtttg tccaaactca 3300
 tcaatgtatc ttatcatgtc tgggcgctcc ggcctccgcg cggggttttg gcgctcccg 3360
 cgggcgcccc cctcctcagc gcgagcgtg ccacgtcaga cgaagggcgc agcgagcgtc 3420
 ctgaccttc cgcctcgagc ctcaggacag cggcccgctg ctcataagac tcggccttag 3480
 aaccccagta tcagcagaag gacattttag gacgggactt gggtgactct agggcactgg 3540
 ttttctttcc agagagcggg acaggcggg aaaagtagtc ccttctcggc gattctgcgg 3600
 agggatctcc gtggggcggt gaacgccgat gattatataa ggacgcgccg ggtgtggcac 3660
 agctagttec gtcgcagccg ggatttgggt cgcggttctt gtttgtggat cgtctgtgatc 3720
 gtcacttggg gagtagcggg ctgctgggct gggtaactgc gctcggggtt ggcgagtgtg 3780
 ttttgtgaag ttttttaggc accttttgaa atgtaatcat ttgggtcaat atgtaatttt 3840
 cagtgttaga ctagtaaatt gtccgctaaa ttctggccgt ttttggtttt tttgtagac 3900
 gagctagcgc cgccaccatg ggccctaaaa agaagcgtaa agtcgcccc cgcaccgatg 3960
 tcagcctggg ggacgagctc cacttagacg gcgaggacgt ggcgatggcg catgccgacg 4020
 cgctagacga tttcgatctg gacatggttg gggacgggga tccccgggt ccgggattta 4080
 cccccacga ctccgcccc tacggcgtc tggatatggc cgacttcgag tttgagcaga 4140
 tgttaccga tgccttgga attgacgagt acgggtgggga attcgagatg cctgtggaca 4200
 ggatcctgga ggcagagctt gctgtggaac agaagagtga ccagggcgtt gagggctctg 4260
 ggggaaccgg gggtagcggc agcagccaa atgaccctgt gactaacatc tgtcaggcag 4320
 ctgacaaaca gctattcacg cttgttgagt gggcgaagag gatcccacac ttttctctct 4380
 tgcctctgga tgatcaggtc atattgctgc gggcaggctg gaatgaactc ctcatgctct 4440

ES 2 531 522 T3

ccttttcaca ccgatccatt gatgttcgag atggcatcct ccttgccaca ggtcttcacg 4500
 tgcaccgcaa ctcagcccat tcagcaggag taggagccat ctttgatcgg gtgctgacag 4560
 agctagtgtc caaaatgcgt gacatgagga tggacaagac agagcttggc tgcctgaggg 4620
 caatcattct gtttaatcca gaggtgaggg gtttgaaatc cgcccaggaa gttgaacttc 4680
 tacgtgaaaa agtatatgcc gctttggaag aatatactag aacaacacat cccgatgaac 4740
 caggaagatt tgcaaaaactt ttgcttcgtc tgccttcttt acgttccata ggccttaagt 4800
 gtttgagca tttgtttttc tttcgcctta ttggagatgt tccaattgat acgttcctga 4860
 tggagatgct tgaatcacct tctgattcat aatctagcct agccccctc tccctcccc 4920
 ccccctaacg ttactggccg aagccgcttg gaataaggcc ggtgtgcgtt tgtctatatg 4980
 ttattttcca ccatattgcc gtcttttggc aatgtgaggg cccggaaacc tggccctgtc 5040
 ttcttgacga gcattectag gggctcttcc cctctcgcca aaggaatgca aggtctgttg 5100
 aatgtcgtga aggaagcagt tctctggaa gcttcttgaa gacaaacaac gtctgtagcg 5160
 accctttgca ggcagcggaa cccccacct ggcgacaggt gcctctgcgg caaaagcca 5220
 cgtgtataag atacacctgc aaaggcggca caaccccagt gccacgttgt gagttggata 5280
 gttgtggaaa gagtcaaatg gctctcctca agcgtattca acaaggggct gaaggatgcc 5340
 cagaaggtac cccattgtat gggatctgat ctggggcctc ggtgcacatg ctttacatgt 5400
 gtttagtca ggttaaaaaa cgtctaggcc ccccgaaaca cggggacgtg gtttctcttt 5460
 gaaaaacacg atctctaggc gccaccatga agctactgtc ttctatcgaa caagcatgcg 5520
 atatttgccg acttaaaaag ctcaagtgtc ccaaagaaaa accgaagtgc gccaaagtgc 5580
 tgaagaacaa ctgggagtgt cgctactctc ccaaaaaccaa aaggtctccg ctgactaggg 5640
 cacatctgac agaagtggaa tcaaggctag aaagactgga acagctattt ctactgattt 5700
 ttcoctgaga agaccttgac atgattttga aaatggatc tttacaggat ataaaagcat 5760
 tgtaaacagg attatttgta caagataatg tgaataaaga tgccgtcaca gatagattgg 5820
 cttcagtgga gactgatatg cctctaacat tgagacagca tagaataagt gcgacatcat 5880
 catcggaaga gagtagtaac aaaggtaaaa gacagttgac tgtatcgccg gaattcccgg 5940
 ggatccggcc tgagtgcgta gtaccggaga ctcagtgcgc catgaagcgg aaagagaaga 6000
 aagcacagaa ggagaaggac aaactgcctg tcagcacgac gacggtggac gaccacatgc 6060
 cgcccattat gcagtgtgaa cctccacctc ctgaagcage aaggattcac gaagtgttcc 6120
 caaggtttct ctccgacaag ctggttggtga caaacggca gaaaaacatc ccccagttga 6180
 cagccaacca gcagttcctt atcgccaggc tcatctggta ccaggacggg tacgagcagc 6240
 cttctgatga agatttgaag aggattacgc agacgtggca gcaagcggac gatgaaaacg 6300

ES 2 531 522 T3

aagagtcgga cactcccttc cgccagatca cagagatgac taccctcacg gtccaactta 6360
tcgtggagtt cgcgaagggg ttgccagggt tcgccaagat ctgcgagcct gatcaaatta 6420
cgetgcttaa ggcttgetca agtgaggtaa tgatgctccg agtcgcgcga cgatac gatg 6480
cggcctcaga cagtattctg ttgcggaaca accaagcgta cactcgcgac aactaccgca 6540
aggctggcat ggccgaggtc atcgaggatc tactgcactt ctgccgggtgc atgtactcta 6600
tggcgttgga caacatccat tacgcgctgc tcacggctgt cgtcatcttt tctgaccggc 6660
cagggttgga gcagccgcaa ctggtggaag agatccagcg gtactacctg aatacgtccc 6720
gcatctatat cctgaaccag ctgagcgggt cggcgcggtc gtccgtcata tacggcaaga 6780
tcctctcaat cctctctgag ctacgcacgc tcggcatgca aaactccaac atgtgcatct 6840
ccctcaagct caagaacaga aagctgccc ctttccctga ggagatctgg gatgtggcgg 6900
acatgtcgca cacccaaccg ccgcctatcc tcgagtcccc cacgaatctc tagggcggct 6960
ctagagcggc cgccaccgcg gggagatcca gacatgataa gatacattga tgagtttgga 7020
caaaccacaa ctagaatgca gtgaaaaaaaa tgctttattt gtgaaatttg tgatgctatt 7080
gctttatttg taaccattat aagctgcaat aaacaagtta acaacaacaa ttgcattcat 7140
tttatgtttc aggttcaggg ggaggtgtgg gaggtttttt aaagcaagta aaacctctac 7200
aaatgtggta tggttgatta tgatccggct gcctcgcgcg tttcgggtgat gacggtgaaa 7260
acctctgaca catgcagctc ccggagacgg tcacagcttg tctgtaagcg gatgccggga 7320
gcagacaagc ccgtcagggc gcgtcagcgg gtgttgccgg gtgtcggggc gcagccatga 7380
ggtcgactct agtccccgcg gtggcagatc tggaaggtgc tgaggtacga tgagaccgca 7440
accaggtgca gaccctgcga gtgtggcggg aaacatatta ggaaccagcc tgtgatgctg 7500
gatgtgaccg aggagctgag gcccgatcac ttgggtgctgg cctgcacccg cgctgagttt 7560
ggctctagcg atgaagatac agattgaggt actgaaatgt gtgggcgctgg cttaagggtg 7620
ggaaagaata tataaggtgg gggctctatg tagttttgta tctgttttgc agcagccgcc 7680
gccgccatga gcaccaactc gtttgatgga agcattgtga gctcatattt gacaacgcgc 7740
atgcccccat gggccggggg gcgtcagaat gtgatgggct ccagcattga tggctgcccc 7800
gtcctgcccg caaactctac taccttgacc tacgagaccg tgtctggaac gccgttgag 7860
actgcagcct ccgccgcgc ttcagccgct gcagccaccg cccgcgggat tgtgactgac 7920
tttgctttcc tgagcccgct tgcaagcagt gcagcttccc gttcatccgc ccgcgatgac 7980
aagttgacgg ctcttttggc acaattggat tctttgacce gggaaacttaa tgtcgtttct 8040
cagcagctgt tggatctgcg ccagcaggtt tctgccctga aggcttctc ccctcccaat 8100

ES 2 531 522 T3

gcggtttaa acataaataa aaaaccagac tctgtttggga tttggatcaa gcaagtgtct 8160
 tgctgtcttt atttaggggt tttgcgcgcg cggtagggccc gggaccagcg gtctcggteg 8220
 ttgagggtcc tgtgtatttt ttccaggacg tggtaaagggt gactctggat gttcagatac 8280
 atgggcataa gcccgtctct ggggtggagg tagcaccact gcagagcttc atgctgcggg 8340
 gtggtgttgt agatgatcca gtcgtagcag gagcgcctggg cgtgggtgect aaaaatgtct 8400
 ttcagtagca agctgattgc caggggcagg cccttgggtgt aagtgtttac aaagcggtta 8460
 agctgggatg ggtgcatacg tggggatatg agatgcactc tggactgtat ttttaggttg 8520
 gctatgttcc cagccatata cctccgggga ttcattgtgt gcagaaccac cagcacagtg 8580
 tatccggtgc acttgggaaa tttgtcatgt agcttagaag gaaatgcgtg gaagaacttg 8640
 gagacgccct tgtgacctcc aagattttcc atgcattcgt ccataatgat ggcaatgggc 8700
 ccacgggcgg cggcctgggc gaagatattt ctgggatcac taacgtcata gttgtgttcc 8760
 aggatgagat cgtcataggc catttttaca aagcgcgggc ggagggtgcc agactgcggt 8820
 ataatggttc catccggccc aggggcgtag ttaccctcac agatttgcac tcccacgct 8880
 ttgagttcag atggggggat catgtctacc tgcggggcga tgaagaaaac ggtttccggg 8940
 gtaggggaga tcagctggga agaaagcagg ttcttgagca gctgcgactt accgcagccg 9000
 gtgggcccgt aaatcacacc tattacgggc tgcaactggt agttaagaga gctgcagctg 9060
 ccgtcatccc tgagcagggg ggccacttcg ttaagcatgt cctgactcg catgttttcc 9120
 ctgaccaa at cccagaag gcgctcgccg cccagcgata gcagttcttg caaggaagca 9180
 aagtttttca acggtttgag accgtccgcc gtaggcatgc ttttgagcgt ttgaccaagc 9240
 agttccaggc ggtcccacag ctcggtcacc tgcctctacgg catctcgatc cagcatatct 9300
 cctcgtttcg cgggttgggg cggctttcgc tgtacggcag tagtcgggtgc tcgtccagac 9360
 gggccagggt catgtctttc cacgggcgca gggtcctcgt cagcgtagtc tgggtcacgg 9420
 tgaaggggtg cgctccgggc tgcgcgctgg ccagggtgcg cttgaggctg gtcttgctgg 9480
 tgctgaagcg ctgccggtct tcgccctgcg cgtcggccag gtagcatttg accatgggtg 9540
 catagtccag cccctccgcg gcgtggccct tggcgcgcag cttgcccttg gaggaggcgc 9600
 cgcacgaggg gcagtgacga cttttgaggg cgtagagctt gggcgcgaga aataccgatt 9660
 ccggggagta ggcattccgcg ccgcaggccc cgcagacggt ctgcattcc acgagccagg 9720
 tgagctctgg ccgttcgggg tcaaaaacca ggtttccccc atgctttttg atgcgtttct 9780
 tacctctggt ttccatgagc cgggtgccac gctcgggtgac gaaaaggctg tccgtgtccc 9840
 cgtatacaga cttgagaggc ctgtcctcga gcgggtgtcc gcggtcctcc tcgtatagaa 9900
 actcggacca ctctgagaca aaggctcgcg tccaggccag cacgaaggag gctaagtggg 9960

ES 2 531 522 T3

aggggtagcg gtcgttgtcc actaggggggt ccactcgctc caggggtgtga agacacatgt 10020
 cgccctcttc ggcacacaagg aaggtgattg gttttaggtg gtaggccacg tgaccgggtg 10080
 ttctgaagg ggggctataa aaggggggtgg gggcgcgttc gtcctcactc tcttccgcat 10140
 cgctgtctgc gagggccagc tgttgggggtg agtactccct ctgaaaagcg ggcacgactt 10200
 ctgcgctaag attgtcagtt tccaaaaacg aggaggattt gatattcacc tggccccgcg 10260
 tgatgccttt gaggggtggcc gcatccatct ggtcagaaaa gacaatcttt ttgttgtcaa 10320
 gcttgggtggc aaacgacccg tagagggcgt tggacagcaa cttggcgatg gagcgcaggg 10380
 tttggttttt gtcgcgatcg gcgcgctcct tggcccgcat gtttagctgc acgtattcgc 10440
 gcgcaacgca ccgccattcg ggaaagacgg tgggtgcgctc gtcgggcacc aggtgcacgc 10500
 gccaaccccg gttgtgcagg gtgacaaggt caacgctggt ggctacctct ccgcgtaggc 10560
 gctcgttggg ccagcagagg cggccgccct tgcgcgagca gaatggcggg agggggctca 10620
 getgcgtctc gtccgggggg tctgcgtcca cggtaaagac cccgggcagc aggcgcgcgt 10680
 cgaagtagtc tatcttgcac ccttgcaagt ctagcgctg ctgccatgcg cgggcggcaa 10740
 gcgcgcgctc gtatggggtg agtgggggac cccatggcat ggggtgggtg agcgcggagg 10800
 cgtacatgcc gcaaatgtcg taaacgtaga ggggctctct gattattcca agatatgtag 10860
 ggtagcatct tccaccgagg atgctggcgc gcacgtaate gtatagtctg tgcgagggag 10920
 cgaggaggtc gggaccgagg ttgctacggg cgggctgctc tgctcggag actatctgcc 10980
 tgaagatggc atgtgagttg gatgatatgg ttggacgctg gaagacgttg aagctggcgt 11040
 ctgtgagacc taccgcgtca cgcacgaagg aggcgtagga gtcgcgcagc ttgttgacca 11100
 gctcggcggg gacctgcacg tctagggcgc agtagtccag ggtttccttg atgatgtcat 11160
 acttatcctg tccctttttt ttccacagct cgcggttgag gacaaactct tcgcggctct 11220
 tccagtactc ttggatcgga aaccgctcgg cctccgaacg gtaagagcct agcatgtaga 11280
 actggttgac ggcctggtag gcgcagcacc ccttttctac gggtagcgcg tatgcctgcg 11340
 cggccttccg gagcaggggtg tgggtgagcg caaaggtgtc cctgaccatg actttgaggt 11400
 actggtatct gaagtcagtg tcgtcgcacc cgcctgctc ccagagcaaa aagtccgtgc 11460
 gctttttgga acgcggattt ggcagggcga aggtgacacc gttgaagagt atctttcccg 11520
 cgcgaggcat aaagttgcgt gtgatgcgga agggctcccg cacctcggaa cggttggtta 11580
 ttacctgggc ggcgagcacg atctcgtcaa agccgttgat gttgtggccc acaatgtaaa 11640
 gttccaagaa gcgcgggatg cccttgatgg aaggcaattt ttaagtcc tcgtaggtga 11700
 gctcttcagg ggagctgagc ccgtgctctg aaagggccca gtctgcaaga tgaggggttg 11760

