

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 406**

51 Int. Cl.:

A61K 31/713 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

A61P 37/06 (2006.01)

A61K 35/12 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2007 E 12159304 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 2489729**

54 Título: **Transfección mediada por células apoptóticas de células de mamífero con ARN de interferencia**

30 Prioridad:

28.09.2006 US 827343 P

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

08.06.2015

73 Titular/es:

**LOMA LINDA UNIVERSITY (100.0%)
24888 Prospect Street
Loma Linda, CA 92350, US**

72 Inventor/es:

**LI, FENGCHUN y
ESCHER, ALAN P.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 537 406 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

Transfección mediada por células apoptóticas de células de mamífero con ARN de interferencia.

Antecedentes

5 La interferencia con ARN (iARN) es un mecanismo de biología molecular en el que la presencia de ciertos fragmentos de ARN bicatenario (ARNbc) interfiere con la expresión de un gen particular, que comparte una secuencia homóloga con el ARNbc. iARN es un proceso de silenciamiento génico que requiere la participación activa de maquinaria celular. Aunque el mecanismo específico se entiende escasamente, se sabe que la enzima ribonucleasa Dicer se une a y escinde moléculas de ARN bicatenario (ARNbc) cortas para producir fragmentos bicatenarios de 21-23 pares de bases con salientes monocatenarios de dos bases en cada extremo. Los fragmentos bicatenarios cortos producidos por Dicer, llamados ARN de interferencia pequeños (ARNip), se separan después, supuestamente por una enzima con actividad helicasa, y se integran en un complejo multiproteico denominado complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC).

15 Los ARNip sintéticos y ARN en horquilla cortos (ARNhc) pueden diseñarse para tener una función idéntica. Mientras que un ARNip son dos hebras de ARN complementario que pueden sintetizarse, un ARNhc se codifica por ADN como una molécula de ARN sencilla que hibrida consigo misma con un bucle en un extremo. El bucle se escinde después de forma intracelular produciendo una molécula similar a un ARNip. Existen miles de secuencias de ARNi que son capaces de regular negativamente la expresión génica (véase, por ejemplo, Behlke, 2006, Mol Ther vol. 13 p 644). Este método se ha convertido en un medio universalmente aceptado de regulación negativa de la expresión de cualquier gen en células de mamífero.

20 En la actualidad, se suministran moléculas de ARNi mediante electroporación, transfección mediada por cationes y liposomas, suministro viral e inyección directa (Behlke, 2006, Mol Ther vol. 13 p644). Un grupo ha mostrado que pueden usarse bacterias para suministrar moléculas de ARNi a células de mamífero para explorar con respecto a moléculas de ARNip de dirección (Zhao et al., 2005, Nat Methods vol 2 p 967).

25 Las células presentadoras de antígeno (APC) como células dendríticas (DC) son una diana principal para manipulación de respuestas inmunes y se han modificado usando ARNi (Li et al., 2004, Immu Res vol 30 p 215). Sin embargo, no hay ningún método disponible que permita el cosuministro garantizado de múltiples antígenos y moléculas de ARNi a las mismas APC.

Sumario

30 Según la presente invención, se proporciona una célula de mamífero apoptótica o pre-apoptótica cultivada in vitro, que comprende:

(a) una molécula de ARNi capaz de regular negativamente un gen diana; y

(b) un vector de expresión capaz de expresar una proteína pro-apoptótica, para emplear en terapia.

35 La invención utiliza células apoptóticas (AC) para el suministro a células vivas de ARN cortos capaces de regular negativamente la expresión génica mediante interferencia de ARN (iARN). La invención aborda el problema de suministrar moléculas de ARNi a células de mamífero in vivo y la capacidad para ligar la presencia de un antígeno o antígenos ya sintetizados con una molécula de ARNi como parte del mismo conjunto para suministrar.

40 En la presente memoria también se describe un método para generar AC que contengan una molécula de ARNi, que incluye las etapas de (1) proporcionar una molécula de ARNi, tal como ARN de interferencia corto (ARNip) o un vector capaz de expresar un ARN en horquilla corto (ARNhc), dirigido a un gen diana de interés; (2) introducir la molécula de ARNi en células preapoptóticas (pre-AC), preferiblemente por transfección; y (3) inducir apoptosis, por ejemplo, por exposición a UV o expresión de una proteína pro-apoptótica como BAX, para crear una AC que contenga la molécula de ARNi.

45 En un ejemplo la molécula de ARNi contiene una secuencia polinucleotídica sustancialmente complementaria a un ARN mensajero (ARNm) que codifica el gen diana. En un ejemplo preferido la molécula de ARNi comprende un ARN bicatenario (ARNbc), que contiene una secuencia sentido que corresponde a una secuencia parcial del ARNm de gen diana y una secuencia antisentido que es sustancialmente complementaria y capaz de hibridar específicamente con un ARNm de gen diana.

50 En una realización, la molécula de ARNi comprende una molécula de ARN bicatenaria (ARNbc) corta de aproximadamente 19-27 pares de bases. En una realización preferida la molécula de ARNi es un ARNip, que comprende una molécula de ARN bicatenario (ARNbc) corta de aproximadamente 19-23 pares de bases, teniendo cada hebra un saliente monocatenario de aproximadamente dos bases en un extremo.

En otra realización, la molécula de ARNi se proporciona por un vector capaz de expresar un ARN en horquilla corto (ARNhc) o un ARN de interferencia corto (ARNip). En una realización preferida, el vector contiene uno o más de un promotor de ARN polimerasa III que controla la transcripción de la molécula de ARNi.

En una realización, la molécula de ARNi se introduce en la célula de mamífero por transfección, electroporación o microinyección. En otra realización, la molécula de ARNi se introduce en la célula de mamífero por suministro de un plásmido de ADN o vector viral que codifica un ARN en horquilla corto (ARNhc).

5 En un ejemplo, el método incluye la etapa adicional de introducir un ADN plasmídico o vector de expresión viral que contiene una secuencia polinucleotídica que codifica una proteína proapoptótica, tal como proteína BAX, en las células de mamífero prepapoptóticas.

10 En un ejemplo la molécula de ARNi y el vector de expresión que contiene una secuencia polinucleotídica que codifica una proteína proapoptótica se introducen ambos en la célula de mamífero, por ejemplo por co-transfección in vitro o introduciendo la molécula de ARNi y el vector de expresión en un órgano o tejido por electroporación, pistola génica o inyección.

15 En la presente memoria también se describe un método para transfectar una célula de mamífero, que incluye las etapas de: (a) proporcionar una célula de mamífero que expresa un gen diana, siendo capaz la célula de mamífero de fagocitosis; y (b) exponer la célula de mamífero a una célula apoptótica, que contiene una molécula de ARNi capaz de regular negativamente el gen diana, en condiciones por las que la célula apoptótica se capta por la célula de mamífero. La molécula de ARNi regula después negativamente la expresión del gen diana en la célula de mamífero. En ejemplos alternativos, las células de mamífero se exponen a las células apoptóticas in vivo o in vitro. En un ejemplo preferido, la célula de mamífero es una célula presentadora de antígenos.

20 En la presente memoria también se describe una célula huésped de mamífero, que comprende: (a) una o varias moléculas de ARNi capaces de regular negativamente un gen diana; y (b) un vector de expresión capaz de expresar una proteína proapoptótica. En un ejemplo preferido la célula huésped de mamífero expresa uno o varios antígenos, como autoantígenos o antígenos donadores. Las células huésped de mamífero pueden convertirse a AC para su uso en procedimientos de transfección mediados por células.

25 Muchas células pueden procesar AC, en particular, células presentadoras de antígenos (APC) como células dendríticas (DC) que dirigen respuestas inmunes. La capacidad para suministrar antígeno y una molécula de ARNi capaz de modificar la función de una APC, como DC, como parte del mismo conjunto permitirá el aumento del control sobre las respuestas inmunes inducidas (es decir, tolerogénicas frente a inmunogénicas) para antígenos presentes en las AC. Este enfoque puede adaptarse para su uso en la prevención de rechazo de trasplante (con antígenos donadores) y tratamiento de enfermedades autoinmunes (con autoantígenos).

30 **Breve descripción de los dibujos**

Estas características, aspectos y ventajas de la presente invención se entenderán mejor con respecto a la siguiente descripción, reivindicaciones adjuntas y dibujos adjuntos en los que:

35 la Figura 1 muestra representaciones esquemáticas de los plásmidos usados para generar células de mamífero que contienen una molécula de ARNi (RUC_{hc} y hclI) y/o para generar AC (BAX), así como plásmidos que contienen genes indicadores (RUC y LUC) usados para controlar la regulación negativa de un gen diana (RUC) de acuerdo con métodos descritos en la presente memoria.

la Figura 2 muestra actividad de luciferasa de Renilla (RUC) de células COS-7 que expresan el ADN_c de RUC y co-cultivadas con AC COS-7 tratadas de forma diferente;

40 la Figura 3 muestra los efectos de la duración de expresión de RUC_{hc} antes de inducción de apoptosis en la actividad de luciferasa de Renilla en células vivas; y

la Figura 4 muestra los efectos de AC inducidas por UV y BAX que contienen RUC_{hc} en los niveles de ARNm de RUC expresados por células vivas.

Descripción detallada

45 De acuerdo con la presente invención, se proporciona una célula de mamífero apoptótica o pre-apoptótica cultivada in vitro, que comprende:

(a) una molécula de ARNi capaz de regular negativamente un gen diana; y

50 (b) un vector de expresión capaz de expresar una proteína pro-apoptótica, para emplear en terapia. También se describe un método para generar una célula apoptótica (AC) que contiene una molécula de ARN de interferencia (ARNi) capaz de regular negativamente un gen diana seleccionado. También se describe un método para suministrar una molécula de ARNi a una célula de mamífero que expresa el gen diana usando la AC.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, excepto cuando el contexto requiera otra cosa, el término "comprender" y variaciones del término, tales como "que comprende", "comprende" y "comprendido" no pretenden excluir otros aditivos, componentes, números enteros o etapas.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, la expresión “sustancialmente complementaria” y variaciones de la expresión, tales como “complemento sustancial”, significa que al menos el 90% de todos los restos consecutivos en una primera cadena son complementarios de una serie de restos consecutivos de la misma longitud de una segunda cadena. Como entenderán los expertos en la materia en relación con la presente descripción, una cadena puede ser más corta que la otra cadena y ser aun sustancialmente complementaria. Con respecto a la invención descrita en la presente descripción, por ejemplo, el ARNi, ARNip o ARNhc puede ser más corto o más largo que el ARN mensajero (ARNm) complementario para el gen diana de interés; sin embargo, es preferible que la molécula de ARNi sea más corta que y sustancialmente complementaria de su ARNm correspondiente.

Una etapa del método es proporcionar una molécula de ARNi dirigida a un gen diana de interés.

“Molécula de ARNi” se refiere a un ácido nucleico que forma un ARN bicatenario, teniendo dicho ARN bicatenario la capacidad de reducir o inhibir la expresión de un gen o gen diana cuando la molécula de ARNi está presente en la misma célula que el gen o gen diana. En general, las moléculas de ARNi son fragmentos de ARN bicatenario (ARNbc), que comparten una secuencia homóloga con un gen diana. El ARNbc de una molécula de ARNi típicamente contiene una secuencia “sentido” que corresponde a una secuencia parcial del ARN mensajero del gen diana (ARNm) y una secuencia “antisentido” que es sustancialmente complementaria y capaz de hibridar específicamente con un ARNm de gen diana.

Las moléculas de ARNi incluyen ARN de interferencia pequeños (ARNip), que están comprendidos por moléculas de ARNbc cortas. En una realización, un ARNip comprende un ARNbc que contiene una secuencia antisentido sustancialmente o completamente complementaria de un ARNm del gen diana. Las partes del ARNip que hibridan para formar el ARNbc son típicamente sustancialmente o completamente complementarias entre sí. Las secuencias del ARNip pueden corresponder al gen diana de longitud completa, o una subsecuencia del mismo. Típicamente, el ARNip es de al menos aproximadamente 15-50 nucleótidos de longitud (por ejemplo, cada secuencia complementaria del ARNip bicatenario es de 15-50 nucleótidos de longitud y el ARNip bicatenario es de aproximadamente 15-50 pares de bases de longitud), preferentemente aproximadamente 19-27 pares de bases de longitud, por ejemplo, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 o 27 nucleótidos de longitud.

En una realización preferida, la parte bicatenaria del ARNip es de aproximadamente 19-23 pares de bases y contiene dos salientes monocatenarios de dos bases en cada extremo, que imitan el producto que se produce de forma natural por la endorribonucleasa Dicer in vivo. Los ARNip adecuados se integran en un complejo multiproteico llamado complejo silenciador inducido por ARN (RISC), que inicia la degradación de ARNm homólogo.

La síntesis del ARNip puede conseguirse fácilmente mediante procedimientos químicos que implican a la fosforoamidita y puede obtenerse a partir de varias fuentes comerciales bien conocidas en la técnica, como se entenderá por los expertos en la materia con referencia a la presente descripción.

Una alternativa a la síntesis química individual de ARNip es construir una secuencia para inserción en un vector de expresión. Varios vectores de ARNi para la transcripción de inserto están disponibles en el mercado (por ejemplo, Ambion, Austin, TX; Invitrogen, Carlsbad, CA). Algunos usan un promotor de ARN polimerasa III (Pol III) para dirigir la expresión de las hebras tanto sentido como antisentido de forma separada, que después hibridan in vivo para componer el ARNip. Otros vectores están basados en el uso de Pol III para dirigir la expresión de ARN de “horquilla” cortos (ARNhc), transcritos individuales que adoptan estructuras de tallo-lazo, que se procesan a ARNip por la maquinaria de ARNi. Un ejemplo de un vector de ARNi es el vector pTZU6 mostrado en la Figura 1.

En consecuencia, las moléculas de ARNi también incluyen ARN en “horquilla” corto (ARNhc), que actúa de una manera similar a ARNip. Mientras que ARNip está comprendido por dos cadenas de ARN complementario que pueden sintetizarse, un ARNhc está codificado por ADN como una molécula de ARN sencilla que hibrida consigo misma con un bucle en un extremo. El bucle en “horquilla” del ARNhc se escinde de forma intracelular produciendo una molécula similar a un ARNip.