ES 2 531 522 T3

aagcgacgaa tgagctccac aggtcacggg ccattagcat ttgcaggtgg tcgcgaaagg 11820
tcctaaactg gcgacctatg gccatttttt ctgggggtgat gcagtagaag gtaagcgggt 11880
cttgttocca gcggccccat ccaaggttcg cggctaggtc tcgcgcggca gtcactagag 11940
gctcatctcc gccgaacttc atgaccagca tgaagggcac gagctgcttc ccaaaggccc 12000
ccatccaagt ataggtctct acatcgtagg tgacaaagag acgctcggtg cgaggatgcg 12060
agccgatcgg gaagaactgg atctcccgcc accaattgga ggagtggcta ttgatgtggg 12120
gaaagtagaa gtccttgcga cgggcccgaac actcgtgctg gcttttgtaa aaacgtgccc 12180
agtactggca gcggtgcacg ggctgtacat cctgcacgag gttgacctga cgaccgcgca 12240
caaggaagca gagtgggaat ttgagccctc cgccctggcgg gtttggctgg tggctctcta 12300
cttcggctgc ttgtccttga ccgtctggct gctcaggggg agttacggtg gatcggacca 12360
ccacgccgcy cgagcccaaa gtccagatgt ccgcgcgcgg cggtcggagc ttgatgacaa 12420
catcgcgcag atgggagctg tccatggtct ggagctcccg cggcgtcagg tcaggcggga 12480
gctcctgcag gtttacctcg catagacggg tcagggcgcg ggctagatcc aggtgatacc 12540
taatttccag gggctggttg gtggcggcgt cgatggcttg caagaggccg catccccgcy 12600
gcgcgactac ggtaccgcgc ggcggggcgt gggccgcggg ggtgtccttg gatgatgat 12660
ctaaaagcgg tgacgcgggc gagcccccg aggtaggggg ggctccggac ccgccgggag 12720
agggggcagg ggcacgtcgg ccgcgcgcgc gggcaggagc tgggtgctgcy cgcgtaggtt 12780
gctggcgaac gcgacgacgc ggcggttgat ctccatgaatc tggcgcctct gcgtgaagac 12840
gacgggcccg gtgagcttga acctgaaaga gagttcgaca gaatcaattt cgggtgtcgtt 12900
gacggcggcc tggcgcaaaa tctcctgcac gtctcctgag ttgtcttgat aggcgatctc 12960
ggccatgaac tgctcgatct ctccctcctg gagatctccg cgtccggctc gctccacggt 13020
ggcggcgagg tcgttgaaa tgccggccat gagctgcgag aaggcgttga ggcctccctc 13080
gttccagacg eggetgtaga ccacgcccc ttcggcatcg cgggcgcgca tgaccacctg 13140
cgcgagattg agctccacgt gccggggcaa gacggcgtag tttcgcaggc gctgaaagag 13200
gtagttgagg gtggtggcgg tgtgttctgc cacgaagaag tacataacce agcgtcgcaa 13260
cgtggattcg ttgatatccc ccaaggcctc aaggcctcc atggcctcgt agaagtccac 13320
ggcgaagttg aaaaactggg agttgcgcgc cgacacggtt aactcctcct ccagaagacg 13380
gatgagctcg gcgacagtgt cgcgcacctc gcgctcaaag gctacagggg cctcttcttc 13440
ttcttcaatc tctcttcca taagggcctc cccttcttct tcttctggcg gcggtggggg 13500
aggggggaca cggcggcgac gacggcgcac cgggagggcg tcgacaaagc gctcgatcat 13560
ctccccgcy cgacggcgca tggctcggg gacggcgcgg ccgctctcgc gggggcgcy 13620

ES 2 531 522 T3

ttggaagacg ccgcccgtca tgtcccggtt atgggttggc ggggggctgc catgcggcag 13680
 ggatacggcg ctaacgatgc atctcaacaa ttgttgtgta ggtactccgc cgccgagggga 13740
 cctgagcgag tccgcatcga ccggatcgga aaacctctcg agaaaggcgt ctaaccagtc 13800
 acagtgcgca ggtaggctga gcaccgtggc gggcggcagc gggcgggcgt cgggggttgtt 13860
 tctggcggag gtgctgctga tgatgtaatt aaagtaggcg gtcttgagac ggcggatggt 13920
 cgacagaagc accatgtcct tgggtccggc ctgctgaatg cgcaggcggg cggccatgcc 13980
 ccaggcttcg ttttgacatc ggcgcaggtc tttgtagtag tcttgcatga gcctttctac 14040
 cggcacttct tcttctcctt cctcttgtcc tgcactctctt gcactctatc ctgcgggcggc 14100
 ggcggagttt ggccgtaggt ggcgcctctt tctctccatg cgtgtgaccc cgaagcccct 14160
 catcggctga agcagggcta ggtcggcgac aacgcgctcg gctaatatgg cctgctgcac 14220
 ctgcgtgagg gtagactgga agtcatccat gtccacaaaag cgggtggtatg cgcccggtgtt 14280
 gatggtgtaa gtgcagttgg ccataacgga ccagttaacg gtctggtgac ccggctgcga 14340
 gagctcggtg tacctgagac gcgagtaagc cctcgagtca aatacgtagt cgttgcaagt 14400
 ccgcaccagg tactggtatc ccaccaaaaa gtgcggcggc ggctggcggg agaggggcca 14460
 gcgtaggggtg gccggggctc cgggggagc atcttccaac ataaggcgat gatatccgta 14520
 gatgtacctg gacatccagg tgatgcccgc ggcggtggtg gaggcgcgcg gaaagtgcg 14580
 gacgcggttc cagatggtgc gcagcggcaa aaagtgtctc atggtcggga cgctctggcc 14640
 ggtcaggcgc gcgcaatcgt tgacgctcta gcgtgcaaaa ggagagcctg taagcgggca 14700
 ctcttcctg gtctggtgga taaattcgca agggatatcat ggcggacgac cggggttcga 14760
 gccccgtatc cggccgtccg ccgtgatcca tgcggttacc gcccgcgtgt cgaaccagg 14820
 tgtgcgacgt cagacaacgg gggagtgtc cttttggctt ccttccaggc gcggcggtg 14880
 ctgcgctagc ttttttggcc actggccgcg cgcagcgtaa gcggttaggc tggaaagcga 14940
 aagcattaag tggctcgcct cctgtagccg gagggttatt ttccaagggt tgagtcgcgg 15000
 gacccccggt tcgagtctcg gaccggccgg actgcggcga acgggggtt gcctccccgt 15060
 catgcaagac cccgcttgca aattcctccg gaaacaggga cgagcccctt ttttgctttt 15120
 cccagatgca tccggtgctg cggcagatgc gccccctcc tcagcagcgg caagagcaag 15180
 agcagcggca gacatgcagg gcaccctccc ctctcctac cgcgtcagga gggcgacat 15240
 ccgcggttga cgcggcagca gatggtgatt acgaaccccc gcggcgccgg gcccgact 15300
 acctggactt ggaggagggc gagggcctgg cgcggctagg agcgcctct cctgagcggc 15360
 acccaagggt gcagctgaag cgtgatacgc gtgaggcgta cgtgcccggc cagaacctgt 15420

ES 2 531 522 T3

ttcgcgaccg cgagggagag gagcccgagg agatgcggga tcgaaagtcc cacgcagggc 15480
 gcgagctgcy gcatggcctg aatcgcgagc ggttgctgcy cgaggaggac tttgagcccc 15540
 acgcygcaac cgggattagt cccgcygcyg cacacgtggc ggccgcccac ctggtaaccc 15600
 catacgagca gacgggtgaac caggagatta actttcaaaa aagctttaac aaccacgtgc 15660
 gtacgcttgt ggcgcygcyg gaggtggcta taggactgat gcatctgtgg gactttgtaa 15720
 gcygcytggg gcaaaaccca aatagcaagc cgcctcatggc gcagctgttc cttatagtgc 15780
 agcacagcag ggacaacgag gcattcaggg atgcgctgct aaacatagta gagcccaggg 15840
 gccgctggct gctcgatttg ataaacatcc tgcagagcat agtgggtgcag gagcgcagct 15900
 tgagcctggc tgacaaggty gccgccatca actattccat gcttagcctg ggcaagtttt 15960
 acgcccgcaa gatataccat accccttacg ttccataga caaggaggtg aagatcgagg 16020
 ggttctacat gcygcatggcy ctgaaggtyc ttacctgag cygcygacctg ggcgtttatc 16080
 gcaacgagcy catccacaag gccgtgagcy tgagccggcy gcygcygctc agcygaccgy 16140
 agctgatgca cagcctgcaa agggccctgg ctggcacggg cagcggcgat agagaggccg 16200
 agtccactt tgacgcyggc gctgacctgc gctgggcccc aagccgacgc gccctggagg 16260
 cagctggggc cggacctggg ctggcggtyg caccgcygcy cgcctggcaac gtcggcggcy 16320
 tggaggaata tgacygagc gatgagtyc agccagagga cggcygagtyc taagcygtga 16380
 tgtttctgat cagatgatgc aagacycaac ggaccgcyg gtycgggcyg cgcctgcagag 16440
 ccagcgtcc ggccttaact ccacygagca ctggcgcag gtcatggacc gcatcatgtyc 16500
 gctgactgcy cycaatcctg acgcyttccg gcacygccc caggccaacc ggctctccgc 16560
 aattctggaa gcygtygtcc cggcygcygcy aaaccccacy cacgagaagg tyctggcgat 16620
 cgtaaacyg cygcccgaaa acagggccat ccggcccgac gaggccggcc tygtctacya 16680
 cgcgctgctt cagcygctgg ctcggtacaa cagcggcaac gtycagacca acctggaccg 16740
 gctggtgggg gatgtgcygcy aggcctggc gcacygctgag cgcgcygcyg agcagggcaa 16800
 cctgggctcc atggttycacy taaacycctt cctgagtyca cagcccgcga acgtgcccgy 16860
 gggacygag gactacacca actttgtgag cgcactgcyg ctaatgtyga ctgagacyc 16920
 gcaaatgag gtygtaccagt ctggccaga ctatTTTTT cagaccagty gacaaggcct 16980
 gcagaccgtyaacctgagcc agcctttcaa aaacttycag gggctgtygg ggytycggggc 17040
 tcccacygc gaccgcygcy ccygtgctag cttgctgacy cccaactcgc gcctgtygct 17100
 gctgctaaata gcycccttca cggacygtyg cacygtytcc cgggacycat acctagtyca 17160
 cttgctgaca ctgtaccgy aggcctag tyagcgcct gtygacygcy atactttcca 17220
 ggagattaca agtytcagcc gcygcytgg gcaggygcy acgggcygcy tygaggycaa 17280

ES 2 531 522 T3

cctaaactac ctgctgacca accggcggca gaagatcccc tcgttgcaca gtttaaacag 17340
 cgaggaggag cgcattttgc gctacgtgca gcagagcgtg agccttaacc tgatgcgcga 17400
 cggggtaacg cccagcgtgg cgctggacat gaccgcgcgc aacatggaac cgggcatgta 17460
 tgcctcaaac cggccgttta tcaaccgcct aatggactac ttgcatcgcg cggccgcct 17520
 gaaccccgag tatttcacca atgccatctt gaacccgcac tggctaccgc cccctggttt 17580
 ctacaccggg ggattcgagg tgcccgaggg taacgatgga ttcctctggg acgacataga 17640
 cgacagcgtg ttttccccgc aaccgcagac cctgctagag ttgcaacagc gcgagcaggc 17700
 agaggcggcg ctgcgaaagg aaagcttccg caggccaagc agcttgtccg atctaggcgc 17760
 tgcgcccccg cggtcagatg ctagtagccc atttccaage ttgatagggt ctcttaccag 17820
 cactcgcacc acccgccccg cctgctggg cgaggaggag tacctaaaca actcgtctgt 17880
 gcagccgcag cgcgaaaaaa acctgcctcc ggcatttccc aacaacggga tagagagcct 17940
 agtggacaag atgagtagat ggaagacgta cgcgcaggag cacagggacg tgccaggccc 18000
 gcgcccgcc acccgtcgtc aaaggcacga ccgtcagcgg ggtctggtgt gggaggacga 18060
 tgactcggca gacgacagca gcgtcctgga tttgggaggg agtggcaacc cgtttgcgca 18120
 cettcgcccc aggctgggga gaatgttta aaaaaaaaaa aagcatgatg caaaataaaa 18180
 aactaccaa ggccatggca ccgagcgttg gttttcttgt attcccctta gtatgcggcg 18240
 cgcggcgatg tatgaggaag gtctctctcc ctccctacgag agtgtggtga gcgcggcgcc 18300
 agtggcggcg gcgctgggtt ctcccttoga tgctcccctg gacccgccgt ttgtgcctcc 18360
 gcggtacctg cggcctaccg gggggagaaa cagcatccgt tactctgagt tggcacccct 18420
 attcgacacc acccgtgtgt acctggtgga caacaagtca acggatgtgg catccctgaa 18480
 ctaccagaac gaccacagca actttctgac cacggtcatt caaaacaatg actacagccc 18540
 gggggaggca agcacacaga ccatcaatct tgacgaccgg tcgcactggg gcggcgacct 18600
 gaaaaccatc ctgcatacca acatgccaaa tgtgaacgag ttcattgtta ccaataagtt 18660
 taaggcgcgg gtgatgggtg cgcgcttgcc tactaaggac aatcaggtgg agctgaaata 18720
 cgagtgggtg gagttcacgc tgcccgaggg caactactcc gagaccatga ccatagacct 18780
 tatgaacaac gcgatcgtgg agcactactt gaaagtgggc agacagaacg gggttctgga 18840
 aagcgacatc ggggtaaagt ttgacaccgc caacttcaga ctggggtttg acccgtcac 18900
 tggctctgtc atgcctgggg tatatacaaa cgaagccttc catccagaca tcattttgct 18960
 gccaggatgc ggggtggact tcaccacag ccgcctgagc aacttggtgg gcatccgcaa 19020
 gcggcaacc ttccaggagg gctttaggat cacctacgat gatctggagg gtggtaacat 19080

ES 2 531 522 T3

tcccgcactg ttggatgtgg acgcctacca ggcgagcttg aaagatgaca ccgaacaggg 19140
 cgggggtggc gcaggcggca gcaacagcag tggcagcggc gcggaagaga actccaacgc 19200
 ggcagccgcg gcaatgcagc cggcggagga catgaacgat catgccattc gggcgacac 19260
 ctttgccaca cgggctgagg agaagcgcgc tgaggcggaa gcagcggccg aagctgccgc 19320
 ccccgtgcg caacccgagg tcgagaagcc tcagaagaaa ccggtgatca aaccctgac 19380
 agaggacagc aagaaacgca gttacaacct aataagcaat gacagcacct tcaccagta 19440
 ccgcagctgg taccttgcat acaactacgg cgaccctcag accggaatcc gctcatggac 19500
 cotgctttgc actcctgacg taacctgagg ctccgagcag gtctactggt cgttgccaga 19560
 catgatgcaa gaccccgta cctccgctc cacgcgccag atcagcaact ttccggtggt 19620
 gggcgccgag ctggtgcccg tgcactccaa gagcttctac aacgaccagg ccgtctactc 19680
 ccaactcacc cgccagttta cctctctgac ccacgtgttc aatcctttc ccgagaacca 19740
 gatthttggc cgcccggcag ccccaccat caccaccgctc agtgaaaacg ttctctctct 19800
 cacagatcac gggacgctac cgctgcgcaa cagcatcgga ggagtccagc gagtgaccat 19860
 tactgacgcc agacgcccga cctgcccta cgtttacaag gccctgggca tagtctcgcc 19920
 gcgctccta tcgagccgca cttttgagc aagcatgtcc atccttatat cggccagcaa 19980
 taacacaggc tggggcctgc gttcccaag caagatgtht gggggggcca agaagcgtc 20040
 cgaccaacac ccagcgcgcg tgcgcgggca ctaccgcgcg ccctggggcg cgcacaaacg 20100
 cggccgcact gggcgccacca ccgtcgatga cgccatcgac gcggtggtgg aggaggcgcg 20160
 caactacagc cccacgcccgc caccagtgtc cacagtggac gggccattc agaccgtggt 20220
 gcgcgagacc cggcgctatg ctaaaatgaa gagacggcgg aggcgcgtag cacgtcgcca 20280
 ccgcccga cccggcactg ccgcccacg cgcggcggcg gccctgctta accgcccgcg 20340
 tcgcaccggc cgacggggcg ccattgcccgc cgtcgaagg ctggccgcg gtattgtcac 20400
 tgtgcccccc aggtccaggc gacgagcggc cgccgcagca gccgcgcca ttagtgctat 20460
 gactcagggt cgcaggggca acgtgtattg ggtgcgcgac tcggttagcg gcctgcgct 20520
 gcccgctgcg acccgcccc gcgcgaacta gattgcaaga aaaaactact tagactcgta 20580
 ctggtgatg tatccagcgg cggcggcgcg caacgaagct atgtccaagc gcaaaatcaa 20640
 agaagagatg ctccaggtca tcgcgcccga gatctatggc ccccgaaga aggaagagca 20700
 ggattacaag ccccgaagc taaagcgggt caaaaagaaa aagaaagatg atgatgatga 20760
 acttgacgac gaggtggaac tgctgcacgc taccgcgcc aggcgacggg tacagtggaa 20820
 aggtcgacgc gtaaacgtg ttttgcgacc cggcaccacc gtagtcttta cggccggtga 20880
 gcgctccacc cgcacctaca agcgcgtgta tgatgaggtg tacggcgacg aggacctgct 20940