Un diseño de vector de ARNhc típico incorpora dos repeticiones invertidas, que contienen las secuencias diana sentido y antisentido, separadas por una secuencia de bucle. Las secuencias de bucle habitualmente usadas contienen 8-9 bases. Una secuencia terminadora que consiste en 5-6 poli dT puede estar presente en el extremo 3' y pueden añadirse secuencias de clonación a los extremos 5' de los oligonucleótidos complementarios. Haciendo referencia a la Figura 1, se muestran dos insertos específicos codificantes, RUChc y hcII, que codifican ARNhc. Las secuencias de polinucleótidos de estos insertos son SEC ID NO: 1 y SEC ID NO: 2.

Cualquier gen expresado dentro de células vivas, que sean capaces de fagocitosis y captación de células apoptóticas, puede seleccionarse como el gen diana. Por ejemplo, puede suministrarse ADN plasmídico que exprese una molécula de ARNi que regule la inmunidad, por ejemplo, por regulación negativa de la expresión de CD40 para inducir tolerancia. Puede diseñarse una de varias moléculas de ARNi para regular de forma negativa la expresión de uno o varios genes diana seleccionados en células vivas siguiendo un método usado de forma rutinaria, tal como software informático o selección aleatoria de secuencia diana dentro del ARN mensajero del gen diana seguido de determinación experimental de degradación de ARN diana.

La regulación negativa es el proceso por el que una célula reduce el número de un componente celular, tal como

ARN o proteína en respuesta a una variable externa. El ARNi regula negativamente una función génica por degradación de ARNm. Por lo tanto, el grado de interferencia de ARN conseguido es directamente proporcional al nivel de ARN maduro y las proteínas traducidas. Las expresiones “regular negativamente”, “regulación negativa”, “que regula negativamente” o “regulado negativamente” se refieren de forma intercambiable a una proteína o ácido nucleico (ARN) que se transcribe o traduce a un nivel detectablemente más bajo, en comparación con una célula normal o no tratada. Puede detectarse regulación negativa usando técnicas convencionales para detectar y/o medir ARNm diana (es decir, RT-PCR, PCR, hibridación) o proteínas diana (es decir, ELISA, técnicas inmunohistoquímicas, actividad enzimática). La regulación negativa puede ser 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% etc. en comparación con una célula normal o no tratada. En ciertos casos, la regulación negativa es 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces o más niveles más bajos de transcripción o traducción en comparación con una célula normal o no tratada.

Otra etapa del método es introducir una molécula de ARNi en una célula, que no ha experimentado apoptosis, es decir, una célula preapoptótica (pre AC). Puede usarse cualquier célula de mamífero, ya que puede inducirse que todas experimenten apoptosis y son capaces de llevar a cabo reacciones de ARNi. Las moléculas de ARNi se suministran a células vivas que se harán apoptóticas in vitro o directamente in vivo, dependiendo de la aplicación deseada.

En una realización las pre-AC expresan antígenos conocidos o desconocidos capaces de inducir una respuesta inmune. Por ejemplo, el antígeno específico puede ser autoantígeno que se reconoce por el sistema inmune de los pacientes que padecen una enfermedad autoinmune específica.

Las moléculas de ARNi pueden suministrarse directamente como ARN por transfección de células con ARN de interferencia cortos (ARNip) usando electroporación u otros métodos aceptados descritos en la bibliografía. Por ejemplo, puede conseguirse suministro de ARNip directamente en las células usando microinyección o mediante el uso del reactivo de transfección especializado para suministro de ARNip.

Como alternativa, el método preferido es suministrar un vector de expresión ADN que codifica ARN en horquilla corto (ARNhc) que actúa como una molécula de ARNi, suministrado mediante electroporación, transfección mediada por cationes o liposomas, suministro viral o inyección directa. Este enfoque permite concentraciones más altas de moléculas de ARNi en AC.

Después de introducir la molécula de ARNi en la célula preapoptótica, la siguiente etapa del método es inducir apoptosis, creando de este modo una AC que contiene la molécula de ARNi.

Como apreciará un experto en la materia, la apoptosis es una forma de muerte celular en la que una secuencia programada de acontecimientos conduce a la eliminación de células sin liberar sustancias perjudiciales al área circundante. La apoptosis desempeña un papel crucial en el desarrollo y mantenimiento de la salud eliminando células viejas, células innecesarias y células enfermas. El cuerpo humano reemplaza quizás un millón de células por segundo. La apoptosis también se denomina muerte celular programada o suicidio celular. Estrictamente, el término apoptosis se refiere solamente a los cambios estructurales que experimentan las células, y la muerte celular programada se refiere al proceso subyacente completo, pero los términos se usan con frecuencia de forma intercambiable.

Las características morfológicas asociadas con células que experimentan apoptosis incluyen formación de burbujas en la membrana, agregación de cromatina en la membrana nuclear, reducción del citoplasma y condensación del núcleo, fragmentación de la célula en cuerpos más pequeños, formación de cuerpos apoptóticos y formación de poros en la membrana mitocondrial, implicando proteínas de la familia de bcl-2. Las características bioquímicas asociadas con el proceso dependiente de energía (ATP) de la muerte celular programada incluyen fragmentación de la longitud mono y oligonucleosómica no aleatoria del ADN (patrón en escalera después de electroforesis en gel de agarosa), liberación de citocromo c, factor inductor de apoptosis (AIF) y otros factores al citoplasma por las mitocondrias, activación de la cascada de caspasa y alteraciones en la bioquímica de membrana (es decir translocación de fosfatidilserina de la capa citoplásmica a la cara extracelular de la membrana).

La apoptosis puede inducirse experimentalmente exponiendo las células a diversos estímulos, incluyendo agentes químicos o radiación. Los inhibidores de topoisomerasas tales como etopósido (también conocido como VP-16) son potentes inductores de apoptosis, y se usan ampliamente en el estudio de la muerte celular programada. Como alternativa, las células transfectadas in vitro pueden hacerse apoptóticas usando exposición a luz ultravioleta o cosuministro de un gen o ADNc que codifica una proteína pro-apoptótica, por ejemplo, la proteína BAX. Para apoptosis inducida por UV, las células se exponen simplemente a luz UV-B durante 10 minutos a una distancia de 10 cm. Para apoptosis inducida por BAX, el suministro y expresión del ADNc a las células es suficiente para desencadenar apoptosis.

En un ejemplo, el método incluye la etapa adicional de introducir un ADN plasmídico o vector de expresión viral que contiene una secuencia polinucleotídica que codifica una proteína pro-apoptótica en las células de mamífero. En relación con la Figura 1, se muestra un mapa para tal vector, pND2-BAX, en el que la expresión del ADNc de BAX está bajo control del promotor/potenciador hCMV IE1. La secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína BAX

se describe en SEC ID NO: 3.

Las células pueden transfectarse in vitro, hacerse apoptóticas y después inyectarse a un paciente, preferiblemente por vía intravenosa. Puede usarse un enfoque similar para generar ACs que contengan moléculas de ARNi in vivo. En este caso el enfoque preferido es suministrar ADN plasmídico que codifica el ARNhc de elección así como proteína pro-apoptótica. El ADN puede suministrarse a un órgano o tejido seleccionado, usando electroporación, pistola génica o inyección.

En la presente memoria se describe también un método para transfectar células de mamífero in vitro exponiendo una célula viva que contenga un gen diana a una AC que contenga una molécula de ARNi dirigida al gen diana de modo que la molécula de ARNi regule negativamente la expresión del gen diana.

Las células de mamífero vivas pueden ser líneas celulares cultivadas in vitro o células de cualquier tejido dado de un cuerpo vivo, in vivo. Se exponen a las AC que contienen la molécula de ARNi células vivas que expresan uno o varios genes a los que se dirige el gen de molécula de ARNi. Cualquier gen endógeno o exógeno expresado dentro de células vivas puede ser la diana de la molécula de ARNi. Puede conseguirse la expresión de un gen exógeno por introducción de un vector de expresión que contenga un polinucleótido que codifique un gen diana de interés. De nuevo, estas células pueden ser células cultivadas in vitro o pueden ser células de cualquier tejido in vivo.

Los experimentos in vitro descritos en el presente documento demuestran que las moléculas de ARNi presentes en las AC pueden transfectar células vivas con las moléculas de ARNi. Las AC se fagocitan y procesan por las células vivas, y las moléculas de ARNi que estaban presentes en las AC regulan negativamente la expresión del gen o los genes diana en las células vivas.

La mayoría de las células tienen cierta capacidad fagocítica, sin embargo, los dos tipos celulares más importantes cuya función principal es la fagocitosis son los leucocitos polimorfonucleares y las células del linaje monocito-macrófago (monocitos, macrófagos, células de Kupffer, células de Langerhans, células dendríticas y células gliales). Como apreciará un experto en la materia, se produce fagocitosis de AC constantemente in vivo para retirar células muertas. En consecuencia, se espera que también se produzca fagocitosis y captación de AC que contienen moléculas de ARNi in vivo, como se ha mostrado para AC que portan ADN genómico (Holmgren et al, 1999, Blood vol 11 p 3956).

Muchas células pueden procesar AC, en particular APC presentadoras de antígenos, como DC, que dirigen respuestas inmunes. Una célula presentadora de antígenos (APC) es una célula que presenta antígeno ajeno en complejo con MHC en su superficie. Los linfocitos T pueden reconocer este complejo usando su receptor de linfocitos T (TCR). Aunque casi cada célula en el cuerpo es técnicamente una APC, puesto que puede presentar antígeno para linfocitos T CD8+ mediante moléculas del MHC de clase I, el término se limita con frecuencia a las células especializadas que pueden sensibilizar linfocitos T (es decir, activan un linfocito T que no se ha expuesto a antígeno). Estas células generalmente expresan moléculas del MHC de clase III así como del MHC de clase I y pueden estimular células CD4+ ("auxiliares") así como linfocitos T CD8+ ("citotóxicos"). Las células presentadoras de antígenos tradicionales incluyen macrófagos; células dendríticas; células de Langerhans; y linfocitos B. Otras células, como fibroblastos (piel), células epiteliales del timo, células epiteliales del tiroides, células gliales (cerebro), células beta pancreáticas y células endoteliales vasculares, pueden estimularse por ciertas citocinas tales como IFN- γ , para expresar las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad requeridas para interacción con linfocitos T vírgenes.

Una ventaja significativa de la transfección mediada por AC de las APC con moléculas de ARNi es que permitirá el cosuministro de todos y cada uno de los antígenos presentes en AC junto con una o posiblemente varias moléculas de ARNi seleccionadas para las mismas APC. Además, la transfección mediada por AC es un medio fisiológico de suministrar ARNi que podría dar como resultado un número alto de células transfectadas, debido a que las AC se fagocitan rápidamente y reclutan APC in vivo.

La capacidad para suministrar antígeno y una molécula de ARNi capaz de modificar la función de las APC, como DC, como parte del mismo conjunto permite aumentar el control sobre las respuestas inmunes inducidas (es decir, tolerogénica frente a inmunogénica) para antígenos presentes en AC. Las aplicaciones importantes para este enfoque incluyen la prevención de rechazo de trasplantes (con antígenos donadores) y tratamiento de enfermedades autoinmunes (con autoantígenos).

Las aplicaciones clínicas potenciales de este enfoque son múltiples e incluyen cualquier situación en la que un gen deba regularse negativamente para fines terapéuticos. El enfoque es particularmente adecuado para la manipulación de respuestas inmunes debido a que las células presentadoras de antígeno son muy eficaces en la captación y procesamiento de AC. La capacidad para suministrar antígeno o antígenos y moléculas de ARNi como un conjunto sencillo significa que una célula dendrítica específica montará una respuesta inmune dirigida por las moléculas de ARNi para el antígeno o los antígenos de las AC. Por ejemplo, si se desea inducir tolerancia o inmunidad a un antígeno específico, podría suministrarse ADN plasmídico que codifica el antígeno, una molécula de ARNi que regula la inmunidad, por ejemplo regulación negativa de expresión de CD40 para inducir tolerancia y una proteína proapoptótica. Tales AC se procesarían por APC que tendrían más probabilidades de desencadenar tolerancia para

el antígeno o los antígenos portados por las AC.

La invención proporciona AC de mamífero que contienen una molécula de ARNi seleccionada que regula negativamente la expresión de un gen diana seleccionado. Las AC pueden generarse usando UV o un ADNc proapoptótico como el que codifica la proteína BAX. La invención puede apreciarse en ciertos aspectos en relación con los siguientes ejemplos, ofrecidos como ilustración, no como limitación. Los materiales, reactivos y similares a los que se hace referencia en los siguientes ejemplos pueden obtenerse de fuentes comerciales, a no ser que se observe de otro modo.

La Figura 1 muestra representaciones esquemáticas de los plásmidos usados para generar células de mamífero que contienen una molécula de ARNi (RUC_{hc} y hcll) y/o para generar AC (BAX), así como plásmidos que contienen genes indicadores (RUC y LUC) usados para controlar la regulación negativa de un gen diana (RUC) de acuerdo con un método descrito en la presente memoria. Los mapas plasmídicos se prepararon usando software Plasmid Processor W (T. Kivirau-ma, P. Oikari y J.Saarela, Dept. of Biochemistry & Biotechnology, U. de Kuopio, plasmid@uku.fi, Página de inicio: <http://www.uku.fi/~kiviraum/plasmid/plasmid.html>, Archivo: iubio/ibmpc/plasmid-processor*, ebi/dos/plasmid).

Haciendo referencia a la Figura 1, la secuencia de shRUC para el sitio C de luciferasa de Renilla introducida en el plásmido pTZU6-shRUC es SEQ ID NO:1. La secuencia de shII para HIV-1 rev (sitio II) introducida en el plásmido pTZU6-shII es SEQ ID NO:2. La secuencia de BAX para BAX humano insertada en el plásmido pND2-BAX es SEQ ID NO:3. La secuencia de LUC para luciferasa de luciérnaga insertada en el plásmido pND2-LUC es SEQ ID NO:4. La secuencia de RUC para luciferasa de Renilla introducida en el plásmido pND2-RUC es SEQ ID NO:5.

Como ejemplo, la Figura 2 muestra el efecto de las AC que contienen un ARN en horquilla corto (RUC_{hc}) que provoca degradación del ARNm de luciferasa de Renilla. Se incubaron células COS-7 de simio que expresaban ADNc de luciferasa de Renilla con células COS-7 apoptóticas inducidas por UV o BAX que contenían RUC_{hc} y se midió la actividad de luciferasa de Renilla.