ES 2 531 522 T3

tgagcaggcc aacgagcgc tggggagtt tgcctacgga aagcggcata aggacatgct 21000
 ggcgttgccg ctggacgagg gcaacccaac acctagccta aagcccgtaa cactgcagca 21060
 ggtgctgccc gcgcttgcac cgtccgaaga aaagcgcggc ctaaagcgcg agtctggtga 21120
 cttggcacc accgtgcagc tgatggtacc caagcgcag cgactggaag atgtcttgga 21180
 aaaaatgacc gtggaacctg ggctggagcc cgaggtccgc gtgcggccaa tcaagcagg 21240
 ggcgccggga ctgggcgtgc agaccgtgga cgttcagata cccactacca gtagcaccag 21300
 tattgccacc gccacagagg gcatggagac acaaacgtcc ccggttgccct cagcgggtggc 21360
 ggatgccgcg gtgcaggcgg tcgctgcggc cgcgtccaag acctctacgg aggtgcaaac 21420
 ggaccctgg atgtttcgcg tttcagcccc ccggcgcgcc cgccgttcga ggaagtacgg 21480
 cgcgccagc gcgctactgc ccgaatatgc cctacatcct tccattgcgc ctacccccgg 21540
 ctatcgtggc tacacctacc gccccagaag acgagcaact acccgacgcc gaaccaccac 21600
 tggaacccgc cgcgcgcgtc gcgctcgcca gcccggtgct gccccgattt ccgtgcgcag 21660
 ggtggctcgc gaaggaggca ggaccctggt gctgccaaca gcgcgctacc accccagcat 21720
 cgtttaaag ccggtctttg tggttcttgc agatatggc ctcacctgce gcctccgttt 21780
 cccggtgccg ggattccgag gaagaatgca ccgtaggagg ggcatggccg gccacggcct 21840
 gacgggcggc atgcgtcgtg cgcaccaccg gcggcggcgc gcgtgcacc gtcgcatgcg 21900
 cggcggatc ctgcccctcc ttattccact gatcgcgcgc gcgattggcg ccgtgcccgg 21960
 aattgcatcc gtggccttgc aggcgcagag aactgatta aaaacaagtt gcatgtggaa 22020
 aatcaaaat aaaaagtctg gactctcacg ctcgcttggc cctgtaacta tttttagaa 22080
 tggaagacat caactttgcg tctctggccc cgcgacacgg ctgcgcgccg ttcattggaa 22140
 actggcaaga tatcggcacc agcaatatga gcggtggcgc cttcagctgg ggctcgcgtg 22200
 ggagcggcat taaaaattc ggttccaccg ttaagaacta tggcagcaag gcctggaaca 22260
 gcagcacagg ccagatgctg agggataagt tgaaagagca aaatttccaa caaaagggtg 22320
 tagatggcct ggctctggc attagcgggg tgggtggacct ggccaaccag gcagtgcaaa 22380
 ataagattaa cagtaagctt gateccccgc ctcctgtaga ggagcctcca ccggccgtgg 22440
 agacagtgtc tccagagggg cgtggcgaaa agcgtccgc ccccgacagg gaagaaactc 22500
 tggtagcga aatagacgag cctccctcgt acgaggaggc actaaagcaa ggctgccc 22560
 ccaccgtcc catcgcgcc atggctaccg gactgctggg ccagcacaca cccgtaacgc 22620
 tggacctgce tcccccgcc gacacceage agaaacctgt gctgccaggc ccgaccgccg 22680
 ttgttgaac ccgtcctage cgcgcgtccc tgcgcgcgc gccagcggc ccgcgatcgt 22740

ES 2 531 522 T3

tgcggcccgt agccagtggc aactggcaaa gcacactgaa cagcatcgtg ggtctggggg 22800
 tgcaatccct gaagcgccga cgatgcttct gatagctaac gtgtcgtatg tgtgtcatgt 22860
 atgcgtccat gtcgcccga gaggagctgc tgagccgccg cgcgcccgt ttccaagatg 22920
 gctaccctt cgatgatgcc gcagtggctt tacatgcaca tctcgggcca ggacgcctcg 22980
 gagtacctga gccccgggct ggtgcagttt gcccgcgcca ccgagacgta cttcagcctg 23040
 aataacaagt ttagaaacct cacgggtggcg cctacgcacg acgtgaccac agaccggctc 23100
 cagcgtttga cgctgcggtt catccctgtg gaccgtgagg atactgcgta ctcgtacaag 23160
 ggcggttca ccctagctgt gggtgataac cgtgtgctgg acatggcttc cacgtacttt 23220
 gacatccgcg gcgtgctgga caggggcccct acttttaagc cctactctgg cactgcctac 23280
 aacgccttgg ctcccagggt tgccccaaat ccttgcgat gggatgaagc tgctactgct 23340
 cttgaaataa acctagaaga agaggacgat gacaacgaag acgaagtaga cgagcaagct 23400
 gaggcagcaa aaactcacgt atttgggcag gcgccttatt ctggtataaa tattacaaag 23460
 gagggtattc aaataggtgt cgaagggtcaa acacctaaat atgccgataa aacatttcaa 23520
 cctgaacctc aaataggaga atctcagtggt tacgaaacag aaattaatca tgcagctggg 23580
 agagtcctaa aaaagactac cccaatgaaa ccatgttacg gttcatatgc aaaaccaca 23640
 aatgaaaatg gagggcaagg cattcttgta aagcaacaaa atggaaagct agaaagtcaa 23700
 gtggaaatgc aatttttctc aactactgag gcagccgcag gcaatggtga taacttgact 23760
 cctaaagtgg tattgtacag tgaagatgta gatatagaaa cccagacac tcatatttct 23820
 tacatgcccc ctattaagga aggtaactca cgagaactaa tgggccaaca atctatgccc 23880
 aacaggccta attacattgc ttttagggac aattttattg gtctaatgta ttacaacagc 23940
 acgggtaata tgggtgttct ggcgggcca gcatcgcagt tgaatgctgt tgtagatttg 24000
 caagacagaa acacagagct ttcataccag cttttgcttg attccattgg tgatagaacc 24060
 aggtactttt ctatgtggaa tcaggctggt gacagctatg atccagatgt tagaattatt 24120
 gaaaatcatg gaactgaaga tgaacttcca aattactgct ttccactggg aggtgtgatt 24180
 aatacagaga ctcttaccaa ggtaaacct aaaacaggtc aggaaaatgg atgggaaaaa 24240
 gatgctacag aattttcaga taaaaatgaa ataagagttg gaaataattt tgccatggaa 24300
 atcaatctaa atgccaacct gtggagaaat ttctgtact ccaacatagc gctgtatttg 24360
 cccgacaagc taaagtacag tccttccaac gtaaaaattt ctgataaacc aaacacctac 24420
 gactacatga acaagcgagt ggtggctccc gggctagtgg actgctacat taaccttggg 24480
 gcacgctggt cccttgacta tatggacaac gtcaaccat ttaaccacca ccgcaatgct 24540
 ggctgcgct accgctcaat gttgctgggc aatggctcgt atgtgccctt ccacatccag 24600

ES 2 531 522 T3

gtgcctcaga agttctttgc cattaanaaac ctccctctcc tgccgggctc atacacctac 24660
 gagtggaact tcaggaagga tgtaacatg gttctgcaga gctccctagg aaatgacct 24720
 agggttgacg gagccagcat taagtttgat agcatttgcc tttacgccac cttcttcccc 24780
 atggcccaca acaccgctc cacgcttgag gccatgctta gaaacgacac caacgaccag 24840
 tcctttaacg actatctctc cgccgccaac atgctctacc ctatacccg ccaacgctacc 24900
 aacgtgccc aatccatccc ctcccgaac tggggggctt tccgcggtg ggcttcacg 24960
 cgccttaaga ctaaggaaac cccatcactg ggctcgggct acgacctta ttacacctac 25020
 tctggctcta taccctacct agatggaacc ttttacctca accacacct taagaagggtg 25080
 gccattacct ttgactcttc tgtcagctgg cctggcaatg accgctgct tcccccaac 25140
 gagtttgaaa ttaagcgctc agttgacggg gaggggtaca acgttgccc gtgtaacatg 25200
 accaaagact ggttcctggt acaaatgcta gctaactata acattggcta ccagggcttc 25260
 tatatcccag agagctacaa ggaccgcatg tactccttct ttagaaaactt ccagcccag 25320
 agccgtcagg tgggtgatga tactaaatac aaggactacc aacagggtgg catcctacac 25380
 caacacaaca actctggatt tgttggttac cttgccccca ccatgcgcga aggacaggcc 25440
 taccctgcta acttccccta tccgcttata ggcaagaccg cagttgacag cattaccag 25500
 aaaaagtttc tttgcgatcg cacccttgg cgcacccat tctccagtaa ctttatgtcc 25560
 atggggcgac tcacagacct gggccaaaac cttctctacg ccaactccgc ccacgcgcta 25620
 gacatgactt ttgaggtgga tcccatggac gagcccacc tctcttatgt tttgtttgaa 25680
 gtctttgacg tggtcctgtg gcaccagccg caccgcggcg tcatcgaaac cgtgtacctg 25740
 cgcacgacct tctcggcgg caacgccaca acataaagaa gcaagcaaca tcaacaacag 25800
 ctgccgcat gggctccagt gagcaggaac tgaaagccat tgtcaaagat cttgggtgtg 25860
 ggccatattt tttgggcacc tatgacaagc gctttccagg ctttgttctt ccacacaagc 25920
 tcgcctgcgc catagtcaat acggccggtc gcgagactgg gggcgtacac tggatggcct 25980
 ttgcctggaa cccgcactca aaaacatgct acctcttga gcccttggc ttttctgacc 26040
 agcgactcaa gcaggtttac cagtttgagt acgagtcact cctgcgcctg agcgccattg 26100
 cttcttcccc cgaccgctgt ataacgctgg aaaagtccac ccaaagcgta caggggccc 26160
 actcggccgc ctgtggacta ttctgctgca tgtttctcca cgccttggc aactggcccc 26220
 aaactcccat ggatcacaac cccaccatga acctattac cggggtaccc aactccatgc 26280
 tcaacagtcc ccaggtacag cccaccctgc gtcgcaacca ggaacagctc tacagcttcc 26340
 tggagcgcca ctgcacctac ttcgcagcc acagtgcga gattaggagc gccacttctt 26400

ES 2 531 522 T3

tttgtcactt gaaaaacatg taaaaataat gtactagaga cactttcaat aaaggcaaat 26460
 gcttttattt gtacactctc ggggtgattat ttacccccac ccttgccgtc tgcgccggtt 26520
 aaaaatcaaa ggggttctgc cgcgcacgc tatgcccac tggcagggac acgttgcgat 26580
 actgggtggtt agtgctccac ttaaaactcag gcacaacat cgcggcagc tccggtgaagt 26640
 tttcactcca caggctgogc accatcacca acgcgtttag caggctgggc gccgatatct 26700
 tgaagtgcga gttggggcct cgcacctgcg cgcgcgagtt gcgatacaca gggttgcagc 26760
 actggaacac tatcagcgcg ggggtgggca cgctggccag cacgctcttg tccgagatca 26820
 gatccgcgtc caggctctcc gcgttgctca gggcgaacgg agtcaacttt ggtagctgcc 26880
 ttccccaaaa gggcgcgctg ccaggctttg agttgcactc gcaccgtagt ggcatcaaaa 26940
 ggtgaccgtg cccggctctg gcgttaggat acagcgcctg cataaaagcc ttgatctgct 27000
 taaaagccac ctgagccttt gcgcctcag agaagaacat gccgaagac ttgccggaaa 27060
 actgattggc cggacaggcc gcgtcgtgca cgcagcacct tgcgtcggtg ttggagatct 27120
 gcaccacatt tccgccccac cggttcttca cgatcttggc cttgctagac tgctccttca 27180
 gcgcgcgctg cccgttttcg ctgctcacat ccatttcaat cacgtgctcc ttatttatca 27240
 taatgcttcc gtgtagacac ttaagctgcg ctctgatctc agcgcagcgg tgcagccaca 27300
 acgcgcagcc cgtgggctcg tgatgcttgt aggtcacctc tgcaaacgac tgcaggtacg 27360
 cctgcaggaa tcccccac atcgtcacia aggtcttgtt gctggtgaag gtcagctgca 27420
 acccgcggtg ctctctgctc agccaggctc tgcatacggc cgcagagct tccacttggc 27480
 caggcagtag tttgaagttc gcctttagat cgttatccac gtggtacttg tccatcagcg 27540
 cgcgcgcagc ctccatgccc ttctcccacg cagacacgat cggcacactc agcgggttca 27600
 tcaccgtaat ttcactttcc gcttcgctgg gctcttctc ttctcttgc gtccgcatac 27660
 cacgcgccac tgggtcgtct tcattcagcc gccgcactgt gcgcttacct cctttgccat 27720
 gcttgattag caccgggtgg ttgctgaaac ccaccattg tagcgcacaa tcttctcttt 27780
 ctctctgct gtccacgatt acctctggtg atggcggggc ctccgggctg ggagaagggc 27840
 gcttcttttt cttcttgggc gcaatggcca aatccgcgc cagagctgat ggccgcgggc 27900
 tgggtgtgcg cggcaccagc gcgtcttggt atgagtctc ctgctctcgc gactcgatac 27960
 gccgcctcat ccgctttttt gggggcgcgc ggggagggcg cggcgacggg gacggggacg 28020
 acacgtctc catggttggg ggacgtcgcg ccgcaccgcg tccgcgctcg ggggtggttt 28080
 cgcgctgctc ctcttcccga ctggccattt ccttctcta taggcagaaa aagatcatgg 28140
 agtcagtega gaagaaggac agcctaaccg cccctctga gttcgcacc accgcctcca 28200
 ccgatgccg caacgcgcct accaccttc ccgtcaggg acccccgctt gaggaggagg 28260

ES 2 531 522 T3

aagtgattat cgagcaggac ccaggttttg taagcgaaga cgacgaggac cgctcagtac 28320
caacagagga taaaaagcaa gaccaggaca acgcagagggc aaacgaggaa caagtcgggc 28380
ggggggacga aaggcatggc gactacctag atgtgggaga cgacgtgctg ttgaagcatc 28440
tgcagcgcca gtgcgccatt atctgcgacg cgttgcaaga ggcgagcgat gtgcccctcg 28500
ccatagcgga tgtcagcctt gcctacgaac gccacctatt ctcaccgcgc gtacccccca 28560
aacgccaaga aaacggcaca tgcgagccca acccgcgct caacttctac cccgtatttg 28620
ccgtgccaga ggtgcttgcc acctatcaca tctttttcca aaactgcaag ataccctat 28680
cctgccgtgc caaccgcagc cgagcggaca agcagctggc cttgcggcag ggcgctgtca 28740
tacctgatat cgctcgcctc aacgaagtgc caaaaatctt tgagggctt ggacgcgacg 28800
agaagcgcgc ggcaaacgct ctgcaacagg aaaacagcga aatgaaagt cactctggag 28860
tgttggtgga actcgagggg gacaacgcgc gcctagccgt actaaaacgc agcatcgagg 28920
tcaccactt tgcctaccg gacttaacc tccccccaa ggtcatgagc acagtcatga 28980
gtgagctgat cgtgcgccgt gcgagcccc tggagagggg tgcaaattg caagaacaaa 29040
cagaggaggg cctaccgca gttggcgacg agcagctagc gcgctggctt caaacgcgcg 29100
agcctgccga cttggaggag cgacgcaaac taatgatggc cgagtgctc gttaccgtgg 29160
agcttgagtg catgcagcgg ttctttgctg acccgagat gcagcgaag ctagaggaaa 29220
cattgacta cacctttcga cagggtacg tacgccaggc ctgcaagatc tccaacgtgg 29280
agctctgcaa cctggtctcc taccttgaa ttttgacga aaaccgcctt ggcaaaaacg 29340
tgcttcattc cacgctcaag ggcgagggc gccgcgacta cgtccgcgac tgcgtttact 29400
tatttctatg ctacacctg cagacggcca tgggcgtttg gcagcagtc ttggaggagt 29460
gcaacctcaa ggagctgcag aaactgctaa agcaaaactt gaaggaccta tggacggcct 29520
tcaacgagcg ctccgtggcc gcgcacctg cggacatcat ttccccgaa cgctgctta 29580
aaacctgca acaggtctg ccagacttca ccagtcaaag catgttgag aactttagga 29640
actttatcct agagcgctca ggaatcttgc ccgccacctg ctgtgcactt cctagcgact 29700
ttgtgccc atagaccgc gaatgcctc cgccgctttg gggccactgc taccttctgc 29760
agctagccaa ctaccttgc taccactctg acataatgga agacgtgagc ggtgacggtc 29820
tactggagtg tcaactgctg tgcaacctat gcaccccgca ccgctcctg gtttgcaatt 29880
cgcagctgct taacgaaagt caaattatcg gtaccttga gctgcagggc ccctcgctg 29940
acgaaaagtc cgcggtccg gggttgaaac tcaactccgg gctgtggacg tcggcttacc 30000
ttcgcaaatt tgtacctgag gactaccag ccacagat taggttctac gaagaccaat 30060