Se transfectaron células COS-7 con 5 de ADN plasmídico de RUC que codificaba luciferasa de Renilla para medir los efectos de AC y 2 µg de ADN plasmídicos de LUC que codificaba luciferasa de luciérnaga para normalización. Las células COS-7 tratadas de forma diferente se hicieron apoptóticas y se añadieron a las células COS-7 vivas 3 horas después de que las células vivas se hubieran transfectado con luciferasa. La apoptosis inducida por UV y BAX produjo aproximadamente 80% y aproximadamente 30% de AC, respectivamente. La relación de células a las que se había inducido apoptosis añadidas a células vivas que expresaban ADNc de luciferasa fue de 2:1. Las células se recogieron después de 20 horas de cultivo para medir las actividades de luciferasa. La tinción de células COS-7 vivas y apoptóticas mostró captación de AC por células vivas (datos no mostrados).

Todas las transfecciones se realizaron usando Superfect (Qiagen, Valencia, CA). Las mediciones se realizaron por triplicado a partir de dos experimentos separados.

La Figura 2 muestra la actividad de luciferasa de Renilla (RUC) de células COS-7 que expresan el ADNc de RUC y cocultivadas con AC COS-7 tratadas de forma diferente. Haciendo referencia ahora a la Figura 2: el blanco muestra la actividad de luminiscencia de fondo de células no transfectadas; control de RUC+RUC_{hc}: muestra actividad de RUC cuando las células se cotransfectaron con plásmidos de luciferasa (5 µg de RUC, 2 µg de LUC) y plásmido que codificaba RUC_{hc} (10 µg) para confirmar la actividad de regulación negativa de RUC_{hc} (sin AC añadidas); el vector UV muestra la actividad de RUC cuando se generaron AC añadidas transfectado células COS-7 con 10 µg de vector plasmídico solo y exposición a UV 48 horas después de la transfección; UV-hcll muestra actividad de RUC cuando las pre-AC se transfectaron con 10 µg de ADN plasmídico que codificaba un ARN_{hc} que se dirigía al gen de virus VIH II como control negativo y se hicieron apoptóticas como se describe para el vector UV-AC; UV-AC RUC_{hc} muestra actividad de RUC cuando las pre-AC se transfectaron con 10 µg de ADN plasmídico que codificaba un ARN_{hc} que se dirigía al ADNc de RUC y se hicieron apoptóticas como se describe para el vector UV-AC; el vector BAX muestra actividad de RUC cuando las pre-AC se cotransfectaron con ADN plasmídico que codificaba BAX (10 µg) y vector plasmídico solamente (10 µg) y se recogieron AC 30 horas después de la transfección (sin tratamiento con UV); BAX-hcll muestra actividad de RUC cuando las pre-AC se transfectaron con ADN plasmídico que codificaba BAX y ARN_{hc} de control y se procesaron como se describe para el vector BAX; y BAX-RUC_{hc} muestra actividad de RUC cuando las pre-AC se transfectaron con ADN plasmídico que codificaba BAX y RUC_{hc} y se procesaron como se describe para el vector BAX.

Estos resultados muestran que las AC que contenían RUC_{hc} redujeron la actividad luciferasa en células vivas que expresaban un gen diana de RUC. Por el contrario, el co-cultivo con AC que contenían un ARN_{hc} de control (hcll) que se dirigía al gen de VIH-1 rev no. La adición de AC que contenían vector solamente no afectó a la actividad luciferasa de Renilla (datos no mostrados).

La Figura 3 muestra los efectos de la duración de la expresión de RUC_{hc} antes de inducción de apoptosis de células que contienen RUC_{hc} en la actividad luciferasa de Renilla en células vivas. Los datos indican que las AC que contenían RUC_{hc} que se habían expresado durante 12 y 24 horas no regularon negativamente la actividad luciferasa después de incubar las células apoptóticas y vivas. La expresión de RUC_{hc} durante 48 horas fue

necesaria para observar pérdida de actividad luciferasa. Estos datos indican que la pérdida de actividad luciferasa después de añadir AC que contenían RUC_{hc} no se debió a la contaminación de plásmido RUC_{hc} en células que expresaban ADN_c de luciferasa RUC, sino a la expresión de RUC_{hc} contenida por las AC.

5 La Figura 4 muestra los efectos de AC inducidas por UV y BAX que contenían hcll o RUC_{hc} en niveles del ARNm de luciferasa de Renilla en células vivas expuestas a las AC. Las células COS-7 vivas transfectadas con ADN_c de luciferasa se cocultivaron con AC de COS-7 que contenían ARN_{hc} de control (hcll) o ARN_{hc} que se dirigía a ARNm de RUC (ARN_{hc}), y se indujeron con UV o BAX, como se describe para la Figura 2. El ARN total se aisló y se realizó RT-PCR semicuantitativa con 100, 200 y 400 ng de molde de ARN total usando cebadores para RUC y el gen constitutivo GAPD-H. Los productos se separaron usando electroforesis en gel de agarosa y se determinaron las densidades de bandas de ADN_c. La cantidad de ADN_c de RUC se normalizó con respecto a la cantidad de ADN_c de GAPD-H cuando se compararon los tratamientos con hcll y RUC_{hc} para un método de inducción de apoptosis dado. Los datos se muestran como porcentaje de ADN_c de RUC hallado en células tratadas con RUC_{hc} en comparación con células tratadas con hcll.

15 Estos resultados muestran que RUC_{hc} contenido por las AC redujo los niveles de ARNm de RUC en células vivas expuestas a las AC.

En la presente memoria también se describen los siguientes párrafos numerados.

1. Un método para generar una célula apoptótica, que contiene una molécula de ARNi que comprende:

(a) proporcionar una molécula de ARNi, siendo la molécula de ARNi capaz de regular negativamente un gen diana de interés;

20 (b) introducir la molécula de ARNi en una célula de mamífero; y

(c) inducir apoptosis para crear una célula apoptótica que contenga la molécula de ARNi.

2. El método del párrafo 1, en el que la molécula de ARNi es un ARN de interferencia corto (ARN_{ip}) o un ARN en horquilla corto (ARN_{hc}).

25 3. El método del párrafo 1, en el que la molécula de ARNi contiene una secuencia polinucleotídica que es sustancialmente complementaria de un ARN mensajero (ARN_m) que codifica el gen diana.

4. El método del párrafo 3, en el que la molécula de ARNi comprende un ARN bicatenario (ARN_{bc}), que contiene una secuencia sentido correspondiente a una secuencia parcial del ARNm del gen diana y una secuencia antisentido que es sustancialmente complementaria de y capaz de hibridar específicamente con un ARNm del gen diana.

30 5. El método del párrafo 1, en el que la molécula de ARNi comprende una molécula de ARN bicatenario (ARN_{bc}) corta de aproximadamente 19-27 pares de bases.

6. El método del párrafo 2, en el que el ARN_{ip} es una molécula de ARN bicatenario (ARN_{bc}) corta de aproximadamente 19-23 pares de bases, teniendo cada hebra un saliente monocatenario de aproximadamente dos bases en un extremo.

35 7. El método del párrafo 1, en el que la molécula de ARNi se proporciona por un vector capaz de expresar un ARN en horquilla corto (ARN_{hc}) o un ARN de interferencia corto (ARN_{ip}).

8. El método del párrafo 7, en el que el vector contiene uno o más de un promotor de ARN polimerasa III que controla la transcripción de la molécula de ARNi.

9. El método del párrafo 1, en el que la molécula de ARNi se introduce en la célula de mamífero por transfección, electroporación o microinyección.

40 10. El método del párrafo 1, en el que la molécula de ARNi se introduce en la célula de mamífero suministrando un plásmido de ADN o vector viral que codifica un ARN en horquilla corto (ARN_{hc}).

11. El método del párrafo 1, en el que se induce apoptosis exponiendo las células de mamífero que contienen la molécula de ARNi a luz ultravioleta.

12. El método del párrafo 1, en el que se induce apoptosis por expresión de una proteína pro-apoptótica.

45 13. El método del párrafo 1, que comprende adicionalmente introducir un ADN plasmídico o vector de expresión viral que contiene una secuencia polinucleotídica que codifica una proteína pro-apoptótica en las células de mamífero.

14. El método del párrafo 13, en el que la proteína pro-apoptótica es la proteína BAX.

15. El método del párrafo 1, en el que la molécula de ARNi se introduce en la célula de mamífero y la apoptosis se induce in vitro.

16. El método del párrafo 13, en el que la molécula de ARNi y el vector de expresión que contiene una secuencia polinucleotídica que codifica una proteína pro-apoptótica se introducen en la célula de mamífero por cotransfección.
17. El método del párrafo 13, en el que la molécula de ARNi y el vector de expresión que contiene una secuencia polinucleotídica que codifica una proteína pro-apoptótica se introducen en un órgano o tejido por electroporación, pistola génica o inyección.
- 5 18. Un método para transfectar una célula de mamífero, que comprende:
- (a) proporcionar una célula de mamífero que expresa un gen diana, siendo capaz la célula de mamífero de fagocitosis; y
- (b) exponer la célula de mamífero a una célula apoptótica, que contiene una molécula de ARNi capaz de regular negativamente el gen diana, en condiciones por las que la célula apoptótica se capta por la célula de mamífero.
- 10 19. El método del párrafo 18, en el que la molécula de ARNi regula negativamente la expresión del gen diana en la célula de mamífero.
20. El método del párrafo 18, en el que la célula de mamífero es una célula presentadora de antígenos.
- 15 21. El método del párrafo 18, en el que las células de mamífero se exponen a las células apoptóticas in vivo o in vitro.
22. Una célula de mamífero huésped, que comprende:
- (a) una molécula de ARNi capaz de regular negativamente un gen diana; y
- (b) un vector de expresión capaz de expresar una proteína pro-apoptótica.
- 20 23. La célula huésped de mamífero del párrafo 22, que además comprende un antígeno específico seleccionado del grupo que consiste en un autoantígeno y un antígeno donador.

Referencias

- Behlke, M.A. (2006) Progress Towards In Vivo Use of siRNAs. *Molecular Therapy* 13/4: 644-670.
- 25 Holmgren, L, Szeles, A., Rajnavolgyi, E., Foldman, J., Klein, G., Ember, I. y Falk, K.I. (1999) Horizontal Transfer of DNA by the Uptake of Apoptotic Bodies, *Blood* 93/11: 3956-3963.
- Li, M., Qian, H., Ichim, T.M., Ge, W-W., Popov, A., Rycerz, K., Neu, J., White, D., Zhong, R y Min, W.-P. (2004) Induction of RNA Interference in Dendritic Cells. *Immunologic Research* 30/2: 215-230.
- Zhao H.-F., L'Abbé D., Jolicoeur, N., Wu, M., Li, Z., Zhenbao, Y. y Shen S-H. (2005) High-Through-put Screening of Effective siRNAs from RNAi Libraries Delivered via Bacterial Invasion, *Nature Methods* 2/12: 967-973.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> LOMA LINDA UNIVERSITY

5 <120> TRANSFECCIÓN MEDIADA POR CÉLULAS APOPTÓTICAS DE CÉLULAS DE MAMÍFERO CON ARN DE INTERFERENCIA

<130> 088025-0065

10 <140> EP 12159304.0
<141> 13-03-2012

<150> EP 07843470.1
<151> 28-09-2007

15 <150> PCT/US2007/079876
<151> 28-09-2007

<150> 60/827,343
<151> 28-09-2006

20 <160> 5

<170> PatentIn versión 3.5

25 <210> 1
<211> 62
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<221> origen
<223> / nota="Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

35 <400> 1
caccgtagcg cgggtgatta taccagtggt ctgtcctggt ataatacacc gcgctacttt 60
tt 62

<210> 2
<211> 56
40 <212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> origen
45 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

<400> 2
gcctgtgcct cttcagctac cgaagcttgg gtagctgaag aggcacaggc tttttt 56

50 <210> 3
<211> 577
<212> DNA
<213> Homo sapiens

55 <400> 3
atggacgggt ccggggagca gccagagggc gggggggcca ccagctctga gcagtcatga 60
agacaggggc ccttttgctt cagggtttca tccaggatcg agcagggcga agggggggga 120

ES 2 537 406 T3

ggcaccgag ctggccctgg acccggtgcc tcaggatgcg tccaccaaga agctgagcga 180
 gtgtctcaag cgcacgggg acgaactgga cagtaacatg gagctgcaga ggatgattgc 240
 cgccgtggac acagactccc cccgagaggt ctttttccga gtggcagctg acatgttttc 300
 tgacggcaac ttcaactggg gccgggttgt cgccttttc tactttgcca gcaaactggt 360
 gctcaaggcc ctgtgcacca aggtgccgga actgatcaga accatcatgg gctggacatt 420
 ggacttctc cgggagcggc tgttgggctg gatccaagac cagggtgggt gggacggcct 480
 cctctctac tttgggacgc ccacgtggca gaccgtgacc atctttgtgg cgggagtgct 540
 caccgcctcg ctcaccatct ggaagaagat gggctga 577

<210> 4

5 <211> 1653

<212> DNA

<213> Photinus pyralis

<400> 4

atggaagacg ccaaaaaacat aaagaaaggc ccggcgccat tctatccgct ggaagatgga 60
 accgctggag agcaactgca taaggctatg aagagatacg ccctggttcc tggacaacatt 120
 gcttttacag atgcacatat cgagggtggac atcacttaag ctgagtactt cgaaatgtcc 180
 gttcggttgg cagaagctat gaaacgatat gggctgaata caaatcacag aatcgtcgta 240
 tgcagtgaaa actctcttca attctttatg ccgggtgttg gcggttatt tatcggagtt 300
 gcagttgcgc ccgcgaacga catttataat gaacgtgaat tgctcaacag tatgggcatt 360
 tcgcagccta ccgtggtggt cgtttccaaa aaggggttgc aaaaaattt gaacgtgcaa 420
 aaaaagctcc caatcatcca aaaaattatt atcatggatt ctaaacgga ttaccagga 480
 tttcagtcga tgtacacggt cgtcacatct catctacctc ccggttttaa tgaatacgat 540
 tttgtgccag agtccttoga tagggacaag acaattgcac tgatcatgaa ctctctgga 600
 tctactggtc tgcctaaagg tgtcgtctg cctcatagaa ctgcctgctg gagattctcg 660
 catgccagag atcctatttt tggcaatcaa atcattccgg aactgctgat ttttaagtgt 720
 gttccattcc atcacggtt tggaatggtt actacaactc gatattgat atgtggattt 780
 cgagtcgtct taatgtatag atttgaagaa gagctgtttc tgaggagcct tcaggattac 840
 aagattcaaa gtgcgctgct ggtgcccaacc ctattctcct tcttcgcaa aagcactctg 900
 attgacaaat acgatttatc taatttacac gaaattgctt ctggtggcgc tcccctctct 960
 aaggaagtcg ggggaagcgg tgcgaagagg ttccatctgc caggtatcag gcaaggatat 1020
 gggctcactg agactacatc agctattctg attacaccg aggggatga taaaccgggc 1080
 gcggtcggta aagttgttcc atttttgaa gcgaaggtt tgatctgga taccgggaaa 1140
 acgctggcgc ttaatcaaag aggcgaactg tgtgtgagag gtccatgat tatgtccggt 1200
 10 tatgtaaaca atccggaagc gaccaacgcc ttgattgaca aggatggatg gctacattct 1260