ES 2 531 522 T3

cccgcccgcc taatgctggag cttaccgcoct gcgtcattac ccagggccac attcttggcc 30120
 aattgcaagc catcaacaaa gcccgccaaag agtttctgct acgaaagga cggggggttt 30180
 acttggacc cccagtcggc gaggagctca acccaatccc cccgccggc cagccctatc 30240
 agcagcagcc gcggggccctt gcttcccagg atggcaccca aaaagaagct gcagctgccc 30300
 ccgccacca cggacgagga ggaatactgg gacagtcagg cagaggaggt tttggacgag 30360
 gaggaggagg acatgatgga agactgggag agcctagacg aggaagcttc cgaggtcgaa 30420
 gaggtgtcag acgaaacacc gtcaccctcg gtcgcattcc cctcgccggc gccccagaaa 30480
 tcggcaaccg gttccagcat ggctacaacc tccgctcctc aggcgccgcc ggcaactgcc 30540
 gttcgccgac ccaaccgtag atgggacacc actggaacca gggccggtaa gtccaagcag 30600
 ccgccgcgt tagcccaaga gcaacaacag cgccaaggct accgctcatg gcgcgggcac 30660
 aagaacgcca tagttgcttg cttgcaagac tgtgggggca acatctcctt cggccggcgc 30720
 tttcttctct accatcacgg cgtggccttc ccccgtaaca tcttgatta ctaccgtcat 30780
 ctctacagcc catactgcac cggcggcagc ggcagcaaca gcagcggcca cacagaagca 30840
 aaggcgaccg gatagcaaga ctctgacaaa gcccaagaaa tccacagcgg cggcagcagc 30900
 aggaggagga gcgctgcgtc tggcgcccaa cgaaccgta tcgaccgcgc agcttagaaa 30960
 caggattttt cccactctgt atgctatatt tcaacagagc aggggccaag aacaagagct 31020
 gaaaataaaa aacaggtctc tgcgatccct cacccgcagc tgccctgtatc acaaaagcga 31080
 agatcagctt cggcgcacgc tggaaagcgc ggaggctctc ttcagtaaat actgcgcgct 31140
 gactottaag gactagtctc gcgccccttc tcaaattdaa gcgcgaaaac tacgtcatct 31200
 ccagcggcca caccggcgc cagcacctgt tgtcagcgc attatgagca aggaaattcc 31260
 cacgccctac atgtggagt accagccaca aatgggactt gcggctggag ctgcccaaga 31320
 ctactcaacc cgaataaact acatgagcgc gggaccccac atgatatccc ggggtcaacgg 31380
 aatacgcgc caccgaaacc gaattctctt ggaacaggcg gctattacca ccacacctc 31440
 taataacctt aatccccgta gttggcccgc tgccctgggtg taccaggaaa gtcccgtcc 31500
 caccactgtg gtacttcca gagacgcca ggcgaagtt cagatgacta actcagggc 31560
 gcagcttgcg ggcggcttc gtcacagggt gcggctgccc gggcagggtg taactcacct 31620
 gacaatcaga gggcgaggta ttcagctcaa cgacgagtcg gtgagctcct cgcttggctc 31680
 ccgtccggac gggacatttc agatcggcgg cgccggccgc tcttcattca cgctcgtca 31740
 ggcaatccta actctgcaga cctcgtcctc tgagccgcgc totggaggca ttggaactct 31800
 gcaatttatt gaggagtgtg tgccatcggc ctactttaa ccttctcgg gacctcccg 31860
 ccaactatcc gatcaattta ttcctaactt tgacgcggta aaggactcgg cggacggcta 31920

ES 2 531 522 T3

cgactgaatg ttaagtggag aggcagagca actgogcctg aaacacctgg tccactgtcg 31980
 ccgccacaag tgctttgccc gcgactccgg tgagttttgc tactttgaat tgccccgagga 32040
 tcatatcgag ggccccggcg acggcgctccg gcttaccgcc cagggagagc ttgccccgtag 32100
 cctgattcgg gagtttacc cagcgcctcc gctagttgag cgggacaggg gaccctgtgt 32160
 tctcactgtg atttgcaact gtcctaacc ttgattacat caagatctta ttccctttaa 32220
 ctaataaaaa aaaataataa agcatcactt acttaaaatc agttagcaaa tttctgtcca 32280
 gtttattcag cagcacctcc ttgcctcct cccagctctg gtattgcagc ttctctctgg 32340
 ctgcaaactt tctccacaat ctaaattgaa tgtcagtttc ctctgttcc tgtccatccg 32400
 caccactat cttcatgttg ttgcagatga agcgcgcaag accgtctgaa gataccttca 32460
 acccctgtga tccatatgac acggaaaccg gtcctccaac tgtgcctttt cttactcttc 32520
 cctttgtatc cccaatggg tttcaagaga gtccccctgg ggtactctct ttgcgcctat 32580
 ccgaacctct agttacctc aatggcatgc ttgcgctcaa aatgggcaac ggctctctc 32640
 tggacgaggg cggcaacctt acctcccaa atgtaaccac tgtgagccca cctctcaaaa 32700
 aaaccaagtc aaacataaac ctggaaatat ctgcaccct cacagttacc tcagaagccc 32760
 taactgtggc tgccgcccga cctctaattg tcgcgggcaa cacactcacc atgcaatcac 32820
 aggccccgct aaccgtgcac gactccaaac ttagcattgc cacccaagga cccctcacag 32880
 tgtcagaagg aaagctagcc ctgcaaacat caggccccct caccaccacc gatagcagta 32940
 cccttactat cactgcctca cccctctaa ctactgccac tggtagcttg ggcattgact 33000
 tgaaagagcc cattatata caaaatgaa aactaggact aaagtacggg gctcctttgc 33060
 atgtaacaga cgacctaac actttgaccg tagcaactgg tccaggtgtg actattaata 33120
 atacttctt gcaaactaaa gttactggag ccttgggttt tgattcacia ggcaatatgc 33180
 aacttaatgt agcaggagga ctaaggattg attctcaaaa cagacgcctt atacttgatg 33240
 ttagttatcc gtttgatgct caaaaccaac taaatctaag actaggacag ggcctcttt 33300
 ttataaactc agcccacaac ttggatatta actacaacia aggcctttac ttgtttacag 33360
 cttcaaaaaa ttccaaaaag cttgaggtta acctaacac tgccaagggg ttgatgtttg 33420
 acgctacagc catagccatt aatgcaggag atgggcttga atttggttca cctaattgcac 33480
 caaacacaaa tccctcaaa acaaaaattg gccatggcct agaatttgat tcaaacagg 33540
 ctatggttcc taaactagga actggcctta gttttgacag cacaggtgcc attacagtag 33600
 gaaacaaaaa taatgataag ctaactttgt ggaccacacc agctccatct cctaactgta 33660
 gactaaatgc agagaaagat gctaaactca ctttggctt aacaaaatgt ggcagtcaaa 33720

ES 2 531 522 T3

tacttgctac agtttcagtt ttggctgtta aaggcagttt ggctccaata tctggaacag 33780
 ttcaaagtgc tcatcttatt ataagatttg acgaaaatgg agtgctacta aacaattcct 33840
 tctgggacce agaattattgg aactttagaa atggagatct tactgaaggc acagcctata 33900
 caaacgctgt tggatttatg cctaacctat cagcttatcc aaaatctcac ggtaaaactg 33960
 ccaaaagtaa cattgtcagt caagtttact taaacggaga caaaactaaa cctgtaacac 34020
 taaccattac actaaacggg acacaggaaa caggagacac aactccaagt gcatacteta 34080
 tgtcattttc atgggactgg tctggccaca actacattaa tgaaatattt gccacatcct 34140
 cttacacttt ttcatacatt gcccaagaat aaagaatcgt ttgtgttatg tttcaacgtg 34200
 tttatttttc aattgcagaa aatttcaagt catttttcat tcagtagtat agccccacca 34260
 ccacatagct tatacagatc accgtacctt aatcaaactc acagaaccct agtattcaac 34320
 ctgccacctc cctcccaaca cacagagtac acagtccttt ctccccggct ggcttataaa 34380
 agcatcatat catgggtaac agacatattc ttaggtgtta tattccacac ggtttcctgt 34440
 cgagccaaac gctcatcagt gatattaata aactccccgg gcagctcact taagttcatg 34500
 tcgctgtcca gctgctgagc cacaggctgc tgtccaactt gcggttgctt aacggggcggc 34560
 gaaggagaag tccacgccta catgggggta gagtcataat cgtgcatcag gatagggcgg 34620
 tgggtgctgca gcagegcgcg aataaactgc tgccgcgcc gctccgtcct gcaggaatac 34680
 aacatggcag tgggtctctc agcgatgatt cgcaccgcc gcagcataag ggccttgtc 34740
 ctccgggcac agcagcgcac cctgatctca cttaaactcag cacagtaact gcagcacagc 34800
 accacaatat tgttcaaaat cccacagtgc aaggcgctgt atccaaagct catggcgggg 34860
 accacagaac ccacgtggcc atcataccac aagcgcagg agattaagtg gcgaccctc 34920
 ataaacacgc tggacataaa cattacctct tttggcatgt tgtaattcac cacctccgg 34980
 taccatataa acctctgatt aaacatggcg ccatccacca ccatcctaaa ccagctggcc 35040
 aaaacctgcc cgccggctat aactgcagg gaaccgggac tggaacaatg acagtggaga 35100
 gcccaggact cgtaaccatg gatcatcatg ctctcatga tatcaatgtt ggcacaacac 35160
 aggcacacgt gcatacactt cctcaggatt acaagctcct cccggttag aaccatatcc 35220
 caggaacaa cccattcctg aatcagcgt aatcccacac tgcaggaag acctcgcacg 35280
 taactcacgt tgtgcattgt caaagtgta cattcgggca gcagcggatg atcctccagt 35340
 atggtagcgc gggtttctgt ctcaaaagga ggtagacgat cctactgta cggagtgcgc 35400
 cgagacaacc gagatcgtgt tggtcgtagt gtcatgcaa atggaacgcc ggacgtagtc 35460
 atatttctg aagcaaaccc aggtgcgggc gtgacaaaca gatctcgtc tccggtctcg 35520
 ccgcttagat cgctctgtgt agtagttgta gtatatccac tctctcaaag catccaggcg 35580

ES 2 531 522 T3

cccctgggt tgggttcta tgtaaactcc ttcattgccc gctgccctga taacatccac 35640
 caccgcagaa taagccacac ccagccaacc tacacattcg ttctgagagt cacacacggg 35700
 aggagcggga agagctggaa gaacctggt ttttttttta ttccaaaaga ttatccaaaa 35760
 cctcaaaatg aagatctatt aagtgaacgc gctcccctcc ggtggcgtgg tcaaactcta 35820
 cagccaaaga acagataatg gcatttgtaa gatggtgcac aatggcttcc aaaaggcaaa 35880
 cgccctcac gtccaagtgg acgtaaaggc taaaccttc aggggaatc tcctctataa 35940
 acattccagc accttcaacc atgcccacat aattctcatc tcgccacctt ctcaatatat 36000
 ctctaagcaa atccogaata ttaagtccgg ccattgtaaa aatctgctcc agagcgcctt 36060
 ccacctcag cctcaagcag cgaatcatga ttgcaaaaat tcaggttcct cacagacctg 36120
 tataagattc aaaagcggaa cattaacaaa aataccgca tcccgtaggc cccttcgcag 36180
 ggccagctga acataatcgt gcaggtctgc acggaccagc gcggccactt ccccgccagg 36240
 aacctgaca aaagaacca cactgattat gacacgcata ctccggagcta tgctaaccag 36300
 cgtagccccg atgtaagctt gttgcatggg cggcgatata aaatgcaagg tgctgctcaa 36360
 aaaatcaggc aaagcctcgc gcaaaaaaga aagcacatcg tagtcatgct catgcagata 36420
 aaggcaggta agctccggaa ccaccacaga aaaagacacc atttttctct caaacatgct 36480
 tgccgggttc tgcataaaca caaaataaaa taacaaaaaa acatttaaac attagaagcc 36540
 tgtcttacia caggaaaaac aacccttata agcataagac ggactacggc catgccggcg 36600
 tgaccgtaaa aaaactggtc accgtgatta aaaagcacca ccgacagctc ctccggtcatg 36660
 tccggagtca taatgtaaga ctccgtaaac acatcagggt gattcacatc ggtcagtgct 36720
 aaaaagcagc cgaaatagcc cgggggaata catacccga ggcgtagaga caacattaca 36780
 gccccatag gaggtataac aaaattaata ggagagaaaa acacataaac acctgaaaaa 36840
 ccctcctgcc taggcaaaat agcacctcc cgctccagaa caacatacag cgcttcaca 36900
 gcggcagcca taacagtcag cttaccagt aaaaaagaaa acctatataa aaaacaccac 36960
 tcgacacggc accagctcaa tcagtcacag tgtaaaaaag ggccaagtgc agagcgagta 37020
 tatataggac taaaaaatga cgtaacgggt aaagtccaca aaaaacacc agaaaaccgc 37080
 acggaacct acgccagaa acgaaagcca aaaaaccac aacttctca aatcgteact 37140
 tccgttttc caggttacgt cacttccat tttaagaaaa ctacaattcc caacacatac 37200
 aagttactcc gccctaaaac ctacgtcacc cgccccgttc ccacgccccg cggcacgtca 37260
 caaactccac cccctcatta tcatattggc ttcaatccaa aataaggtat attattgatg 37320
 atg 37323

REIVINDICACIONES

1. Uso de células dendríticas modificadas por ingeniería *in vitro* que comprenden un vector para expresar de forma condicional una proteína que tiene la función de interleuquina-12 (IL-12) en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un tumor en un mamífero,
 5 Comprendiendo dicho vector un polinucleótido que codifica un conmutador génico, comprendiendo dicho conmutador génico
- (1) al menos una secuencia de factor de transcripción, en donde dicha al menos una secuencia de factor de transcripción codifica un factor de transcripción dependiente de ligando, unido de forma funcional a un promotor,
 10 y
 (2) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene la función de IL-12 unido a un promotor que es activado por dicho factor de transcripción dependiente de ligando,
- 15 en que dicho polinucleótido que codifica dicha proteína que tiene la función de IL-12 codifica una proteína que es al menos un 85 % idéntica a IL-12 humana de tipo silvestre, y en el que dicho ligando se tiene que administrar a las de 24 horas o menos después de la administración de dichas células y diariamente durante un periodo de 5 a 28 días.
- 20 2. El uso de la reivindicación 1, en el que dicho ligando se administra a las de 24 horas o menos después de la administración de dichas células y diariamente durante 14 días.
3. El uso de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en el que dicho vector es un vector adenoviral.
- 25 4. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho conmutador génico es un conmutador génico basado en receptor de ecdisona (EcR).
5. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho polinucleótido que codifica un conmutador génico comprende una primera secuencia de factor de transcripción y una segunda secuencia de factor de transcripción bajo el control de un promotor, en donde las proteínas codificadas por dicha primera secuencia de factor de transcripción y dicha segunda secuencia de factor de transcripción interactúan para formar un complejo proteico que funciona como factor de transcripción dependiente de ligando.
- 30 6. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho primer factor de transcripción y dicho segundo factor de transcripción están conectados por un sitio interno de entrada al ribosoma.
7. El uso de una de las reivindicaciones 4 a 6, en el que la primera secuencia de factor de transcripción comprende un ácido nucleico que codifica un dominio de transactivación VP-16 y una proteína de receptor X retinoico (RXR).
- 40 8. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en el que dicha segunda secuencia de factor de transcripción comprende un ácido nucleico que codifica un dominio de unión a ADN GAL-4 y proteína de receptor de ecdisona (EcR).
9. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho vector comprende adicionalmente un polinucleótido que codifica una proteína que tiene la función de IFN-alfa unido a un promotor que es activado por dicho factor de transcripción dependiente de ligando.
- 45 10. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho polinucleótido que codifica una proteína que tiene la función de IL-12 codifica IL-12 humana.
- 50 11. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dichas células modificadas por ingeniería *in vitro* son adecuadas para administración intratumoral, intraperitoneal o subcutánea.
- 55 12. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicho tumor es melanoma.
13. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que dicho ligando se selecciona entre el grupo que consiste en N-(1-etil-2,2-dimetilpropil)-N'-(2-metil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico, N-(1-terc-butil-butil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido (R)-3,5-dimetil-benzoico y N-(1-terc-butil-butil)-N'-(2-etil-3-metoxi-benzoil)-hidrazida del ácido 3,5-dimetil-benzoico.
- 60 14. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que dicha proteína que es al menos un 85 % idéntica a IL-12 humana de tipo silvestre es al menos un 90 % idéntica a IL-12 humana de tipo silvestre.
- 65 15. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que dicha proteína que es al menos un 85 % idéntica a IL-12 humana de tipo silvestre es al menos un 95 % idéntica a IL-12 humana de tipo silvestre.

16. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que dicha proteína que es al menos un 85 % idéntica a IL-12 humana de tipo silvestre es al menos un 99 % idéntica a IL-12 humana de tipo silvestre.