ES 2 537 406 T3

ggagacatag cttactggga cgaagacgaa cacttcttca tcgttgaccg cctgaagtct 1320
 ctgattaagt acaaaggcta tcaggtgggt cccgctgaat tggaatccat cttgctccaa 1380
 caccccaaca tcttcgacgc aggtgtcgca ggtcttcccg acgatgacgc cggatgaactt 1440
 cccgcccggc ttgttgtttt ggagcacgga aagacgatga cggaaaaaga gatcgtggat 1500
 tacgtcgcca gtcaagtaac aaccgcgaaa aagttgcgcg gaggagtgtg gtttgtggac 1560
 gaagtaccga aaggtcttac cggaaaactc gacgcaagaa aaatcagaga gatcctcata 1620
 aaggccaaga agggcggaaa gatcgccgtg taa 1653

<210> 5
 <211> 936
 <212> DNA
 <213> Renilla reniformis

5

<400> 5
 atgacttcga aagtttatga tccagaacaa aggaaacgga tgataactgg tccgcagtgg 60
 tgggccagat gtaacaaat gaatgttctt gattcattta ttaattatta tgattcagaa 120
 aaacatgcag aaaatgctgt tattttttta catggtaacg cggcctcttc ttatttatgg 180
 cgacatggtg tgccacatat tgagccagta gcgcggtgta ttataccaga tcttattggt 240
 atgggcaaat caggcaaatc tggtaatggt tcttataggt tacttgatca ttacaaatat 300
 cttactgcat ggtttgaact tottaattta ccaaagaaga tcatttttgt oggcoatgat 360
 tggggtgctt gtttggcatt tcattatagc tatgagcatc aagataagat caaagcaata 420
 gttcacgctg aaagtgtagt agatgtgatt gaatcatggg atgaatggcc tgatattgaa 480
 gaagatattg cgttgatcaa atctgaagaa ggagaaaaaa tggttttgga gaataacttc 540
 ttcgtggaaa ccatgttgcc atcaaaaatc atgagaaaagt tagaaccaga agaatttgca 600
 gcataatcttg aaccattcaa agagaaaagg gaagttcgtc gtccaacatt atcatggcct 660
 cgtgaaatcc cgttagtaaa aggtggtaaa cctgacgttg tacaattgt taggaattat 720
 aatgcttacc tacgtgcaag tgatgattta ccaaaaatgt ttattgaatc ggatccagga 780
 ttcttttcca atgctattgt tgaaggcggc aagaagtttc ctaatactga atttgtcaaa 840
 gtaaaaggtc ttcatTTTTc gcaagaagat gcacctgatg aaatgggaaa atatatcaaa 900
 tcgttcggtg agcgagttct caaaaatgaa caataa 936

10

REIVINDICACIONES

1. Una célula de mamífero apoptótica o pre-apoptótica cultivada in vitro, que comprende:
 - (a) una molécula de ARNi capaz de regular negativamente un gen diana; y
 - (b) un vector de expresión capaz de expresar una proteína pro-apoptótica,
- 5 para emplear en terapia.
2. La célula de mamífero para usar en terapia según la reivindicación 1, en la que dicha molécula de ARNi es un ARN de interferencia corto (ARNip) o un ARN en horquilla corto (ARNhc).
3. La célula de mamífero para usar en terapia según la reivindicación 1 o 2, en la que dicha molécula de ARNi comprende un ARN bicatenario (ARNbc) corto de 19-27 pares de bases.
- 10 4. La célula de mamífero para usar en terapia según la reivindicación 2, en la que dicho ARNip comprende un ARN bicatenario (ARNbc) corto de 19-23 pares de bases, y comprende salientes monocatenarios de dos bases en cada extremo.
5. La célula de mamífero para usar en terapia según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que dicha molécula de ARNi es codificada por un vector capaz de expresar un ARN en horquilla corto (ARNhc) o un ARN de interferencia corto (ARNip).
- 15 6. La célula de mamífero para usar en terapia según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que expresa uno o varios antígenos.
7. La célula de mamífero para usar en terapia según la reivindicación 6, en la que dicho antígeno es un autoantígeno.
- 20 8. La célula de mamífero de la reivindicación 7, para emplear en el tratamiento de una enfermedad autoinmune.
9. La célula de mamífero para usar en terapia según la reivindicación 6, en la que dicho antígeno es un antígeno donador.
10. La célula de mamífero de la reivindicación 9, para emplear en el tratamiento o prevención de un rechazo a un trasplante.
- 25 11. La célula de mamífero de la reivindicación 1, para emplear en la inducción de inmunotolerancia, en donde dicho gen diana es CD40.