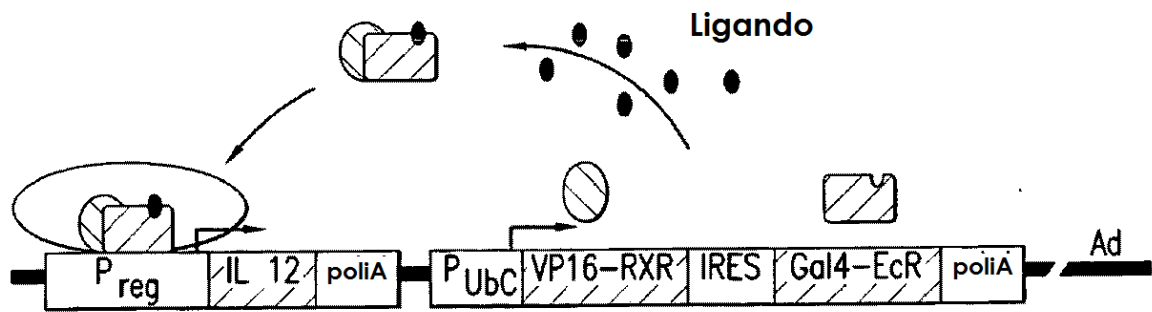


FIG. 1

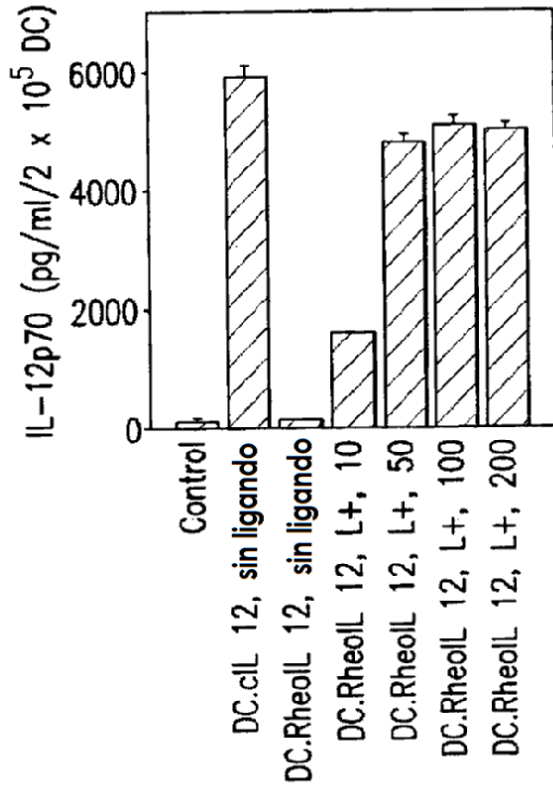


FIG. 2A

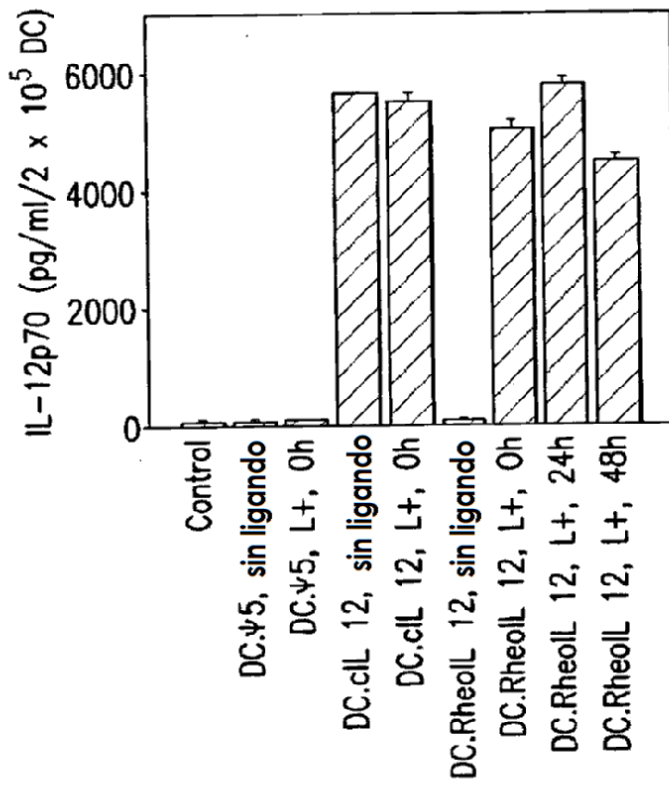


FIG. 2B

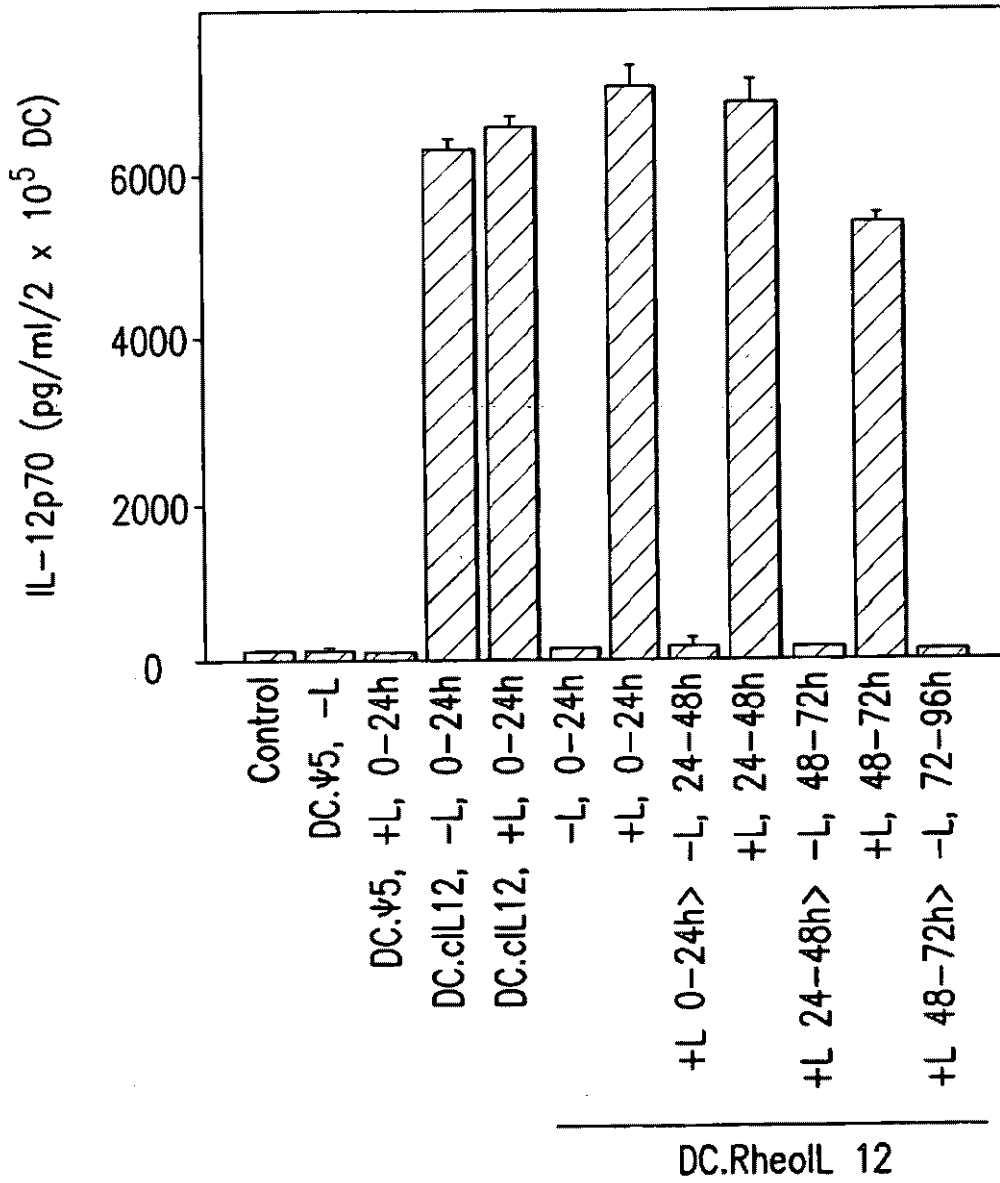


FIG. 2C

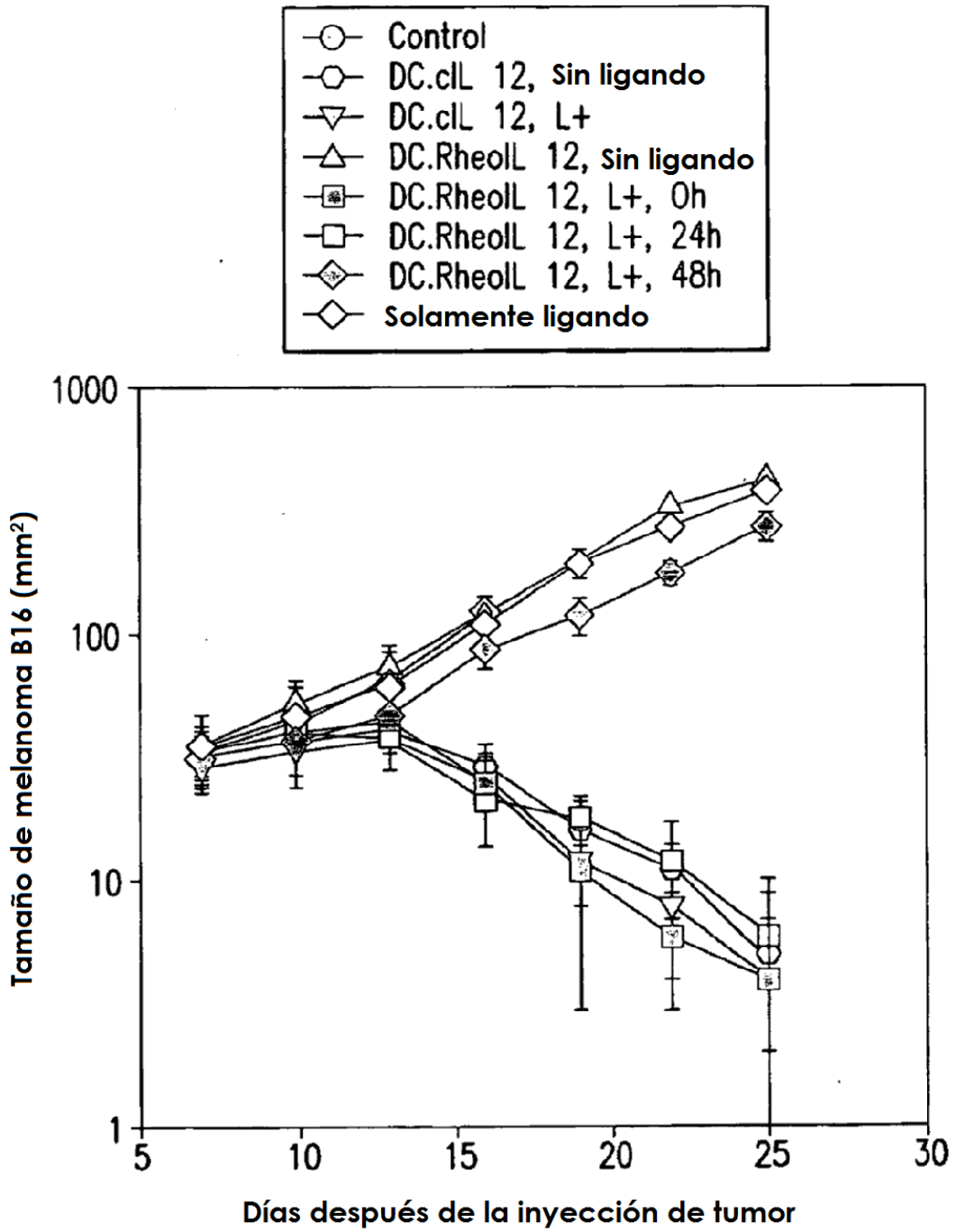


FIG.3A

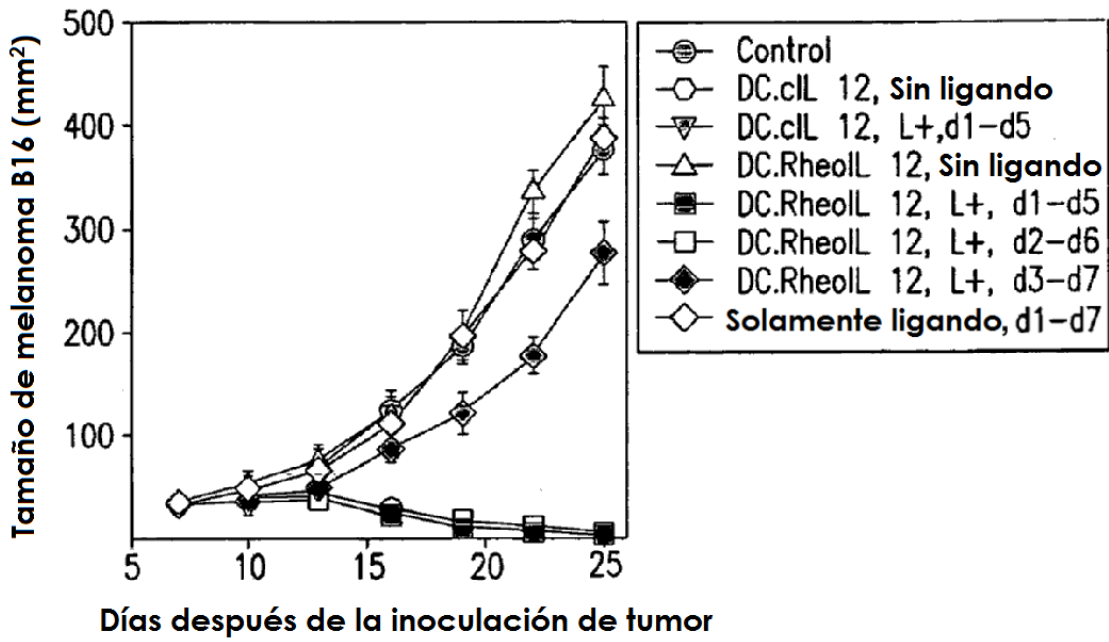


FIG. 3B

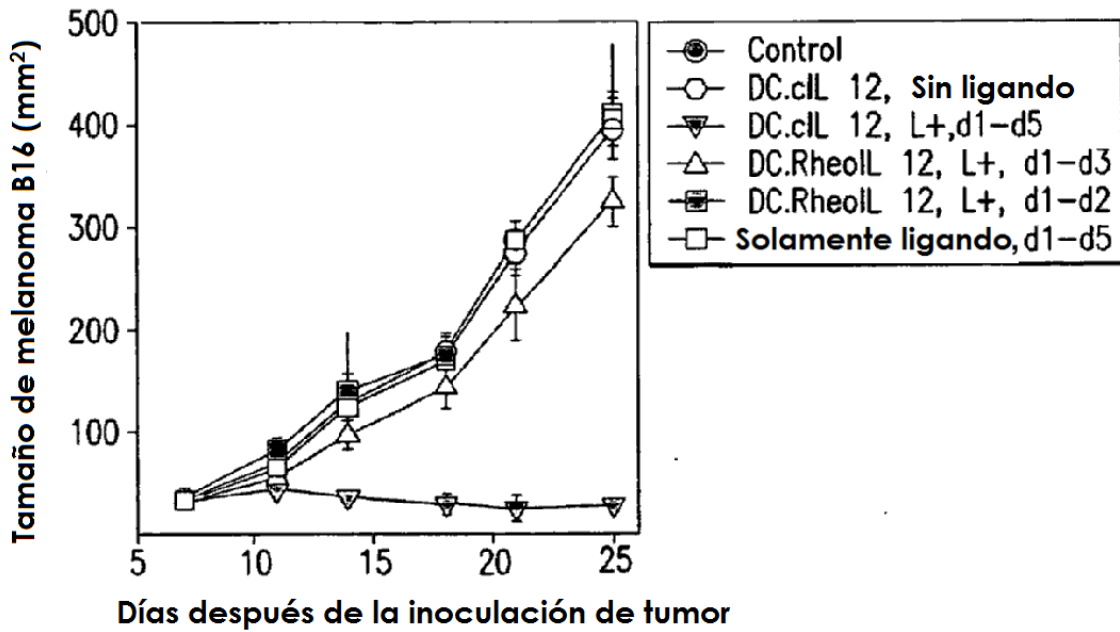


FIG. 3C

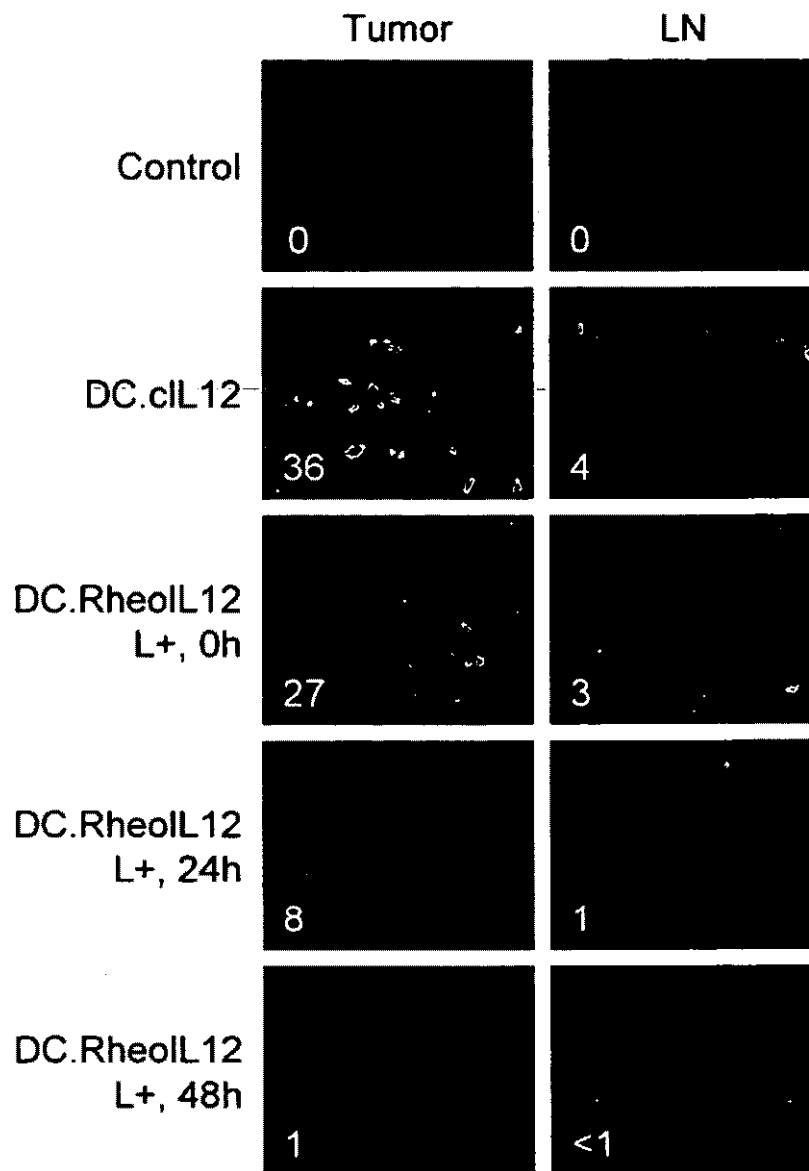


FIG.4

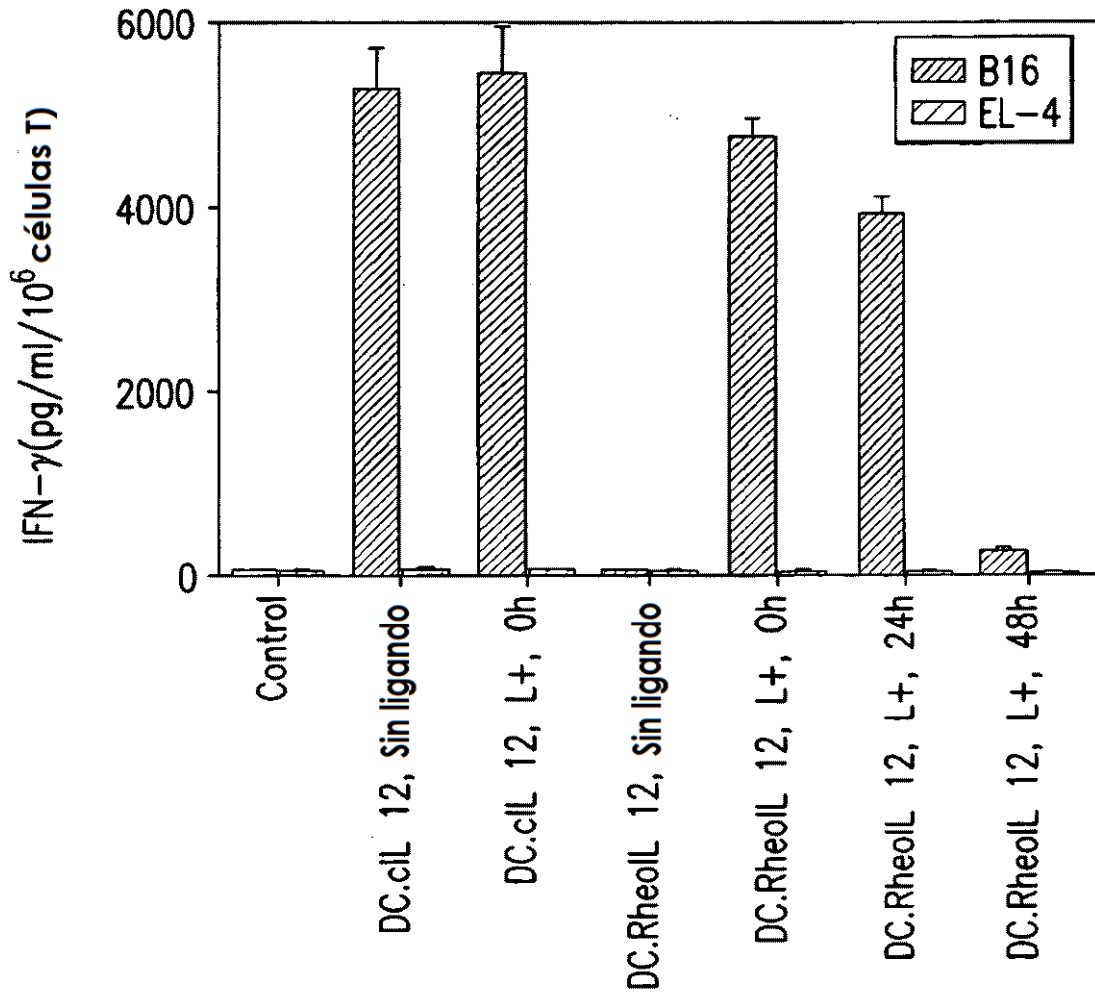


FIG.5A

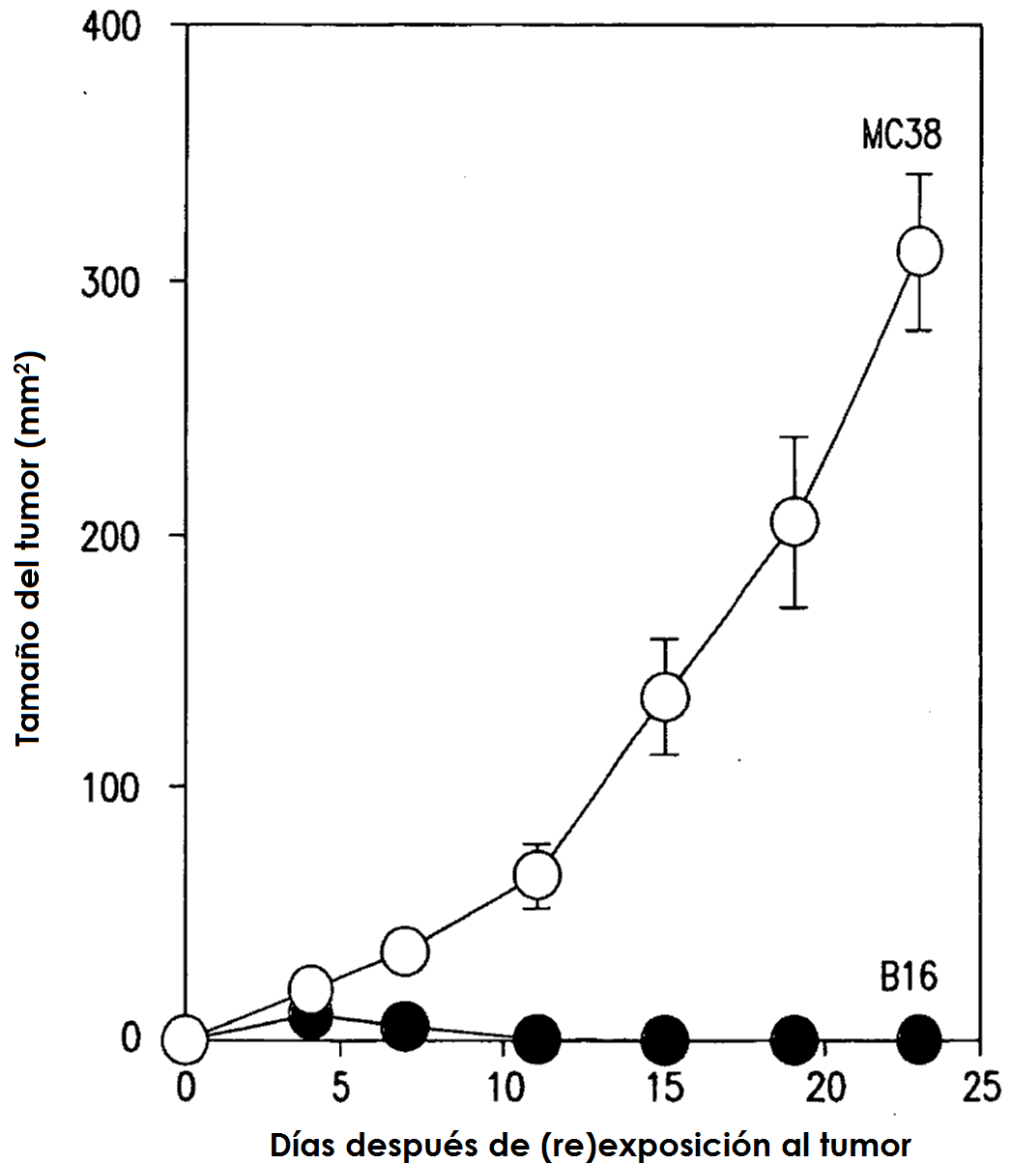


FIG.5B

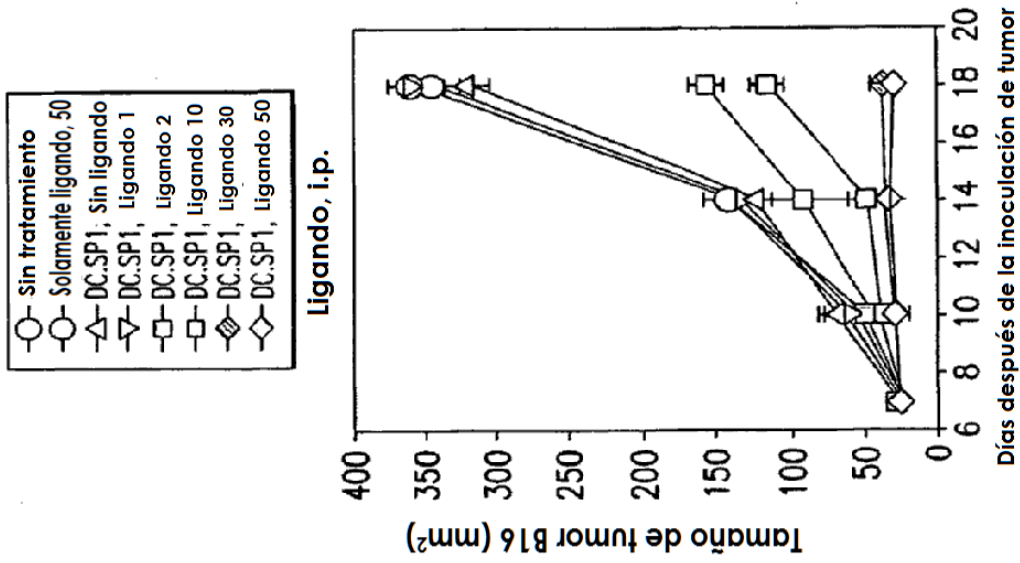


FIG. 6A

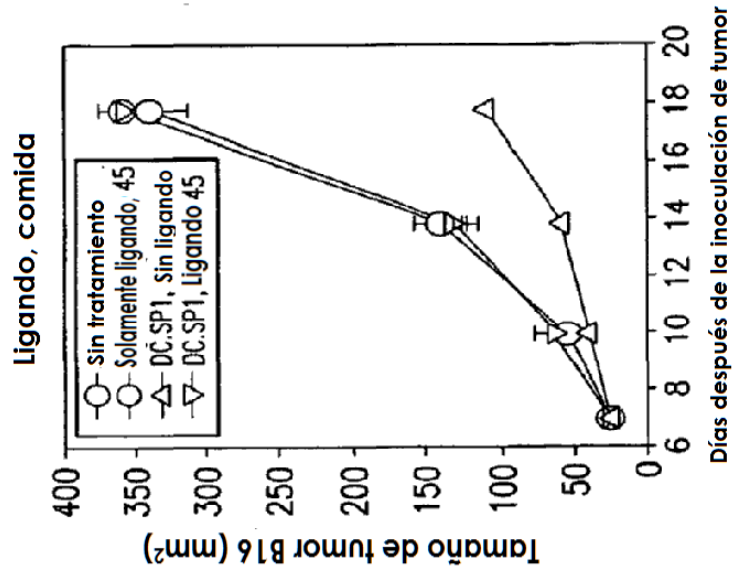


FIG. 6B

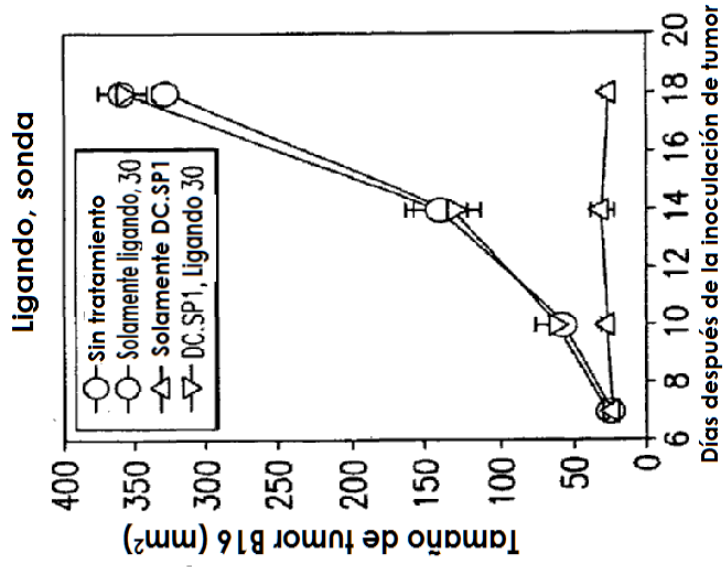


FIG. 6C

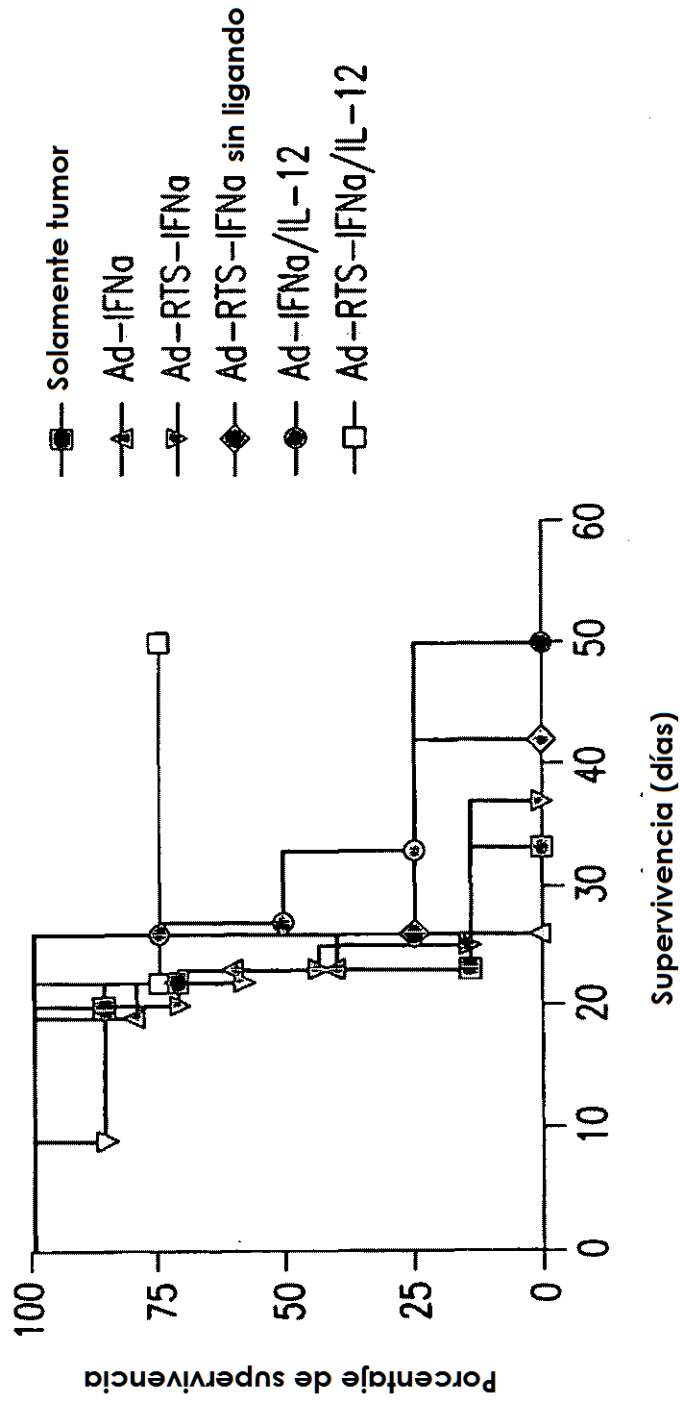


FIG.7

Adenovirus: Ad-RTS-hiL-12 (070108)