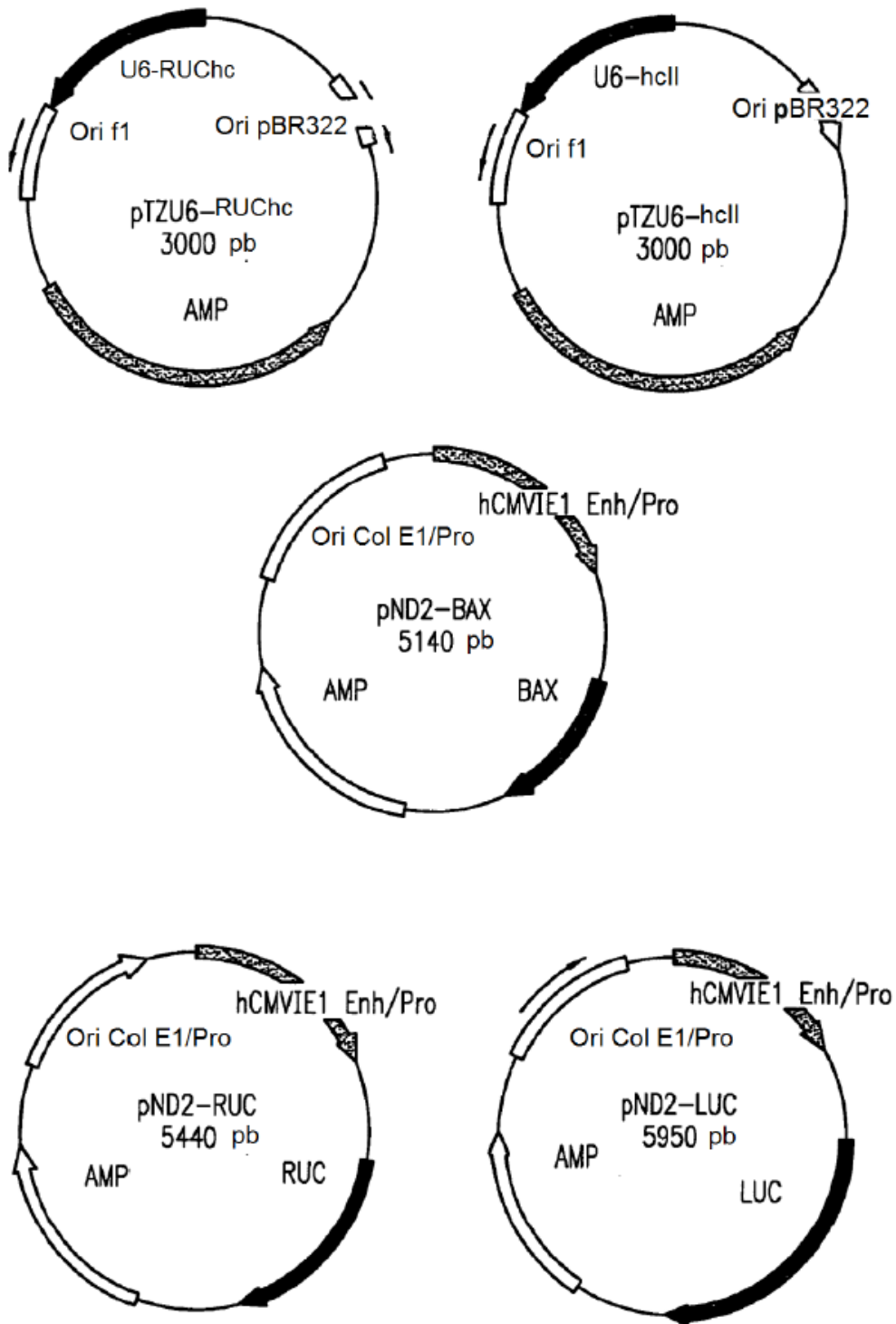


FIG. 1

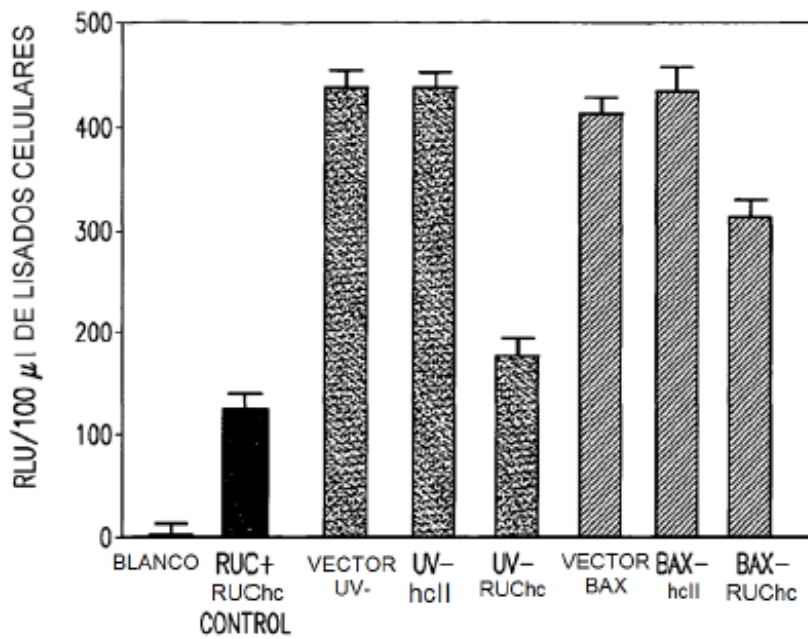


FIG. 2

EFFECTOS DE RUChe EN LAS ACTIVIDADES DE RUC (CÉLULA RECOGIDA 24 h después de la mezcla, FONDO CELULAR pcDNA3.11-RUC)

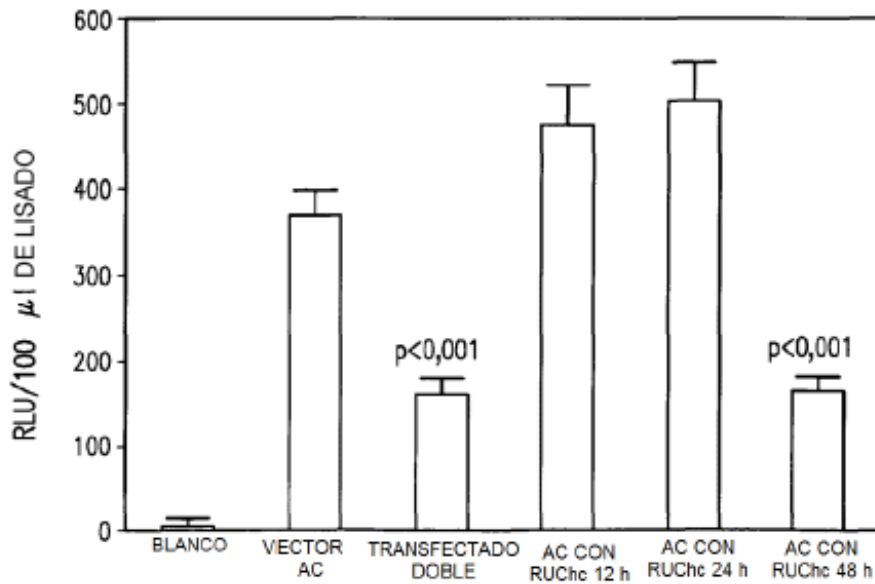


FIG. 3

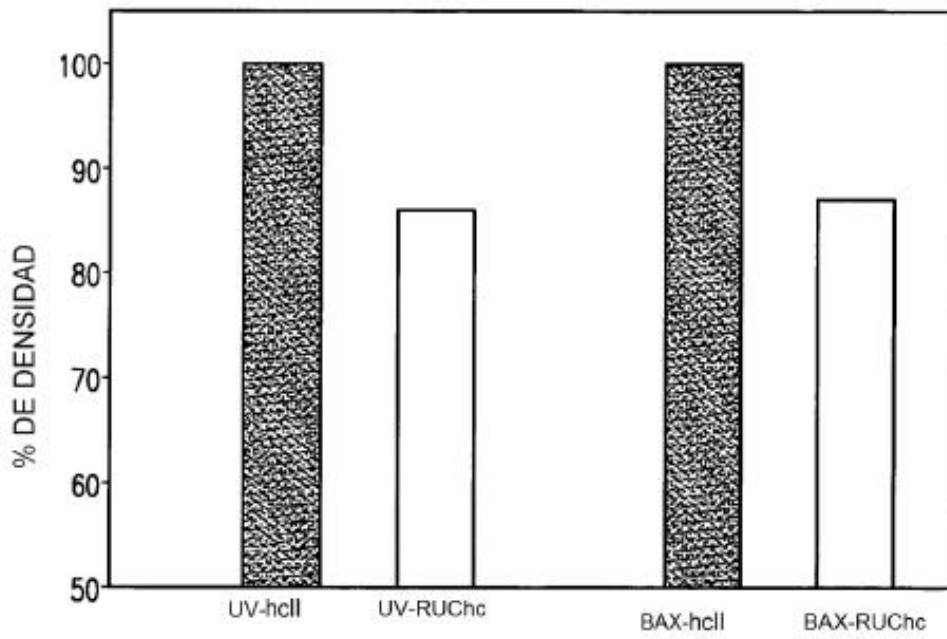


FIG. 4