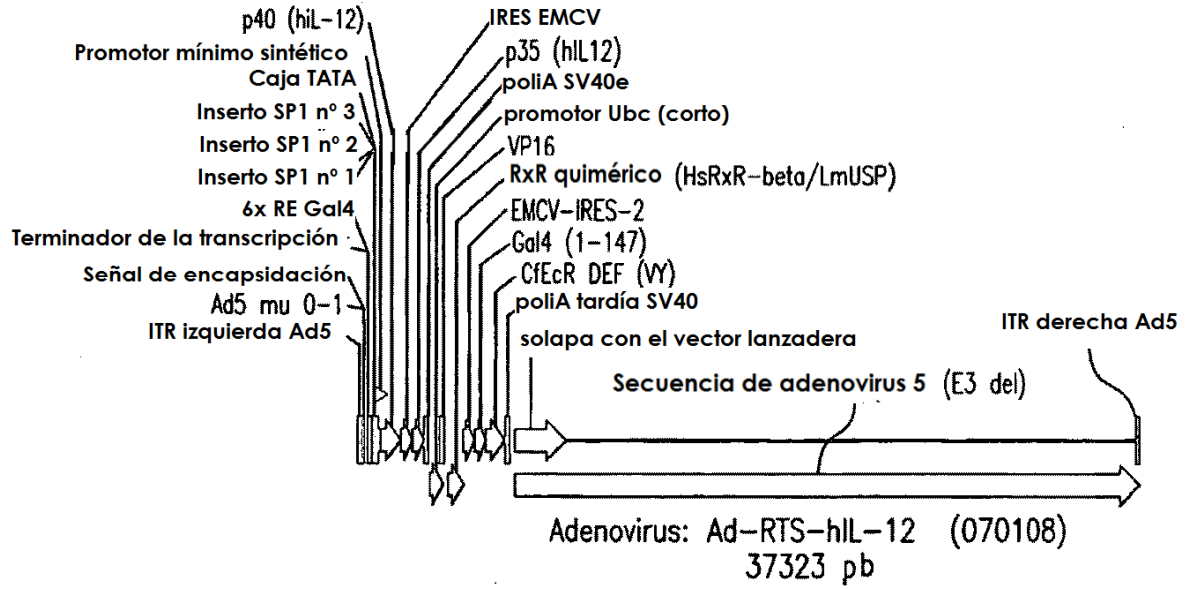
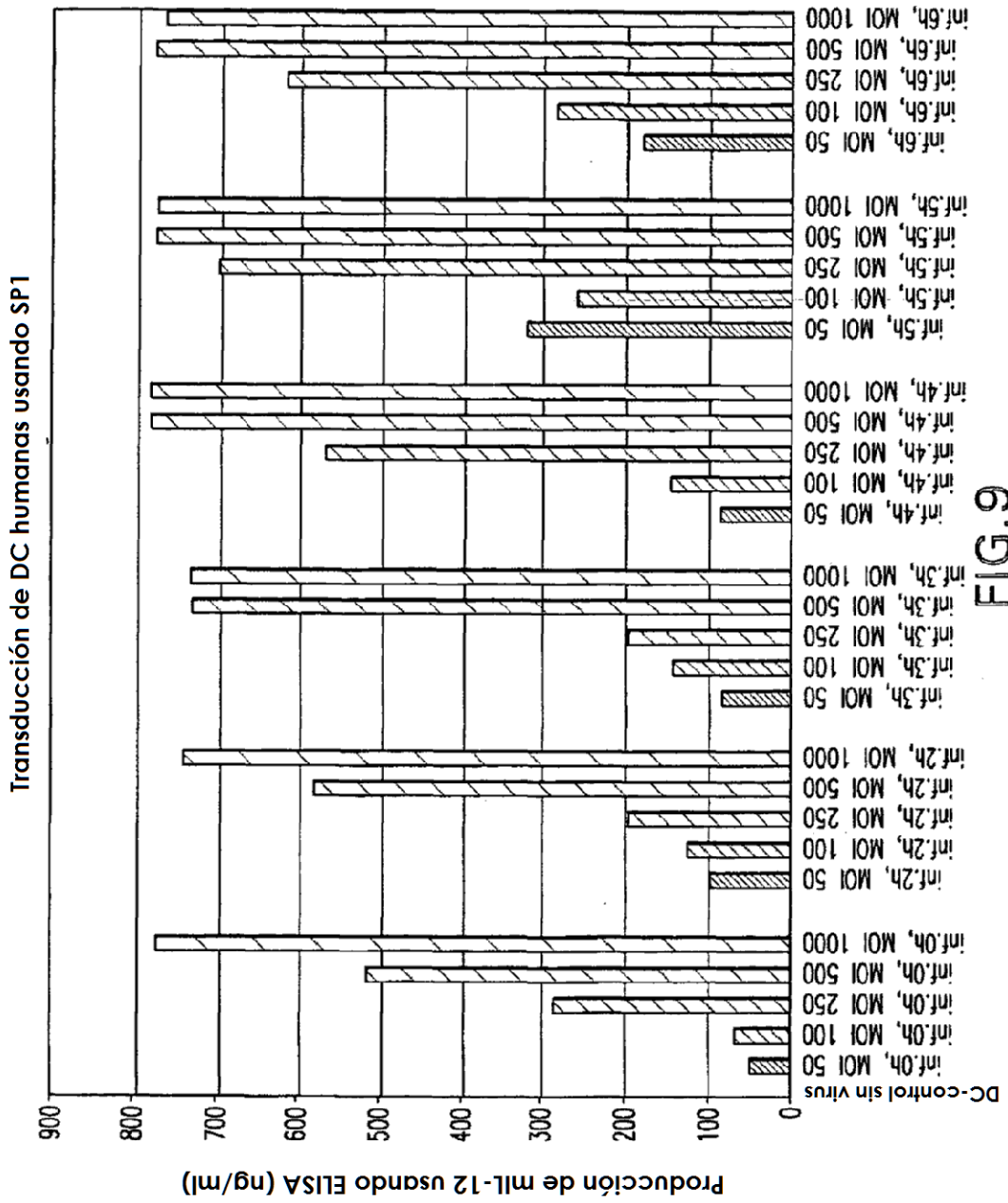


FIG.8



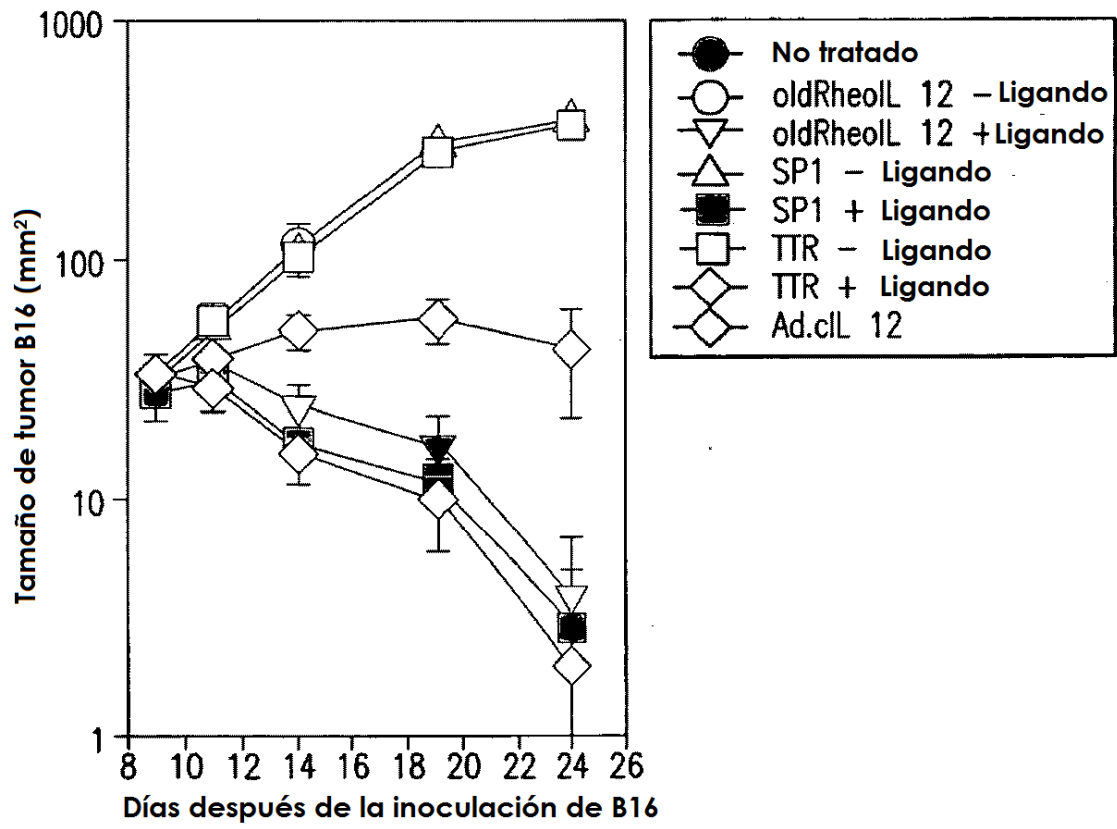


FIG. 10

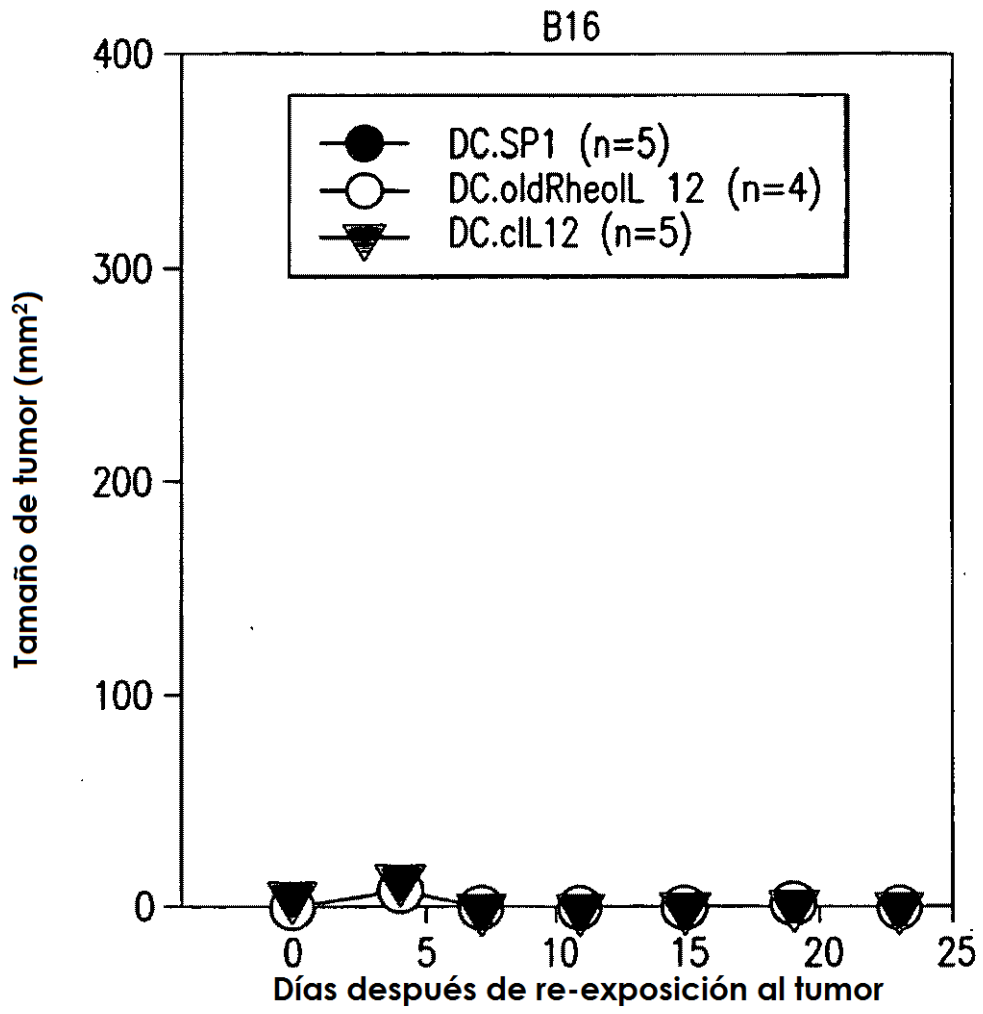


FIG. 11

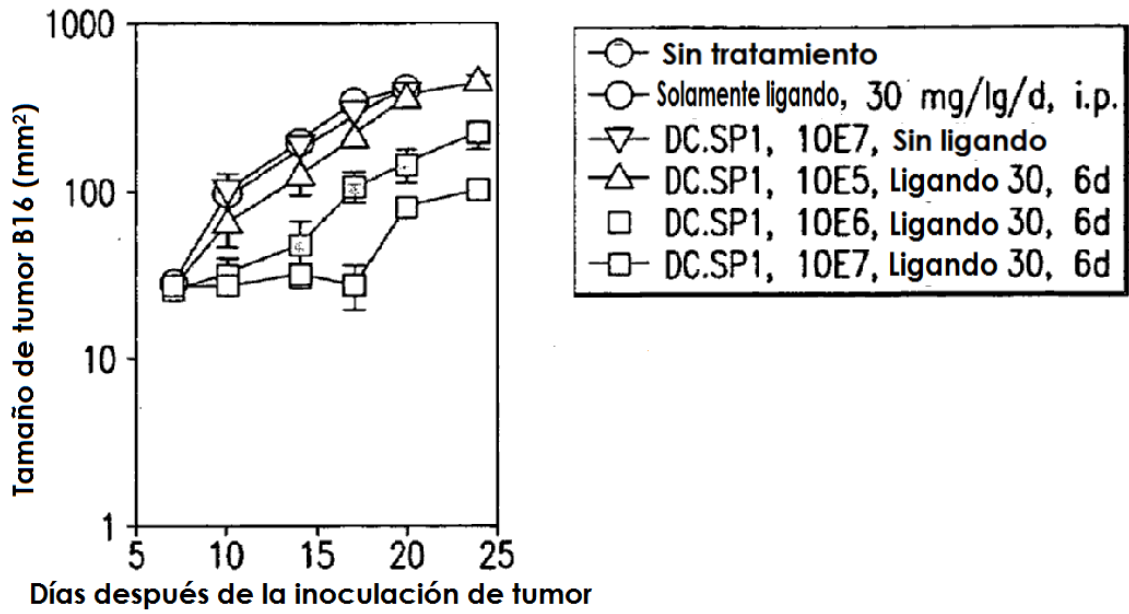


FIG. 12A

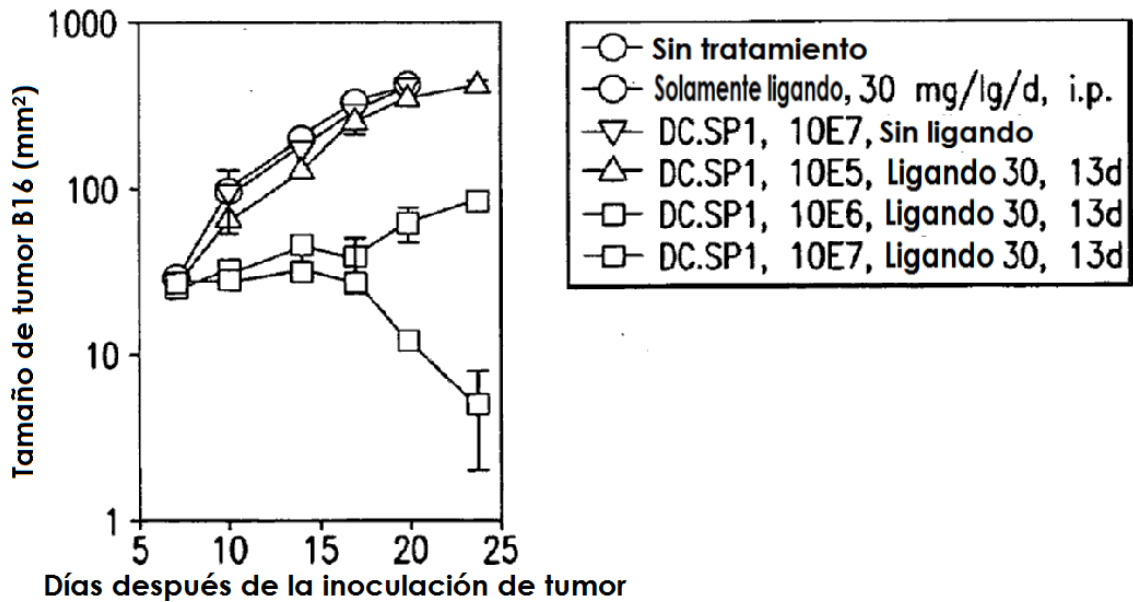


FIG. 12B

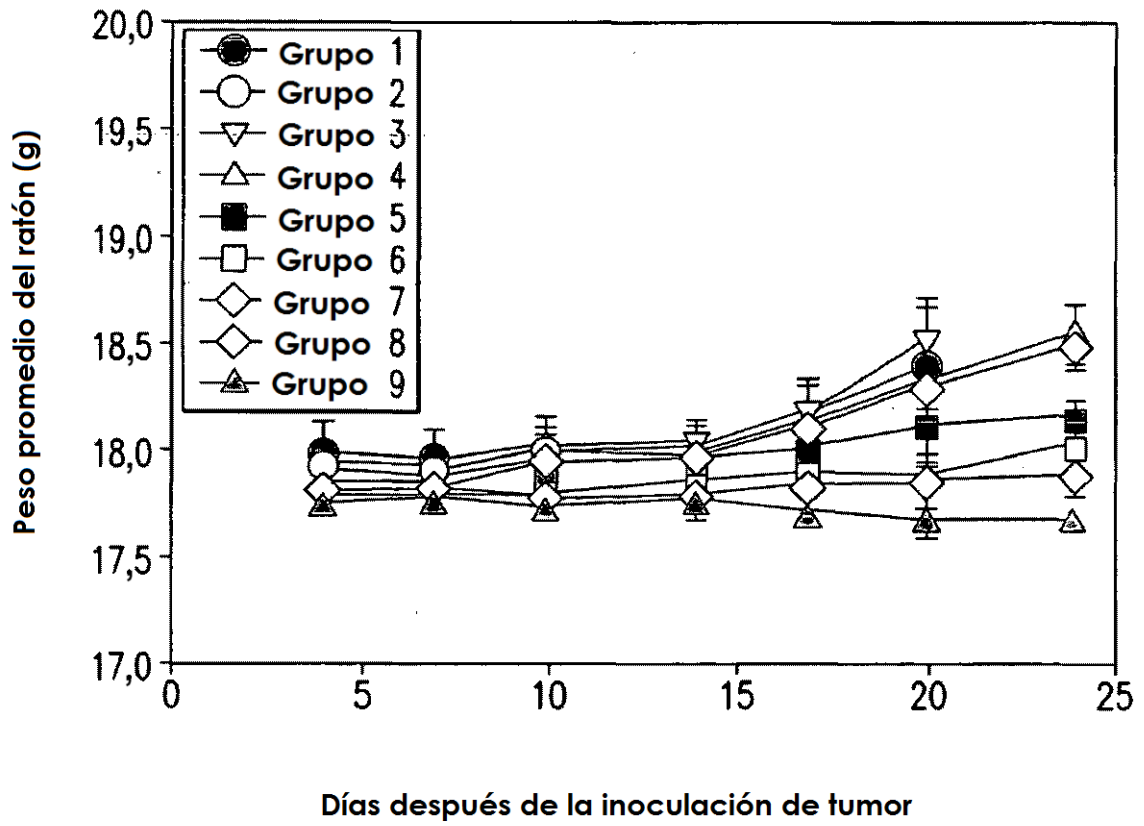


FIG. 13

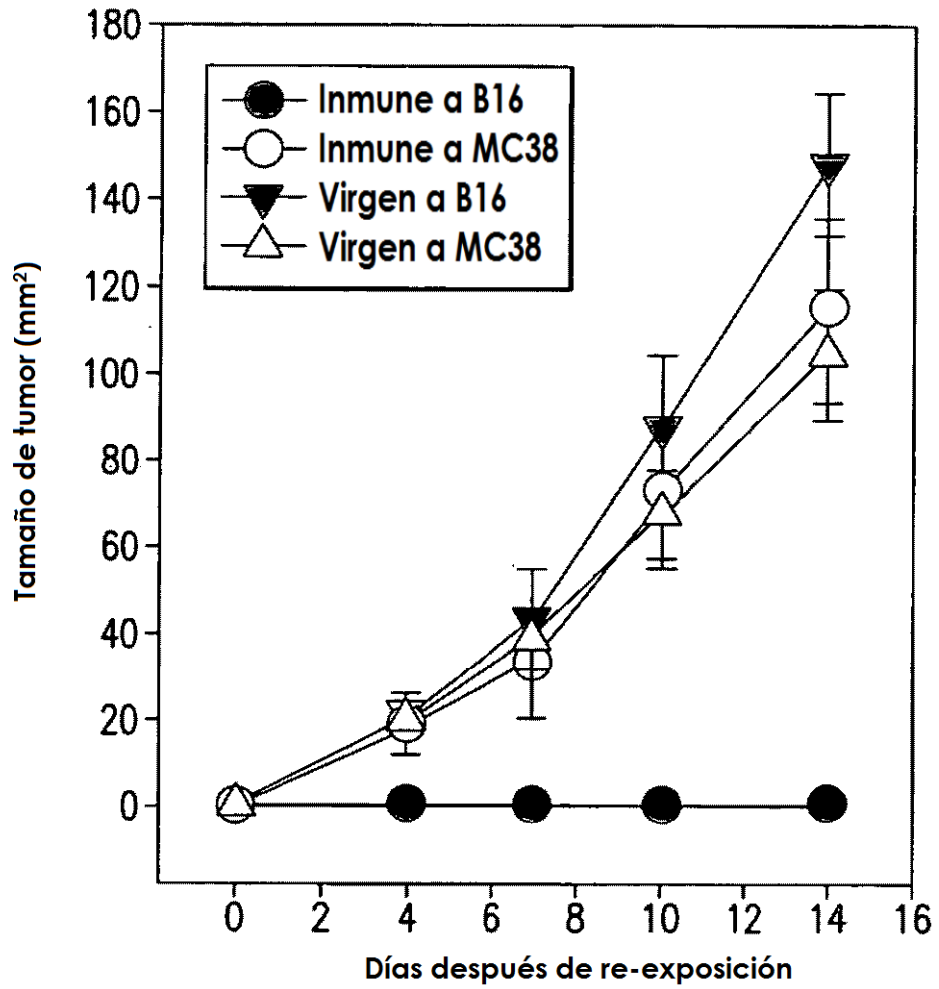


FIG.14

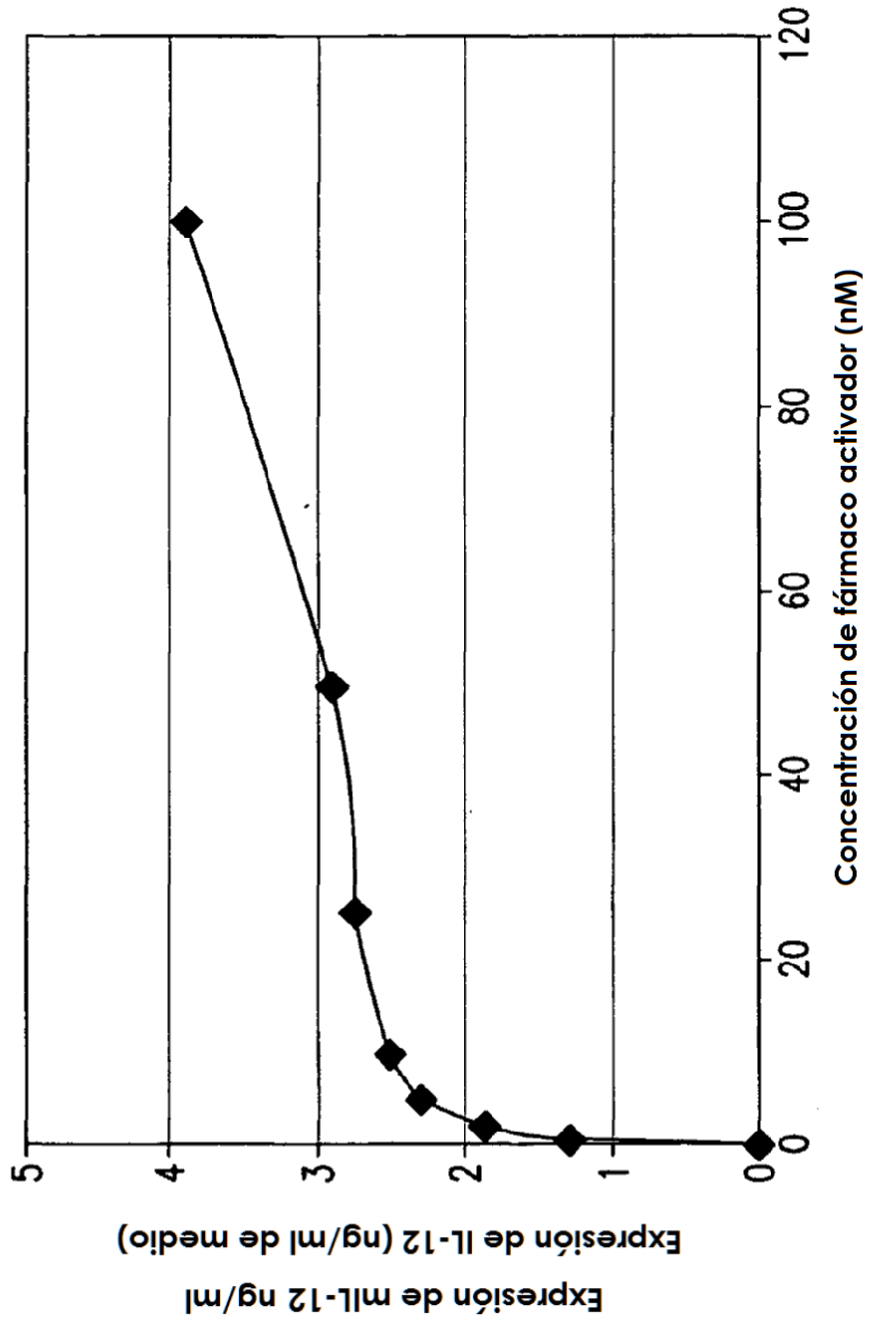


FIG.15

Respuesta de activación/desactivación de la expresión de mIL-12 a la presencia/ausencia de RG-115932 en células HT1080 transducidas con Ad-RTS-mIL_12

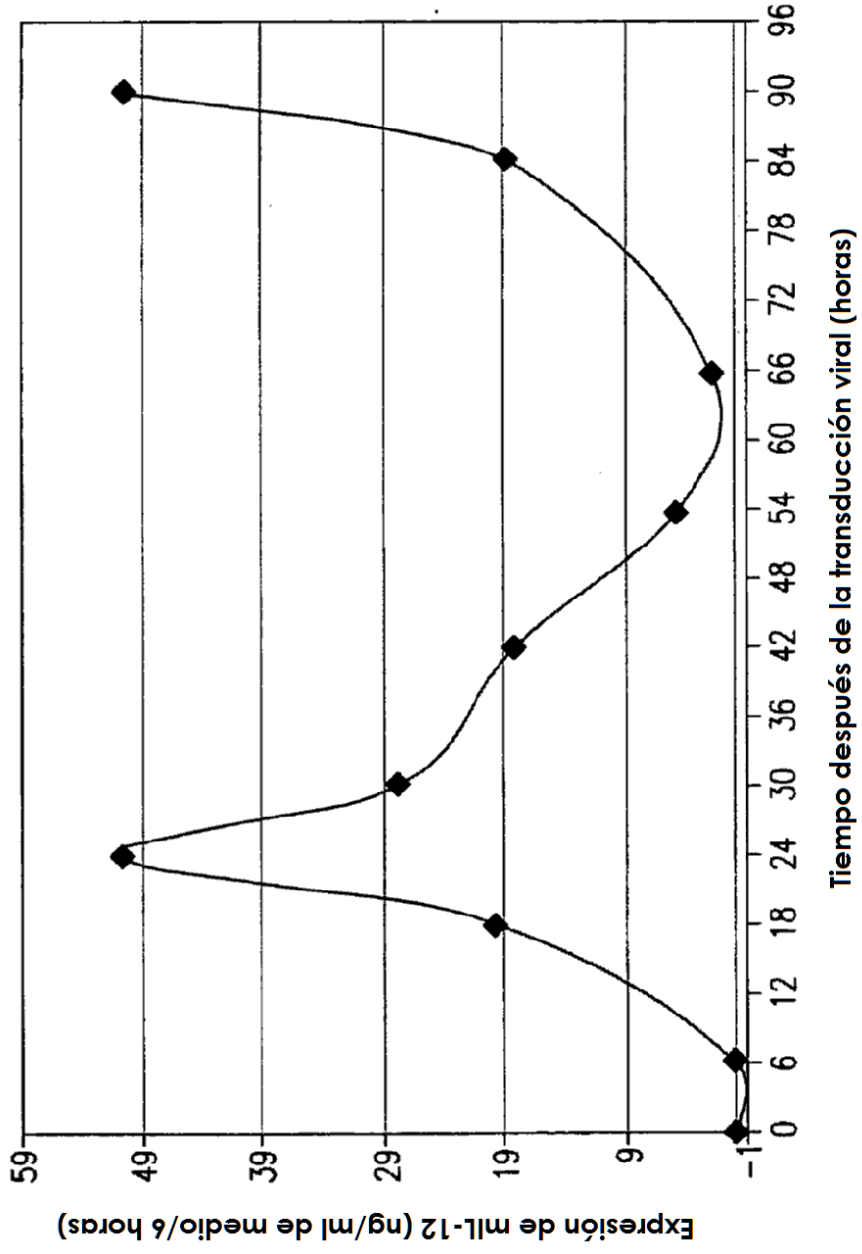


FIG.16

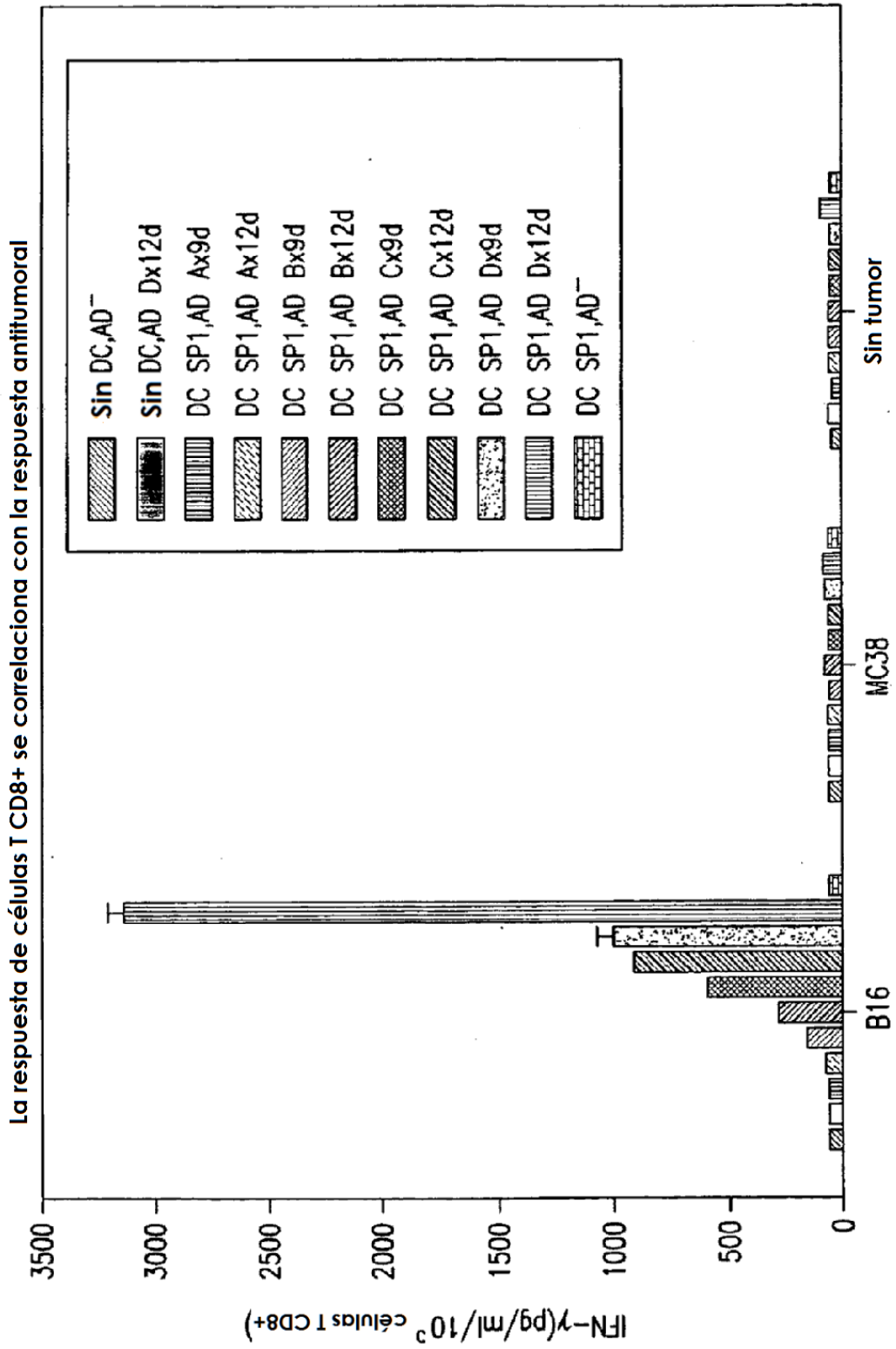


FIG.17

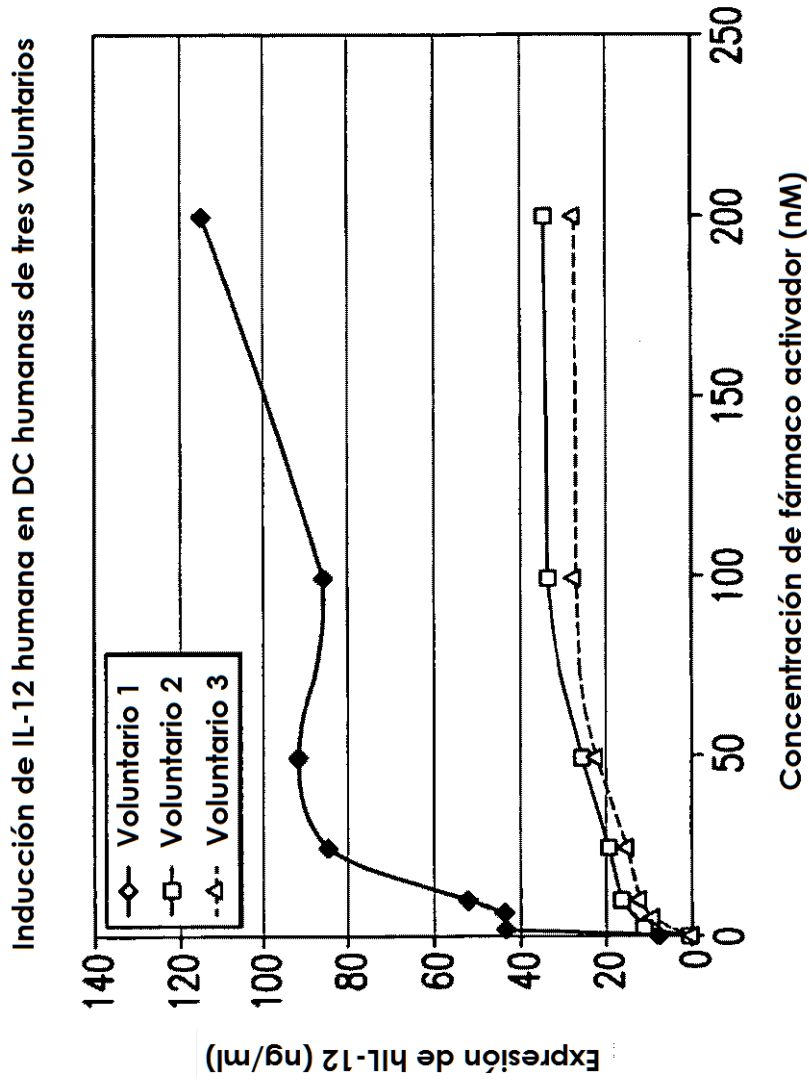


FIG.18